



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROCESOS BIOLÓGICOS



Maestría en Ciencias en
Procesos Biológicos

TESIS

**“Evaluación del efecto de la aplicación de métodos criogénicos
sobre el saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar
(Sugarcane Mosaic Virus, SCMV)”**

PRESENTA

Q.I. Manuel Méndez Chávez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Alberto Cruz Cruz

CO-DIRECTOR

Dra. María Teresa González Arnoa

ORIZABA, VER.

MAYO, 2014



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

APARTADO POSTAL 215
PROL. OTE. 6 NO. 1009

CÓDIGO POSTAL 94340
TELS.: (272) 7240120, 7241779
ORIZABA, VER.

JUNIO 2014

AL C.
MANUEL MÉNDEZ CHÁVEZ
Alumno del PROGRAMA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROCESOS BIOLÓGICOS
P R E S E N T E .

Habiendo sido debidamente revisado y aceptado el Trabajo de **TESIS** titulado: **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MÉTODOS CRIOGÉNICOS SOBRE EL SANEAMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (Sugarcane Mosaic Virus, SCMV)"**. y estando de acuerdo el Comité Revisor de que el contenido es y cumple con los requisitos establecidos por el programa para el Examen final, SE AUTORIZA a usted para que proceda con la impresión del citado Trabajo.

I.Q D. ISMAEL ROSALDO MARTÍNEZ
SECRETARIO



Vo. Bo

DRA. MARÍA TERESA GONZÁLEZ ARNAO
COORDINADOR DE LA MCPB

Vo. Bo.

M. EN C. LUIS ALBERTO SANCHEZ BAZÁN
DIRECTOR

Índice General	
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
1. Introducción	2
2. Marco Teórico	4
3. Justificación	12
4. Hipótesis y Objetivos	145
4.1 Hipótesis	145
4.2 Objetivo general	145
4.3 Objetivos Específicos	145
5. Materiales y Métodos	167
5.1 Estrategia Experimental	167
5.2 Material Vegetal	167
5.3 Introducción, cultivo y creación de colecciones de germoplasma <i>in-vitro</i> de caña de azúcar sin la presencia de síntomas del SCMV	178
5.4 Introducción, cultivo y creación de colecciones de germoplasma <i>in-vitro</i> de caña de azúcar con la presencia de síntomas del SCMV	178
5.5 Evaluación de la eficiencia de micropropagación	19
5.6 Detección del virus del mosaico de la caña de azúcar en el material vegetal	19
5.7 Ensayo de crioconservación con material biológico sano	201
5.7.1 curva de secado de las cápsulas de alginato de calcio	201
5.7.2 Ajuste al protocolo de crioconservación para ápices de caña de azúcar	212
5.7.2.1 Disección de los ápices de caña de azúcar	23
5.7.2.2 Precultivo de los ápices después de la disección	23
5.7.2.3 Encapsulación de los tejidos	23
5.7.2.4 Precultivo en medio líquido	23
5.7.2.5 Deseccación	24
5.7.2.6 Congelación y descongelación	24
5.7.6.7 Recultivo	24
5.7.6.8 Evaluación de la sobrevivencia	24
5.8 Protocolo Encapsulación-Vitrificación	245
5.8.1 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 2 sin preacondicionamiento de la vitroplanta madre	245
5.8.2 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 2 con preacondicionamiento de la vitroplanta madre	256
5.8.3 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 3 sin preacondicionamiento de la vitroplanta madre	256

5.8.4	Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 3 con preconditionamiento de la vitroplanta madre	256
5.9	Protocolo Gota-Vitrificación	267
5.9.1	Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 2 sin preconditionamiento de la vitroplanta madre	267
5.9.2	Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 2 con preconditionamiento de la vitroplanta madre	27
5.9.3	Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 3 sin preconditionamiento de la vitroplanta madre	27
5.9.4	Protocolo Gota-vitrificación con solución PVS 3 con preconditionamiento de la vitroplanta madre	28
5.10	Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 2, con y sin preconditionamiento de la vitroplanta con presencia de la enfermedad de mosaico de la caña de azúcar	28
5.11	Análisis estadístico	28
6.	Resultados y discusión	290
6.1	Propagación del material vegetal	290
6.2	Evaluación de la efectividad de diferentes medios de propagación de cultivo <i>in-vitro</i> para caña de azúcar	290
6.3	Determinación fitosanitaria del material biológico	323
6.4	Estudio del proceso de desecación	334
6.5	Protocolo Encapsulación-Deshidratación para ápices de caña de azúcar con y sin preconditionamiento de la vitroplanta donante	345
6.6	Protocolo Encapsulación-Vitrificación para ápices de caña de azúcar con y sin preconditionamiento de la vitroplanta donante	37
6.7	Protocolo Gota-Vitrificación para ápices de caña de azúcar con y sin preconditionamiento de la vitroplanta donante	38
6.8	Evaluación de la técnica de crioconservación Gota-Vitrificación para el saneamiento del virus del mosaico (SCMV) en vitroplantas de caña de azúcar colectadas en campo e introducidas <i>in-vitro</i>	400
6.9	Evaluación de la efectividad de la técnica de crioconservación Gota-Vitrificación para el saneamiento del virus (SCMV)	411
6.9.1	Material preconditionado	432
6.9.2	Material sin preconditionar	413
7.	Conclusiones	46
8.	Perspectivas	47
9.	Bibliografía	49
10.	Anexos	566

Índice de Figuras.

Figura 1 Colección activa de caña de azúcar A). Variedad MEX 69-290 B). Variedad CP 72-2086 C). Variedad CP 72-2086 con la presencia de síntomas de la enfermedad del mosaico. _____ 30

Figura 2 Evaluación de la elongación de la vitroplanta de caña de azúcar (MEX 69-290) en diferentes medios de propagación. _____ 31

Figura 3 Evaluación de la formación de nuevos brotes de caña de azúcar (MEX 69-290) en diferentes medios de propagación. _____ 31

Figura 4 Determinación de la línea de corte (cut off), para el diagnóstico fitosanitario del material biológico. _____ 32

Figura 5 Evaluación fitosanitaria de las muestras colectadas en campo con presencia de síntomas de SCMV e introducidas *in-vitro*. _____ 34

Figura 6 Determinación del porcentaje de humedad en cápsulas de alginato de calcio precultivadas en medio MS líquido. _____ 35

Figura 7 Evaluación del saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar utilizando la técnica de Gota-Vitrificación en material con preacondicionamiento. _____ 44

Figura 8 Evaluación del saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar utilizando la técnica de Gota-Vitrificación en material con preacondicionamiento. _____ 45

Índice de Tablas.

