

# DIAGNOSTICO DEL SÍNDROME DE AMARILLAMIENTO, DEL RAQUITISMO DE LA SOCA Y LA ESCALDADURA DE LA HOJA EN ECUADOR

Freddy Fernando Garcés Obando<sup>1/</sup>  
Carmen Valladares Pérez<sup>1/</sup>  
Giovanni Quiridumbay<sup>1/</sup>

<sup>1/</sup>Fundación para la Investigación Azucarera del Ecuador FIADE.  
Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador CINCAE.

## RESUMEN

Mediante un diagnóstico realizado en cultivos comerciales de caña de azúcar de los ingenios Valdez, San Carlos y la Troncal del Ecuador, se confirmó la presencia de las bacterias *Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson, y *Leifsonia (Clavibacter) xyli* subsp *xyli* Davis, causantes de la escaldadura de la hoja y el raquitismo de la soca y el virus causante del Síndrome de Amarillamiento (Sugarcane Yellow Leaf Virus, ScYLV), empleando dos técnicas denominadas Dot Blot Inmunoassay, DBIA y Tissue Blot Inmunoassay, TBIA.

En el ámbito comercial se detectó el raquitismo de la soca, el síndrome de amarillamiento y la escaldadura de la hoja con una incidencia promedio del 17.27, 26.31 y 1.5 por ciento y con máximos niveles del 95.58, 99.3 y 28.5 por ciento respectivamente. Se encontró distribuido el raquitismo en el 79.14 por ciento, el síndrome en el 73.82 y la escaldadura en el 32.0 por ciento del total de lotes comerciales evaluados.

De acuerdo al diagnóstico realizado, la enfermedad de mayor importancia es el raquitismo de la soca, ya que se encuentran con altos niveles de incidencia, distribuida ampliamente en canteros (suertes) comerciales y semilleros en los tres ingenios y afectando todas las variedades comerciales. El síndrome de amarillamiento se detectó con niveles altos de incidencia especialmente en variedades de reciente introducción, particularmente en los ingenios San Carlos y Valdez. La escaldadura de la hoja aunque presente en la mayoría de las variedades, se detectó con niveles de incidencia bajos, probablemente debido a la resistencia que presenta la variedad Ragnar, sembrada aproximadamente en el 80 por ciento del área.

**Palabras claves:** Raquitismo, escaldadura, síndrome de la hoja amarilla, diagnóstico

## SUMMARY

A diagnostic work confirmed the presence of *Leifsonia (Clavibacter) xyli* subsp *xyli* Davis and *Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson, bacterium causing the ratoon stunting disease RSD and the leaf scald disease LSD. It was also found the sugarcane yellow leaf virus ScYLV-Polero virus. The diagnostic work was carried out using the TBIA and the DBIA which is based on immunoassay techniques.

In commercial fields the RSD, ScYLV and the LSD showed incidence levels of 17.27, 26.31 and 1.5, respectively. Maximum levels in percentage were found up to 95.58, 99.3 and 28.3 for the three diseases. Furthermore, RSD was distributed in 79.14 %, yellow syndrome in 73.82 y LSD in 32.0% in the evaluated cane fields.

According to these results, RSD is the most important disease problem due to high levels of incidence and distributed elsewhere. The ScYLV was found at high levels in varieties recently introduced to commercial production at San Carlos and Valdez mills. LSD has the lowest levels due to some probable resistance found in Ragnar which is the most planted variety in the area.