Tabla 1 Aspectos cualitativos para determinar la viabilidad de los ápices _____ 25

Tabla 2 Comparación de la capacidad de formación de brotes entre medio semisólido y medio líquido (inmersión parcial). _____ 31

Tabla 3 Supervivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo Encapsulación-Deshidratación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento. _____ 37

Tabla 4 Supervivencia-Regeneración de plantas provenientes del protocolo Encapsulación-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar, con y sin preacondicionamiento. _____ 39

Tabla 5 Supervivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo de Gota-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento. _____ 40

Tabla 6 Supervivencia y regeneración de plantas infectadas con el SCMV provenientes del protocolo Gota-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento. _____ 41

Evaluación del efecto de la aplicación de métodos criogénicos sobre el saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (Sugarcane Mosaic Virus, SCMV)

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es un cultivo de importancia económica para el estado de Veracruz y México en general. Entre las enfermedades sistémicas, el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), es una de las enfermedades que mayores afectaciones económicas produce, ocasionando daños en la calidad de los cultivos y reducciones significativas en la producción.

La crioterapia de cultivos de meristemos apicales es una técnica usada para la erradicación de patógenos sistémicos de plantas, basada en técnicas de crioconservación, permitiendo la eliminación de patógenos tales como virus, fitoplasmas y bacterias endófitas por medio de una breve exposición de las muestras biológicas a temperaturas de ultra congelación (-196 °C) en nitrógeno líquido.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la aplicación de métodos criogénicos en tejidos meristemáticos sobre el saneamiento del SCMV.

Se propagó masivamente el cultivo *in-vitro* de caña de azúcar variedad MEX 69-290 y CP 72-2086, y se introdujo exitosamente el cultivo *in-vitro* del material colectado en campo (CP 72-2086) con la presencia de síntomas característicos de la enfermedad.

Se realizaron estudios de crioconservación comparando los protocolos de Encapsulación-Deshidratación, Encapsulación-Vitrificación y Gota-Vitrificación con ápices aislados de vitroplantas de caña de azúcar sanas e infectadas, y se evaluó la efectividad de la técnica de crioconservación para el saneamiento del SCMV mediante la prueba inmunoenzimática DAS-ELISA.

Aplicando el protocolo de Gota-Vitrificación, se obtuvo una regeneración de 8.88% de los ápices provenientes de vitroplantas infectadas (CP 722086). Se confirmó por DAS-ELISA el saneamiento del SCMV, desde la primera etapa del protocolo criogénico, con una tendencia significativa en el saneamiento del SCMV conforme se avanza en el protocolo criogénico.

Evaluation of the effect of cryogenic methods on the elimination of Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is an important economic crop for Veracruz state and Mexico. Among systemic diseases, sugarcane mosaic virus (SCMV), is a disease that causes major economic damages and significant production losses.

Cryotherapy of shoot tips is a technique used to eradicate systemic plant pathogens, based on cryopreservation protocols, allowing elimination of pathogens such as viruses, phytoplasmas and endophytic bacteria through brief exposure of biological samples to ultra-low freezing temperature (-196° C) in liquid nitrogen.

In this work, the effect of application of cryogenic methods in meristematic tissues to eliminate SCMV was evaluated.

Healthy sugarcane varieties (CP 72-2086 and MEX 69-290) were *in vitro* propagated and material in the field (CP 72-2086) with the presence of characteristic symptoms of the disease was collected and successfully introduced and multiplied *in-vitro*.

Cryopreservation studies were performed comparing protocols of Encapsulation-Dehydration, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification using meristematic tissues isolated from healthy and infected sugarcane vitroplants. The effectiveness of the cryopreservation technique for sanitation of SCMV was evaluated through immunoenzymatic DAS-ELISA test.

Droplet-Vitrification protocol was the only, which guaranteed survival (8.88%) after cryopreservation of meristematic tissues isolated from infected (CP 72-2086) plants. In addition, sanitation of plant material was confirmed by DAS-ELISA since the first cryoprotective treatment, with subsequently improvements in the sanitation rate along the cryogenic protocol.

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), especie de la familia Poaceae se caracteriza por tener un elevado contenido de sacarosa, está característica la coloca dentro de los cultivos de mayor importancia económica para el estado de Veracruz y México en general.

Al igual que todas las plantas, este cultivo es afectado por una amplia variedad de organismos patógenos, que incluyen hongos, bacterias y virus. Entre las enfermedades virales que mayores afectaciones económicas producen, se encuentra la enfermedad del mosaico, ocasionada por el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV por sus siglas en inglés) que daña la calidad y ocasionan reducciones significativas en el rendimiento de este cultivo.

Actualmente, no existe un producto eficaz para combatir las enfermedades virales y lo único que se puede hacer es prevenirlas. Por tal motivo, la obtención de material vegetal libre de patógenos es fundamental para el incremento de la productividad de los cultivos agrícolas, hortícolas y ornamentales.

Por lo anterior, se pretende introducir por primera vez la crioterapia en México como una nueva estrategia biotecnológica para la conservación y el saneamiento de especies vegetales. La crioterapia de cultivos de meristemos apicales es una técnica que ha permitido la eliminación de patógenos tales como virus, fitoplasmas y bacterias por medio de una breve exposición de las muestras biológicas a temperaturas de ultra congelación (-196 °C) con nitrógeno líquido.

En la presente propuesta, se llevó a cabo el estudio de la eficiencia del saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) por la aplicación de métodos criogénicos en tejidos meristemáticos.

2. MARCO TEÓRICO

2. Marco Teórico

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es fundamental en la alimentación humana, se encuentra entre los cultivos agroindustriales ampliamente distribuidos en el mundo. En México es uno de los cultivos de importancia económica. En el estado de Veracruz se cultivan anualmente, en promedio, 253 miles de hectáreas lo que representa el 36.7% del total nacional [1].

El cultivo de la caña de azúcar es atacado a lo largo de su ciclo vegetativo por numerosas plagas, insectos y roedores, así como de enfermedades producidas por una amplia variedad de organismos patógenos, que incluyen hongos, bacterias, virus, viroides y fitoplasmas, que provocan una disminución en la productividad del cultivo [2].

Estas enfermedades pueden ser de dos tipos, localizadas y sistémicas. La de tipo localizada es cuando se desarrolla en el lugar donde se produjo la penetración y colonización del organismo causal y la de tipo sistémica, es cuando se encuentra generalizada en toda la planta independientemente del lugar de penetración del patógeno.

Dentro de los patógenos que producen enfermedades sistémicas se encuentran bacterias endófitas, virus y fitoplasmas [3, 4, 5] y son particularmente problemáticos en las especies propagadas vegetativamente, debido a que se transmiten de generación en generación en el material plantado [3, 6, 7]; por lo que la obtención y mantenimiento de plantas libres de patógenos, es fundamental para el control de enfermedades sistémicas [8, 9, 10] y el incremento de la productividad agrícola [7].

Entre las enfermedades sistémicas provocadas por virus que mayores afectaciones económicas produce al cultivo de caña de azúcar, se encuentra la enfermedad del mosaico, ocasionada por el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV, género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) que daña la calidad y ocasiona reducciones significativas en el rendimiento de este cultivo [4, 5, 11].

La enfermedad del mosaico de la caña de azúcar es causada por lo menos por 14 cepas (designadas de la “A” a la “N”) del SCMV, las cuales difieren en su rango de hospedantes, en el daño ocasionado y en su distribución en el mundo. La enfermedad se caracteriza por

producir decoloraciones en la lámina foliar, donde se observan zonas de color verde normal alternando con áreas verde pálido o amarillento [5].

Hoy en día no existe un producto químico eficaz para combatir a los patógenos sistémicos presentes en los cultivos vegetales y lo único que se realiza es el uso de técnicas específicas para la prevención de ellos. Por lo tanto, es muy importante obtener material libre de patógenos para el incremento de la producción de los cultivos agrícolas, hortícolas, ornamentales e inclusive el intercambio del germoplasma vegetal [7, 12, 13].

La micropropagación mediante el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, permite la multiplicación clonal masiva y rápida de plantas, pero no asegura que el material se encuentre libre de agentes patógenos sistémicos como los virus, los cuales pueden estar presentes en el tejido sin manifestar sintomatología y diseminarse durante el proceso de propagación *in-vitro*. Entre las técnicas de cultivo *in-vitro*, el cultivo de meristemas es la empleada para la erradicación de virus de muchas especies de propagación vegetativa [14, 9].

Esto se fundamenta en que la distribución de los virus no es uniforme y que su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el meristemo apical del tallo, donde las células se encuentran en constante y rápida división [15, 16]; por lo tanto, la disección y regeneración de meristemas muy pequeños que incluyan únicamente el domo meristemático con 2 o 3 primordios foliares, pueden contribuir a la obtención de plantas libres de patógenos, pero es conocido que la capacidad de regeneración de los tejidos *in-vitro* es inversamente proporcional a su tamaño, por consiguiente, mientras más pequeños sean los meristemas, más complicado y difícil será lograr su correcto desarrollo.

Si la eliminación del patógeno es más efectiva mientras más pequeño se aíslan los meristemas (0.2-0.4 mm), esto implicará que el saneamiento por esta técnica tendrá que enfrentar dos retos: primeramente, el de adquirir la habilidad para realizar una operación de disección tan complicada que demanda la participación de personal muy especializado y bien entrenado, por otra parte, el asegurar la sobrevivencia y la regeneración de nuevos brotes a partir de estos meristemas apicales. [16].

A partir de 1997, se comenzó a explorar la posibilidad de aplicar las técnicas de criopreservación para la eliminación de fitopatógenos y fue hasta el año 2006, que esta nueva estrategia denominada crioterapia emergió para el saneamiento de plantas [17, 18]. La crioterapia, permite eliminar virus, fitoplasmas y bacterias por medio de una exposición del material biológico a la ultra baja temperatura del nitrógeno líquido (-196°C).

La crioterapia es una alternativa novedosa para la erradicación de fitopatógenos sistémicos, que se basa en el uso de las técnicas de criopreservación de tejidos meristemáticos. Los tejidos meristemáticos que sobreviven a la criopreservación, regeneran nuevas plantas libres de patógenos y con esta metodología se pueden manipular un gran número de muestras simultáneamente y principalmente el saneamiento resulta independiente al tamaño de los meristemos apicales utilizados. [16, 19, 20, 18, 21, 22 a y b, 23, 24, 25].

Durante la criopreservación, al almacenar el germoplasma vegetal a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C), se logra la detención total de los procesos metabólicos y fisiológicos por el efecto de la ultra baja temperatura [12]. De esta forma, el material mantenido bajo condiciones criogénicas puede permanecer conservado durante muchos años, con la garantía de preservar la máxima estabilidad en sus características fenotípicas y genotípicas [26, 27, 23, 25, 28]. La criopreservación constituye en la actualidad la estrategia biotecnológica de conservación *in-vitro* a largo plazo, más segura para resguardar el germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente como la caña de azúcar, o de aquellas que producen semillas recalcitrantes [12, 13]; además, representa una alternativa para conservar *ex-situ* las especies amenazadas o en peligro de extinción. [29].

Las técnicas criogénicas se han aplicado exitosamente a un gran número de especies vegetales incluyendo plantas herbáceas y maderables, usando meristemos apicales, cultivo de células, embriones y semillas [30, 31, 32, 33].

Para el almacenamiento prolongado de los recursos genéticos de plantas con propagación vegetativa, las estructuras organizadas como los embriones, los ápices o los meristemos, son los candidatos preferidos sobre las estructuras que presentan un crecimiento indiferenciado (callos y suspensiones celulares); debido a que los primeros son genéticamente más estables [32, 12], más fáciles de manejar, están disponibles en cualquier

época del año y se considera que son relativamente dóciles para lograr la regeneración directa de plantas [33].