## INTRODUCCION

En el Ecuador se han observado síntomas de varias enfermedades asociadas con hongos, bacterias y virus, que son consideradas de importancia económica en diferentes países del mundo, entre ellas; el raquitismo de la soca (*Leifsoinia Clavibacter xyli subsp xyli.*), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson), y el Síndrome de Amarillamiento (Jara, 1990; Victoria, 1990; Comstock J.1993, Victoria y Gómez 1994; Garcés y Valladares, 2001)

Desafortunadamente de estas enfermedades no se tenía conocimiento sobre la epidemiología, el manejo, e importancia económica, sólo se habían realizado algunas evaluaciones puntuales y de manera aislada (Victoria y Gómez 1994; Garcés, 1999; Garcés, 2000). Tampoco se contaba con técnicas de diagnóstico específicas y sensibles que permitieran realizar un diagnóstico confiable, ya que en algunos casos las plantas no presentan los síntomas de la enfermedad o pueden estar enmascarados por desórdenes fisiológicos y otras enfermedades. El desconocimiento de la situación fitosanitaria no permitía determinar cuales eran los problemas más importantes, cómo estaban evolucionando y cómo se debía priorizar los recursos para establecer medidas de manejo preventivo, lo que aumentaba la vulnerabilidad de los productores tanto ingenios como cañicultores en la costa del Ecuador.

En el presente trabajo, se presentan los resultados sobre la incidencia y distribución geográfica del raquitismo, la escaldadura y el síndrome de amarillamiento presentes en la zona de cultivo, utilizando técnicas inmunoenzimáticas, lo que permitió realizar un diagnóstico rápido y de manera práctica, determinando la importancia epidemiológica de estas tres enfermedades y las necesidades de investigación.

## MATERIALES Y METODOS

### Implementación de las técnicas de diagnóstico

De acuerdo a la metodología desarrollada por Shenck, (1997) y modificada por Guzmán (2000) y Lehrer (2001), se realizó la impresión de la nervadura de la hoja, en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BIO RAD), para la detección del virus causante del síndrome de amarillamiento y la bacteria causante de la escaldadura de la hoja; mientras que para detectar la bacteria causante del raquitismo de la soca, se extrajo el jugo del tercio basal de tallos, mediante presión positiva y se centrifugo para concentrar la bacteria 10 veces; luego se depositó 10 ul del jugo en el mismo tipo de membrana empleada para las enfermedades anteriores. Una vez fijada la muestra en la membrana se siguió la metodología descrita por Shenck y modificada por Guzmán (2000) Para el caso de síndrome, antes de realizar la prueba se incubó en cloroformo para eliminar la clorofila y luego se bloqueó la membrana en Tris buffer (TBS) pH 7.5, adicionando leche seca descremada de BIO-RAD (1%) y albúmina de suero bovino libre de globulinas, con agitación horizontal.

Se realizaron tres enjuagues con TBS, después de transcurrido el tiempo de bloqueo y se incubó en agitación el antisuero específico para el virus y las dos bacterias, gentilmente cedidos por el Dr Ben Lockhart de la Universidad de Minnesota, Copersucar de Brasil, CIRAD-Francia y los producidos por Cenicña.

Luego de tres lavados con TBS, se incubó en agitación horizontal la membrana, en inmunoglobulina anti-rabbit preparada en cabras y conjugada con fosfatasa alcalina de marca BIO-RAD. Se mantuvo en agitación con TBS, adicionando leche seca descremada de BIO-RAD (1%).

Finalmente para visualizar la presencia/ausencia de la proteína viral, se realizó una reacción de precipitación, al incubar la membrana en buffer de sustrato pH: 9.5, adicionando NBT (nitro blue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphato) BIO-RAD, NaCl y MgCl<sub>2</sub>. Para detener la reacción se realizaron dos enjuagues en agua destilada

Para determinar en que hoja se presentaba mayor porcentaje de vasos positivos, se tomaron muestras de hoja de diferente edad, identificando como TVD, la hoja con la última lígula visible, TVD -1, TVD -2 y TVD -3, las hojas jóvenes y TVD +1, TVD +2 y TVD +3 las hojas maduras, en las variedades Ragnar y CR 74250 con síntomas de amarillamiento y CC 8592 con síntomas de escaldadura. Además para el caso del ScYLV y la escaldadura, de cada hoja se evaluaron los tercios apical, medio y basal. En todos los casos se utilizó como control negativo semilla del la variedad Ragnar con cuatro tratamientos térmicos.

Se utilizó el antisuero específico para la detección de cada patógeno. Se evaluaron diferentes títulos 1:30000, 1:20000, 1:10000, 1:5000 y 1:2500, con el fin de determinar la concentración del antisuero en la cual se presentaba una mejor reacción. Por otro lado se evaluaron tres tiempos de incubación de 1, 1.5 y 2 horas.

Se empleó el conjugado producido por BIO-RAD, evaluando diferentes títulos, 1:1000, 1:3000, 1:6000, 1:9000 y tiempos de incubación de 1, 1.5 y 2 horas.

### **Determinación de la incidencia y distribución geográfica de las tres enfermedades:**

Durante el año 2002, se seleccionó el cinco por ciento del área de cultivo, realizando el muestreo aleatorio, en caña planta (plantilla), primera, segunda, tercera y cuarta soca, por sector en tres zonas agroecológicas que concuerdan con las áreas de influencia de los ingenios la Troncal, San Carlos y Valdez. En los ingenios se determinó, la incidencia por cantero (suerte), sectores y zonas y se ponderó por el área de cultivo

Para el diagnóstico de raquitismo (RSD), la escaldadura de la hoja (LSD), y para el virus que causa el síndrome de amarillamiento (sugarcane yellow leaf virus, ScYLV-Polerovirus), en el campo se tomaron muestras de 20 tallos y/o de 20 hojas por cada cinco hectáreas de cultivo comercial y esta se analizaron en el laboratorio, de acuerdo al patógeno y a la técnica de diagnóstico más adecuada. Durante la zafra, del 2001 y del 2002, se evaluaron semilleros comerciales de los tres ingenios, tomando muestras de 20 tallos y/o de 20 hojas por cada tres hectáreas.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Implementación de las técnicas de diagnóstico**

Mediante las metodologías de diagnóstico inmunoenzimático, denominadas Dot-Blot Inmunoassay (DBIA) y Tissue Blot Inmunoassay, se confirmó la presencia de la bacteria *Leifsonia (Clavibacter) xyli* subsp *xyli*, Davis, que causa el raquitismo de la caña de azúcar, la bacteria *Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson, causante de la escaldadura de la hoja y el virus del síndrome de amarillamiento ScYLV-Polerovirus, en canteros comerciales de caña de azúcar en Ecuador; al utilizar antisueros específicos que reconocieron la presencia de las dos bacterias y el virus.

En la Figura 1 se puede observar la reacción de precipitación en la membrana de nitrocelulosa, indicando la presencia de la bacteria causante del raquitismo de la soca. Se realizó también la impresión de la nervadura de la hoja, pero se presentó mayor grado de reacción, utilizando el jugo de los tallos.

En las muestras evaluadas se confirmó la presencia de la bacteria causante de la escaldadura de la hoja en el Ecuador, al detectarla, inicialmente mediante la salida de bacterias en un microscopio con campo oscuro bajo 100X, mediante su aislamiento en el medio semiselectivo de Wilbrink, y su detección inmuno-enzimática a partir de muestras obtenidas de las variedades Azul Casagrande, CC 85-92 SP 701143 y un clon ECSP, utilizando los antisueros producidos por CENICAÑA y COPERSUCAR. Para la escaldadura de la hoja, cuando se empleó el jugo se observó un barrido, que generaba problemas para la lectura, mientras que en la impresión de la nervadura, los resultados mostraban la presencia de puntos o un pequeño barrido que no generaba inconvenientes. Por esta razón se decidió continuar realizando la impresión de la nervadura de la hoja para el diagnóstico en el ámbito comercial.

El mejor tipo de muestra para el diagnóstico del ScYLV, fue el tercio basal de la TVD (Cuadro 1), lo que concuerda con Guzmán (1999), y para la escaldadura el tercio basal de la TVD+3

En cuanto a los títulos de los antisueros, varió dependiendo de su origen, ya que la mejor reacción se obtuvo para el antisuero de Copersucar a 1:10000, Cenicaña 1:3000 y el de CIRAD a 1:200, aunque esta último presentó una reacción pobre. Estas diluciones fueron las mejores tanto para raquitismo como para escaldadura. Por otro lado para la detección del virus causante del síndrome de amarillamiento la mejor reacción se presentó cuando el antisuero cedido por B.E.L Lockarth, se diluyó 1:5000.