Un paso crítico para la criopreservación de cualquier material biológico, es el proceso de deshidratación de las células antes de su exposición a las temperaturas de ultra congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido. De lo contrario, la cristalización intracelular del agua, dañaría lentamente el tejido debido a la destrucción de las estructuras membranales [34]. Por lo tanto, para el éxito de un proceso criogénico, se deben inducir mecanismo de tolerancia y/o establecer artificialmente condiciones crioprotectoras, que contribuyan a inhibir la formación del hielo en el interior de la células [23].

Las técnicas criogénicas denominadas clásicas, producen la deshidratación del material biológico utilizando un régimen de enfriamiento lento hasta una temperatura de pre-congelamiento, seguido por la inmersión rápida en nitrógeno líquido [35, 36]. Las técnicas criogénicas más modernas, provocan la deshidratación mediante el uso de mezclas crioprotectoras preestablecidas a muy altas concentraciones, combinan la deshidratación osmótica con la utilización de agentes desecantes como el gel de sílice y también pueden contemplar la encapsulación de los tejidos en una matriz de alginato de calcio. Estas técnicas se basan en el evento termofísico conocido como vitrificación, el cual se refiere a la transición del agua directamente de la fase líquida a una fase amorfa o de formación de un sólido amorfo [37].

En los diferentes procedimientos basados en la vitrificación, las metodologías de Encapsulación-Deshidratación, de Vitrificación y el procedimiento derivado de esta última, conocido como Gota-Vitrificación [38], son las que más destacan.

La metodología criogénica de Encapsulación-Deshidratación se fundamenta en la tecnología para la producción de semillas artificiales. Los explantes son encapsulados en esferas de alginato de calcio, precultivadas en medio líquido enriquecido con sacarosa de uno a siete días, parcialmente desecados mediante la exposición al gel de sílice y posteriormente, inmersos en nitrógeno líquido contenido en crioviales [39]. Para la recuperación de los tejidos después de la criopreservación, las muestras encapsuladas se colocan sobre medio de cultivo y por lo general, no se requiere de su extracción de las

cápsulas, para inducir el proceso de regeneración de nuevas plantas [28, 32, 39, 40, 41, 42, 43].

La técnica denominada Vitrificación, involucra diferentes tratamientos con mezclas crioprotectoras que promueven la máxima deshidratación cuando el material biológico es expuesto a las soluciones vitrificadoras clasificadas como PVS (por sus siglas en inglés) y que son soluciones compuestas por la combinación de osmolitos a concentraciones muy elevadas de glicerol, sacarosa, entre otros [44]. Posterior al tratamiento con la PVS, las muestras son sometidas al enfriamiento rápido y después de la crioconservación, se realiza la elevación de la temperatura rápidamente, la remoción de los crioprotectores y la recuperación de los tejidos en el medio de cultivo apropiado [25, 32, 38, 40,41, 45].

De la técnica descrita anteriormente, se deriva la técnica denominada Encapsulación-Vitrificación la cual combina la técnica de la creación de semilla artificial, donde los tejidos se encapsulan en una matriz de alginato de calcio y se deshidratan por acción de las soluciones crioprotectoras [38].

Los protocolos basados en la vitrificación tales como la técnica Gota-Vitrificación, incluyen la combinación de un tratamiento de carga seguido por la exposición a soluciones vitrificadoras antes del enfriamiento. La técnica Gota-Vitrificación se caracteriza por sus tasas ultrarrápidas de congelación y descongelación comparadas con otras metodologías igualmente basadas en el evento de la vitrificación. Esto se logra al emplear pequeños volúmenes de solución vitrificadora para congelar los tejidos colocados sobre láminas de papel aluminio que es un material de gran conductividad térmica. [37]

Actualmente, diversos patógenos de bananas (*Musa spp.*) [19], cítricos (*Citrus spp.*) [24], uva (*Vitis vinifera*) [20], ciruela (*Prunus spp.*) [18], frambuesa (*Rubus idaeus*) [21], papa (*Solanum tuberosum*) [18] y camote (*Ipomoea batatas*) [22 a, b, 25], han sido exitosamente erradicados. Estos patógenos incluyen nueve virus de siete grupos no relacionados, fitoplasmas y dos tipos de bacterias [16, 23].

De esta forma, va emergiendo una nueva utilidad de la crioconservación de germoplasma vegetal denominada estratégicamente crioterapia. Esto implica las oportunidades para

combatir ciertos organismos dañinos a las plantas y aporta otros métodos biotecnológicos con el valor agregado de que sirven para conservar la biodiversidad y ofrecen garantías para el saneamiento.

El primer reporte de saneamiento en caña de azúcar lo realizaron Hendre *et al.* (1975) [46] y obtuvieron un 90% de plantas libres del virus del mosaico a través de la regeneración directa de cultivos meristemáticos. Aunque es difícil la regeneración de explantes menores a 0.5 mm de longitud; Chatenet *et al.* (2001) [11] reportaron la erradicación del Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) entre un 80-100%, utilizando también el cultivo de meristemas apicales y Ramgareeb *et al.*, (2010) [47] con la misma estrategia lograron la obtención de plantas libres de ScYLV y SCMV por el cultivo de meristemas con un tamaño inicial de 0.2-0.5 mm.

Otros reportes, menos exitosos (12-94% de plantas libres de patógenos) incluyen la multiplicación directa [48] e indirecta [49, 50] a partir de discos de hojas inmaduras. La embriogénesis directa de muestras foliares descrita por Snyman *et al.* (2007), [51] mostró la erradicación del 100% de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) y ScYLV; así mismo, Parmessur *et al.* (2002), [52] obtuvieron los mismos niveles de eliminación de ScYLV y Sugarcane Yellow Phytoblastoma en 19 cultivares de caña de azúcar por embriogénesis indirecta.

La crioconservación de la caña de azúcar por medio de la técnica de Encapsulación-Deshidratación ya ha sido reportada [54, 39], y por lo tanto, puede ser un método promisorio para la erradicación de patógenos por crioterapia independientemente del tamaño del tejido meristemático utilizado.

Las técnicas para el diagnóstico de fitopatógenos de tipo sistémico, están ampliamente desarrolladas y han obtenido eficacia, confiabilidad y sensibilidad, aspectos básicos que caracterizan un verdadero diagnóstico y que han permitido el esclarecimiento de la etiología de nuevas enfermedades, las cuales han facilitado la determinación de patógenos exóticos y han asegurado el estado fitosanitario de productos agrícolas destinados al comercio, que cada día establece requerimientos más exigentes y limitantes.