### **Determinación de la incidencia y distribución geográfica de las tres enfermedades:**

De acuerdo a este diagnóstico realizado durante la zafra del 2002, se determinó que la enfermedad de mayor distribución es el raquitismo de la caña de azúcar (RSD), con una incidencia del 17.24 por ciento (Cuadro 2), distribuida en el Ingenio San Carlos, Valdez y la Troncal, con incidencias del 20.0, 16.14 y 13.7 por ciento, respectivamente (Cuadro 3), detectada en el 79.14 de los canteros evaluados, en todas las variedades comerciales, con altos niveles en las variedades PR 67-1070, B 76-78, PR 1059, Ragnar y CR 74-250 (Cuadro 4).

La Escaldadura (LSD), aunque presente en los tres ingenios y en la mayoría de variedades comerciales, se encuentra con bajos niveles, en el Ingenio San Carlos, Valdez y la Troncal, con incidencias del 1.51, 1.05 y 1.97 por ciento, respectivamente, con un promedio del 1.5 por ciento. Se detectó en el 32 por ciento de los canteros evaluados. Sólo se determinó alta incidencia en las variedad Azúl Casagrande PR 1059 y NCo 310 (Cuadro 2, 3 y 4). En los canteros que se detectó la bacteria, no se observaron síntomas de la enfermedad, permaneciendo en estado de latencia, por lo que se puede diseminar a variedades susceptibles, al pasar desapercibida, si no se realiza un diagnóstico de laboratorio oportuno.

El virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV), se detectó en el Ingenio San Carlos, Valdez y la Troncal, con incidencias del 44.78, 16.9 y 1.08 por ciento, respectivamente, con un promedio del 26.31 por ciento, detectándose en el 73.82 por ciento de los canteros evaluados. Los mayores niveles de incidencia se observaron en el ingenio San Carlos y Valdez, debido a la existencia de variedades de reciente introducción, como la CR 74-250, PR 67-1070, B 74-132 y B 76-78, las cuales son fuente de inóculo hacia otras variedades como la RAGNAR (Cuadro 2, 3 y 4)

Durante el año 2001 y 2002 se evaluaron los semilleros de los tres ingenios, observándose una disminución de la incidencia del síndrome y la escaldadura, pero un incremento del raquitismo. La disminución de las dos primeras se puede explicar por la selección de semilla sana durante el 2001 y el 2002, mientras que el aumento de la incidencia del raquitismo se puede deber a un mejoramiento de la sensibilidad de la técnica, debido a una mayor concentración de la bacteria, gracias a la centrifugación del jugo. (Cuadro 5). Se esperaría que si se seleccionaron aquellos semilleros con menores niveles de incidencia, para la siembra comercial del 2003 estos niveles disminuyan, para cada una de las enfermedades.

De acuerdo a evaluaciones realizadas en la colección universal, el virus del síndrome de amarillamiento, se encontraba presente en la zona de cultivo desde hace varios años y probablemente fue introducido en semilla infectada con el patógeno. En la variedad CR 74-250 y la PR 67-1070, introducidas desde centro América, se detectaron niveles entre el 96 y 100 por ciento de incidencia, indicando que probablemente la semilla inicial importada, venía infectada, la cual desafortunadamente al no contar con una técnica de diagnóstico en ese momento, pudo escapar a las evaluaciones hechas en el ingenio o que estas variedades son muy susceptibles y en poco tiempo alcanzaron estos niveles de infección. Durante el año 2002 las variedades PR 67-1070 y B 76-78 presentaron incrementos significativos en el nivel de incidencia. En estas dos variedades se ha observado en el campo mayor grado de preferencia del áfido blanco *Melanaphis sacchari*, indicando que probablemente este insecto esté realizando de manera eficiente la diseminación de esta enfermedad, como lo han indicado trabajos realizados en otros países. En los semilleros de la variedad Ragnar los niveles de incidencia pasaron de 7.03 en el 2001 al 10.49 en el 2002.