En general, la adopción de una u otra técnica está dada por la complejidad y características de los patógenos, reflejados en los nuevos conocimientos aportados por los científicos en los sistemas taxonómicos [53].

La validación en la efectividad de un método de saneamiento independientemente del procedimiento utilizado (cultivo de meristemos, termo, quimio o crioterapia), normalmente es evaluada por medio de ensayos inmunoenzimáticos, como la prueba de ELISA y/o a través de la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), las cuales constituyen el eslabón final de la cadena de certificación del estatus fitosanitario del material tratado.

La prueba de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por lo tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar con la enzima producirá un color que se observará a simple vista o será cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. En la variante DAS-ELISA, se aplica un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Por lo tanto, cada molécula del antígeno estará unida a un anticuerpo y a un segundo anticuerpo, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de la señal que permite el segundo anticuerpo [54].

La RT-PCR es una variante de la técnica PCR, esta última utiliza ácido desoxirribonucleico (ADN), que con una enzima denominada ADN polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfatados y los cebadores, además de una solución amortiguadora, amplificarán una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN específico, sin embargo; en la RT-PCR una cadena de ácido ribonucleico (ARN) es retrotranscrita en ADN complementario (ADN_c) usando una la enzima transcriptasa reversa, finalmente el ADN_c se amplifica en una PCR normal [58].

3. JUSTIFICACIÓN

3. Justificación

Las enfermedades vegetales constituyen la causa de mayor restricción a nivel mundial en la producción de los cultivos de importancia económica y alimentaria. Los patógenos sistémicos como los virus son particularmente problemáticos en las especies propagadas vegetativamente como la caña de azúcar, debido a que se transmiten de generación en generación en el material plantado [3, 6, 7].

Por lo anterior, la obtención y mantenimiento de material vegetal libre de patógenos, es fundamental para el control de enfermedades sistémicas además del incremento de la productividad agrícola [8, 9, 10, 7].

Entre las enfermedades sistémicas, el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), es una de las enfermedades que mayores afectaciones económicas producen al cultivo, ocasionando daños en la calidad del producto y reducciones significativas en la producción. [4, 5].

La crioterapia ofrece una herramienta novedosa para la eliminación potencial de patógenos con una alta frecuencia, permite el tratamiento de un gran número de muestras en espacios pequeños y ofrece diversas ventajas sobre los métodos tradicionales de erradicación de patógenos [17, 19, 20, 18, 21, 22 a-b, 24, 23, 25]. Adicionalmente, la crioterapia ofrece el intercambio nacional e internacional de germoplasma, bajo la confirmación de un estatus fitosanitario libre de agentes patogénicos [25] y puede ser simultáneamente utilizada para la crioconservación de la biodiversidad de los recursos genéticos [18].

Por otra parte, la crioconservación de la caña de azúcar ya ha sido reportada [52, 39]. Sin embargo, actualmente no se ha evaluado ninguna técnica criogénica para la erradicación de patógenos sistémicos en caña de azúcar.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. Hipótesis y Objetivos

4.1 Hipótesis

El efecto de la aplicación de métodos criogénicos en tejidos meristemáticos de caña de azúcar erradicará de manera efectiva la enfermedad de tipo sistémico producida por el virus del mosaico de la caña de azúcar.

4.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de métodos criogénicos en tejidos meristemáticos sobre el saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (Sugarcane Mosaic Virus, SCMV).

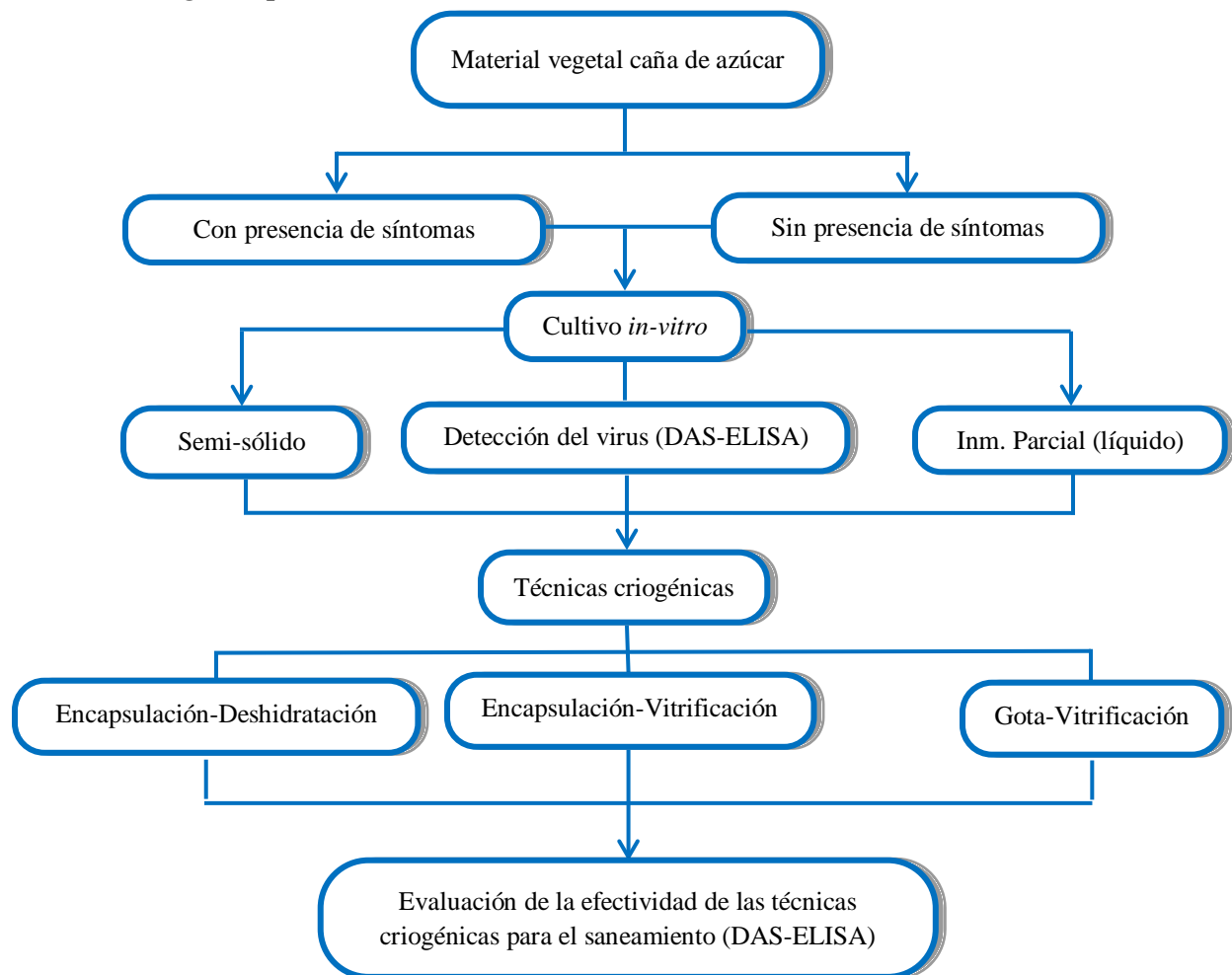
4.3 Objetivos Específicos

- ✓ Introducir y establecer colecciones activas *in-vitro* de plantas de caña de azúcar con y sin la presencia de síntomas de la enfermedad del virus del mosaico de la caña de azúcar.
- ✓ Diagnosticar el estado fitosanitario de las colecciones introducidas *in-vitro* por el método DAS-ELISA.
- ✓ Evaluar la efectividad de diferentes métodos de propagación de cultivo *in-vitro* para caña de azúcar.
- ✓ Realizar estudios de crioconservación comparando los protocolos de Encapsulación-Deshidratación, Encapsulación-Vitrificación y Gota-Vitrificación con ápices aislados de vitroplantas de caña de azúcar sanas e infectadas.
- ✓ Evaluar la efectividad de la técnica de crioconservación para el saneamiento del virus (SCMV) por la DAS-ELISA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. Materiales y Métodos

5.1 Estrategia Experimental



El presente trabajo de investigación se realizó en el LADISER (Laboratorio de Docencia, Investigación y Servicios) Biotecnología y Criobiología Vegetal de la Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Veracruz.

5.2 Material Vegetal

Vitroplantas de caña de azúcar de las variedades MEX 69-290 y CP 72-2086 fueron proporcionadas por el Dr. Jericó Jabín Bello [Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz]. Este material se propagó masivamente para ser utilizado en los ensayos y evaluación de los protocolos de crioconservación con material biológico sano.

Así mismo, se colectaron muestras de material con presencia de los síntomas característicos de la enfermedad viral del mosaico (manchas y anillos cloróticos, que provocan a menudo hojas deformes) de la variedad CP 72-2086 provenientes de plantaciones experimentales del Ingenio la Constancia del municipio de Tezonapa, Veracruz, con el consentimiento del Q.A. Jesús Guerrero López (Grupo Beta San Miguel).

5.3 Introducción, cultivo y creación de colecciones de germoplasma in-vitro de caña de azúcar sin la presencia de síntomas del SCMV

Las vitroplantas de caña de azúcar variedad MEX 69-290 y CP 72-2086 sin la presencia de síntomas del SCMV fueron propagadas inicialmente en el medio de cultivo Murashige y Skoog [56] semisólido, suplementado con $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 6-bencil amino purina (BAP), $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina (KIN), $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indolacético (AIA), $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.7 y fue solidificado con $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fitagel y esterilizado a 121°C durante 15 minutos en una autoclave vertical. El material vegetal se incubó en condiciones de fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y una intensidad lumínica de $68 \mu\text{mol m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes blancas.

Adicionalmente, se escaló la propagación del material vegetal para la obtención de biomasa y determinar la efectividad de dos técnicas de propagación: en medio MS semisólido y en medio líquido (inmersión parcial) utilizando frascos de 250 ml con 30 ml de medio semisólido y para el caso del MS líquido en inmersión parcial, solo se adicionaron 15 ml de medio en cada frasco de 250 ml para evitar un ahogamiento de la vitroplanta.

5.4 Introducción, cultivo y creación de colecciones de germoplasma in-vitro de caña de azúcar con la presencia de síntomas del SCMV

A las muestras sintomáticas colectadas de las plantaciones experimentales del ingenio Constancia del Municipio de Tezonapa, Veracruz, se les retiraron las hojas más superficiales hasta obtener esquejes de aproximadamente 1 cm de ancho por 5 cm de alto, los cuales se desinfectaron con etanol absoluto por 1 min y fueron trasferidos a papel aluminio para la ignición del disolvente por alrededor de 20-30 segundos. Posteriormente, se realizó una siguiente remoción de hojas bajos condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, para finalmente obtener explantes de 2 cm de alto por 0,5 cm de ancho.

Los explantes previamente desinfectados se cultivaron en el medio semisólido MS, suplementado con 0.1 mg·L⁻¹ de 6-bencil amino purina (BAP), 1 mg·L⁻¹ de cinetina (KIN), 0.5 mg·L⁻¹ de ácido indolacético (AIA), 20 g·L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.7 y fue solidificado con 2 g·L⁻¹ de fitagel y esterilizado a 121°C durante 15 minutos en una autoclave vertical. El material vegetal se incubó en condiciones de fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) a una temperatura de 26 ± 2°C y una intensidad lumínica de 68 μmol m²·s⁻¹ [57, 39].

La propagación del material regenerado se realizó por el método tradicional (medio semisólido) y por inmersión parcial en medio líquido con subcultivos periódicos en medio fresco aproximadamente cada 20 días.

5.5 Evaluación de la eficiencia de micropropagación

Para establecer la eficiencia de la técnica de micropropagación en medio MS semisólido e inmersión parcial (medio líquido), se determinó la Capacidad Formadora de Brotes (CFB) (Formula 1), tomando como parámetros el promedio de brotes por explante y el porcentaje de los explantes que presentan brotes.

$$CFB = \frac{(\text{Promedio de brotes por explante})(\% \text{ de explantes con brotes})}{100}$$

Fórmula 1. Determinación de la Capacidad de formación de brotes.