### **CONCLUSIONES**

- Se confirmó la presencia de la bacteria causante del Raquitismo de la Soca *Leifsonia Clevibacter xili sp xili*, afectando cultivos comerciales en Ecuador, utilizando un antisuero específico para la detección del patógeno.
- La bacteria causante del raquitismo de la soca se encuentra ampliamente diseminada, con altos niveles de incidencia en los tres ingenios y afectando todas las variedades comerciales.
- Se confirmó la presencia de la bacteria causante de la Escaldadura de la hoja *Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson, afectando cultivos comerciales, utilizando un antisuero específico para el patógeno.

- La escaldadura de la hoja se encuentra con bajos niveles de incidencia en cultivos comerciales de caña de azúcar en Ecuador.
- En Ecuador se confirmó la presencia del Síndrome de Amarillamiento (Yellow leaf syndrome, YLS) afectando cultivos comerciales, utilizando un antisuero específico para el patógeno.
- De acuerdo al diagnóstico realizado, el síndrome de amarillamiento, se encuentra distribuido en los tres ingenios, con niveles altos de incidencia especialmente en las variedades de reciente introducción.

### RECOMENDACIONES

- Establecer un proceso de producción de semilla de alta calidad en el cual, se certifique su sanidad y se cuente con criterios fitosanitarios para su selección.
- Establecer semilleros Fundación, a partir de semilla producida mediante el tratamiento combinado de agua caliente, termoterapia y cultivo de meristemas; la cual se certifique con técnicas de diagnóstico molecular.
- Certificar la precisión del tratamiento térmico, mediante la calibración de las cámaras de tratamiento con termómetros certificados, para garantizar la eliminación de las bacterias.
- Sembrar la semilla sana, en lotes que hallan estado en descanso, ya sea en barbecho o sembrados con otro cultivo.
- Hasta contar con semilleros sanos de cada una de las variedades, evitar la siembra de diferentes variedades en un mismo lote, para escapar a la infección de enfermedades como el síndrome de amarillamiento y la escaldadura de la hoja.
- Como se desconoce el efecto que tiene el síndrome de amarillamiento, no se puede descalificar ninguna variedad hasta tener estudios sobre su efecto en la producción. La decisión de multiplicar variedades como la CR 74250, la PR 671070 y la B 7678, es de los ingenios, sin embargo debe considerarse este aspecto, antes de incrementar el área de cultivo.
- En aquellos canteros en los cuales, se presenten disminuciones inexplicables en la producción, sería recomendable realizar un diagnóstico de cada una de las enfermedades, el cual se puede hacer en el laboratorio de fitopatología del CINCAE.
- Toda variedad que sea importada de otro país debe ingresar al sistema cuarentenario de variedades con que cuenta el CINCAE, para evitar introducir nuevos virus y variantes de los existentes.

### AGRADECIMIENTOS

**Al Dr Ben E.L. Lockharth Universidad de Minnesota, a la Microbióloga Maria Luisa Guzmán de CENICAÑA Colombia , COPERSUCAR de Brasil, el CIRAD Francia y a los departamentos de Investigación de los Ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez**

## **BIBLIOGRAFIA**

- GARCES, F.F. y BALLADARES, C.2001. Diagnóstico del virus del síndrome de la hoja amarilla ScYLV en Ecuador. En: Carta Informativa del CINCAE. Año 3. N° 6, Nov-Dic. Centro de Investigación de la Caña de azúcar del Ecuador. p.6-15.
- GUZMAN, M. L. ; VICTORIA, J.I. 2000. Desarrollo de técnicas para el diagnóstico de enfermedades de la caña de azúcar. En: Técnicaña. V Congreso. Memorias. CD
- SHENCK, S.; HU, J.S. y LOCKHART, B.E. (1997). Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. En: Sugar Cane (4): p5-14.