5.6 Detección del virus del mosaico de la caña de azúcar en el material vegetal

La presencia y/o ausencia del virus SCMV en las colecciones de germoplasma *in-vitro* de caña de azúcar (sintomático y asintomático) se determinó mediante la prueba inmunoenzimática comercial “doble anticuerpo sándwich” (DAS-ELISA, Alkaline phosphatase label) siguiendo las instrucciones del fabricante (Agdia®). Esta prueba se realizó en el LADISER de Inmunología y Biología Molecular adscrito a la Universidad Veracruzana, bajo la dirección del Dr. Ángel Ramos Ligonio.

Brevemente, se preparó una caja húmeda en un recipiente hermético alineando toallas de papel humedecidas con agua destilada. Tomando en cuenta el número de muestras, se preparó al momento, el anticuerpo de captura diluyendo apropiadamente con el

amortiguador de recubrimiento de carbonatos incluido en el kit comercial. Posteriormente se añadieron 100 µl de la solución (anticuerpo de captura preparado) en cada pozo individual de una placa de ELISA y se incubó por cuatro horas a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación, se vació la placa por completo y se lavó (2x) adicionando a cada pozo amortiguador de lavado PBST (fosfatos), con el fin de quitar las uniones no específicas que pudieron haberse hecho y sellar los sitios de unión, finalmente a la placa se le retiró el exceso del amortiguador de fosfatos con una toalla de papel.

Adicionalmente, con la ayuda de un mortero con pistilo, se realizó la extracción de las hojas de las vitroplantas a evaluar con el amortiguador general de extracción del kit comercial, en una relación 1:10 (peso en g del material biológico : volumen del amortiguador en ml), el extracto fue etiquetado y almacenado a una temperatura de -4°C hasta su evaluación.

Posteriormente, a la placa de ELISA, se le adicionaron 100 µl de cada extracto a evaluar, 100 µl del control positivo incluido en el kit comercial (liofilizado del tejido vegetal positivo al virus) y 100 µl del amortiguador general de extracción como blanco. Cada muestra se depositó por duplicado, y se incubó la placa de ELISA con las muestras en la cámara húmeda a temperatura ambiente por 2 horas. Pasado el tiempo de incubación de la muestra con el anticuerpo, se removió el contenido de la placa y se lavó con el amortiguador de lavado (7x), teniendo cuidado de asegurarse que entre cada lavado quedara perfectamente seca la placa, al final la caja se escurrió sobre una toalla de papel. Inmediatamente después, se depositaron 100 µl de la solución de enzima conjugada fosfatasa alcalina (preparada 15 minutos antes de ser utilizada) en cada pozo y se incubó en la cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.

Posterior al tiempo de incubación, se removió el contenido de la placa por completo y se le adicionó el amortiguador de lavado (8x) se tuvo cuidado de que no hubiera presencia de burbujas y se dejó escurrir la placa de ELISA sobre una toalla de papel. Al finalizar los lavados, se adicionaron 100 µl del sustrato para desarrollar color (p-nitrofenil fosfato, PNP) a cada pozo y se incubó dentro de la cámara húmeda por 60 minutos en la obscuridad.

Finalmente, después de haber supervisado que los pozos de la placa no presentaran burbujas, se tomaron lecturas de absorbancia de las muestras a 415 nm en un Multiskan EX, Thermo Electron Corporation. Los resultados fueron válidos solo si, los controles positivos desarrollaron color y los controles negativos (muestras asintomáticas) y blancos (amortiguador) no desarrollaron color.

Las absorbancias obtenidas de los controles negativos se tomaron en cuenta para sacar la línea de corte (Cut Off) con la cual se determina si las muestras analizadas se pueden considerar positivas o no, utilizando la siguiente fórmula.

$$Cut\ off = P + 3 (SD)$$

Fórmula 2. Determinación de la línea de corte, para el diagnóstico fitosanitario del material biológico

Donde P= promedio de los controles SD=desviación estándar

5.7 Ensayo de crioconservación con material biológico sano

Para llevar a cabo el protocolo de Encapsulación-Deshidratación descrito por González-Arnao *et al.*, (1993) para caña de azúcar, primero fue necesario determinar una curva de secado para las cápsulas de alginato de calcio.

5.7.1 curva de secado de las cápsulas de alginato de calcio

Se preparó una solución de alginato de sodio, de baja viscosidad (SIGMA) al 3% (w/v) en la composición base del medio de cultivo MS libre de calcio. Para la homogenización de la solución de alginato, esta se colocó en agitación constante, con ayuda de un agitador magnético. En completa disolución del alginato, se obtuvo una solución viscosa sin la presencia de grumos y totalmente transparente, se ajustó el pH a 5.7 y se esterilizó en una autoclave manual de tipo vertical a 121°C (1 lb/cm²) por 15 minutos; teniendo cuidado extremo con la precisión del tiempo de esterilizado para evitar la desnaturalización del alginato. El agua que se utilizó para la preparación de la solución de alginato se acidificó previamente con aproximadamente 4 gotas de una solución de HCl 1N, con el objetivo de evitar la formación de un polímero al momento de ajustar el pH.

Para establecer el porcentaje de humedad dentro de las cápsulas de alginato de calcio, las cuales fueron obtenidas con una punta de micropipeta (1000 µl de capacidad) recortada en el extremo con un diámetro aproximado de 4-5 mm.

Las cápsulas fueron precultivadas en medio líquido MS suplementado con sacarosa (0.75M) a temperatura ambiente y se mantuvieron en agitación constante a 190 rpm, en un agitador orbital (SCORPION SCIENTIFIC), en diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4 y 5 días).

Por lo cual, se realizaron cinco curvas de secado, el porcentaje de humedad se determinó por diferencia de peso el cual se registró cada hora hasta completar un periodo de ocho horas, en lotes de diez cápsulas que fueron sometidas a un tratamiento de desecación utilizando 435 g de gel de sílice, contenida en frascos de cristal marca FIDO con tapa de sellado hermético con una capacidad de 500 ml.

De esta manera, se determinó el porcentaje de humedad ideal (entre 20 y 22%) para llevar a cabo la crioconservación de los tejidos vegetales. Una vez registrado el peso fresco de las cápsulas, estas fueron deshidratadas por 24 horas utilizando una estufa de secado con una temperatura entre 95-100°C para determinar el peso seco y así calcular el porcentaje de humedad en las cápsulas utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso } h_x - \text{Peso seco}}{\text{Peso } h_x} \times 100$$

Fórmula 3 Determinación del porcentaje de humedad de las cápsulas de alginato de calcio

En donde: Peso h_x = Peso de las cápsulas después del tiempo de deshidratación

Peso seco = Deshidratación completa (por la acción de temperatura de la estufa) por (24 hr).