CUADRO 1. Vasos de floema positivos (%) por tipo de hoja, para el diagnóstico del síndrome de amarillamiento

HOJA	VARIEDAD		PROMEDIO
	CR 74250	RAGNAR	
	-3	85,11	
-2	89,64	72,72	81,184abc
-1	91,25	93,67	92,461ab
TVD	92,43	93,40	92,917a
+1	89,92	73,49	81,707abc
+2	90,03	69,16	79,597abc
+3	88,10	65,17	76,636bc

Tukey 5 %  
Corr 0.9483

CUADRO 2. Incidencia y distribución del raquitismo, la escaldadura y el síndrome de amarillamiento, en los canteros comerciales de caña de azúcar de los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez

Enfermedad	Incidencia <sup>4/</sup> (%)		Canteros afectados <sup>5/</sup> (%)
	Promedio	Máxima	
	RSD <sup>1/</sup>	17.24	
ScYLV <sup>2/</sup>	26.31	99.30	73.82
LSD <sup>3/</sup>	1.50	28.50	32.00

1/Raquitismo de la caña de azúcar

2/Virus del síndrome de amarillamiento de la caña de azúcar, ScYLV

3/Escaldadura de la hoja

4/Tallos afectados por hectárea

5/Porcentaje de canteros afectados con la enfermedad

CUADRO 3. Incidencia del raquitismo, la escaldadura y del síndrome de amarillamiento por ingenio

INGENIO		INCIDENCIA(%)		
		RSD <sup>1/</sup>	LSD <sup>2/</sup>	ScYLV <sup>3</sup>
San Carlos	958,44	20,00	1,51	44,78
Valdez	755,30	16,14	1,05	16,90
La Troncal	513,80	13,70	1,97	1,08
	<b>2227,54</b>	<b>17,24</b>	<b>1,50</b>	<b>26,31</b>

1/Raquitismo de la caña de azúcar

2/ Escaldadura de la hoja

3/ Virus del síndrome de amarillamiento de la caña de azúcar

4/Tallos afectados por hectárea

CUADRO 4. Incidencia del raquitismo, la escaldadura y el síndrome de amarillamiento en los ingenios San Carlos, Valdez y La Troncal

VARIEDAD	AREA (has)	INCIDENCIA (%)		
		RSD <sup>1/</sup>	LSD <sup>2/</sup>	ScYLV <sup>3/</sup>
RAGNAR	1374,11	15,16	1,30	8,25
B 7678	306,75	18,37	0,98	28,16
PR 671070	228,25	28,54	1,71	74,64
CR 74250	196,16	14,77	1,97	78,52
PR 1059	46,17	17,48	5,74	0,00
CC 8592	30,51	3,28	0,00	3,13
B 74132	18,46	9,38	0,00	71,38
C 13281	11,50	2,17	2,17	0,00
NC0310	10,54	95,21	5,26	12,20
P C G A	5,08	76,50	16,51	6,60
<b>TOTAL</b>	<b>2227,53</b>	<b>17,24</b>	<b>1,5</b>	<b>26,31</b>

1/Raquitismo de la caña de azúcar

2/Escaldadura de la hoja

3/Síndrome de amarillamiento de la caña de azúcar



CUADRO 5. Incidencia del raquitismo, la escaldadura y el síndrome de amarillamiento en los semilleros temporadas 2001 y 2002

ENFERMEDAD	2001		2002	
	I. Prom. <sup>4/</sup>	I. Max. <sup>5/</sup>	I. Prom.	I. Max.
RSD <sup>1/</sup>	7,10	88,00	19,52	66,66
LSD <sup>2/</sup>	3,00	4,00	1,32	9,52
Sc YLV <sup>3/</sup>	36,43	99,00	26,63	99,00

1/Raquitismo de la caña de azúcar

2/Escaldadura de la hoja

3/Síndrome de amarillamiento de la caña de azúcar

4/Tallos afectados por hectárea, ponderada por el total de área evaluada

5/Incidencia máxima de la enfermedad detectada