5.7.2 Ajuste al protocolo de crioconservación para ápices de caña de azúcar

Una vez que se estableció la propagación masiva y se contaban con suficientes plántulas de caña de azúcar variedad MEX 69-290 sin síntomas de la enfermedad del mosaico, se tomaron aproximadamente 100 plántulas donantes para ensayar el protocolo de

Encapsulación-Deshidratación reportado para ápices de caña de azúcar, de acuerdo a lo descrito por González-Arno *et al.*, (1993).

5.7.2.1 Disección de los ápices de caña de azúcar

Se aislaron ápices de plantas *in-vitro*, (variedad MEX 69-290) de aproximadamente 3-4 mm de longitud, pertenecientes a la colección activa creada en el Laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Químicas perteneciente a la Universidad Veracruzana, con 2-3 semanas después del último sub-cultivo en el medio de propagación estándar.

La disección de los ápices se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico marca WESTOBER-SCIENTIFIC, el cual se colocó dentro de una campana con flujo laminar vertical para trabajar en condiciones asépticas.

5.7.2.2 Precultivo de los ápices después de la disección

Una vez extraídos los ápices, se precultivaron en medio de composición estándar MS semisólido suplementado con 0.3M de sacarosa por espacio de 24 horas, tiempo en el cual fueron examinados, y aquellos que presentaron una coloración verde se seleccionaron, para los experimentos de crioconservación.

5.7.2.3 Encapsulación de los tejidos

Para llevar a cabo la encapsulación, los ápices se depositaron con la ayuda de un bisturí en la solución de alginato de sodio y se succionaron con una pipeta semiautomática de 1000 μ L usando una punta recortada en el extremo de un diámetro aproximado de 4-5 mm.

La formación de las cápsulas se logró colocando gotas de solución de alginato con los ápices sobre una solución de cloruro de calcio 0.1 M en la que estuvieron por un lapso de 20 minutos después de que fue depositada la última gota.

5.7.2.4 Precultivo en medio líquido

Los ápices encapsulados fueron transferidos con ayuda de unas pinzas estériles a matraces Erlenmeyer de 150 ml, los cuales contenían medio de composición estándar MS líquido suplementado con 0.75M de sacarosa, y se mantuvieron precultivados de uno a cinco días

en agitación constante a 190 rpm a temperatura ambiente, en un agitador orbital marca SCORPION-SCIENTIFIC.

5.7.2.5 Desecación

Pasado el tiempo de precultivo, las cápsulas con los tejidos fueron retirados del medio líquido y se secaron superficialmente para remover el exceso de humedad remanente con ayuda de papel filtro estéril. Lotes de 10 cápsulas con tejido y 10 cápsulas vacías en las mismas condiciones de precultivo (en cuanto a tiempo y concentración de sacarosa) fueron sometidas a una desecación física en frascos de cristal marca FIDO con sellado hermético y una capacidad de 500 ml los cuales contenían 435 g de sílica gel, las cápsulas con tejidos vegetal se mantuvieron por cinco horas para alcanzar un contenido de humedad alrededor de 20-22%.

5.7.2.6 Congelación y descongelación

Después de la deshidratación de las cápsulas, se transfirieron a crioviales de 2 mL, en relación de diez cápsulas por criovial, que fueron sometidos a la inmersión rápida en nitrógeno líquido (-196°C) por espacio de 30 minutos.

Transcurrido el tiempo de congelación, las cápsulas fueron extraídas de los crioviales, que fueron transferidas a una caja Petri estéril, finalmente las cápsulas fueron expuestas al flujo laminar de la campana por espacio de 2-3 minutos para su descongelación.




5.7.2.7 Recultivo

Después de descongelar las cápsulas, éstas fueron transferidas a medio MS semisólido y colocadas en completa oscuridad durante 15 días antes de su transferencia a las condiciones de fotoperiodo establecidas para los cultivos.

5.7.2.8 Evaluación de la sobrevivencia

La sobrevivencia y regeneración de nuevos brotes a partir de los ápices crioconservados, se evaluó a los 45 días después de haber sido expuestas a las condiciones del fotoperiodo. Se consideraron aspectos cualitativos referentes a la coloración de los ápices (tabla 1). Con respecto al desarrollo de los explantes, se consideraron sobrevivientes todos aquellos que desarrollaron planta a partir del ápice crioconservado.

Tabla 1. Aspectos cualitativos para determinar la viabilidad de los ápices

Coloración	Criterio de sobrevivencia de los ápices
	Puntas apicales verdes o verde-amarillento se consideran viables.
	Puntas apicales blancas son el resultado de la muerte inmediata del tejido.
	Puntas apicales completa o parcialmente negras, indican que hubo una reacción enzimática después de la criopreservación (producción y oxidación de polifenoles) y pueden considerarse potencialmente vivos.

Paralelamente, se hizo un pre-acondicionamiento de la vitroplanta en medio MS semi-sólido suplementado con 0.3M de sacarosa por 7 días, con el objetivo de generar sobrevivencia y regeneración de nuevas plantas a partir del material criopreservado; una vez transcurrido el tiempo de pre-acondicionamiento, se extrajeron los ápices y se procedió con el protocolo de criopreservación descrito anteriormente.

5.8 Protocolo Encapsulación-Vitrificación

5.8.1 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 2 sin preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Se aislaron ápices de plantas donantes (variedad MEX 69-290) sin síntomas de la enfermedad, pertenecientes a la colección activa creada en el laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal, se transfirieron a medio MS suplementado con 0.3M de sacarosa por espacio de 1 día. Posteriormente, los ápices son, encapsulados como se describió anteriormente. Los ápices fueron sometidos a un tratamiento de carga con una solución de 2M de glicerol y 0.4M de sacarosa por espacio de 20-30 minutos. Seguidamente los ápices encapsulados fueron sometidos a la solución vitrificadora PVS 2 la cual está compuesta por glicerol 30% (v/v), etilenglicol 15% (v/v), dimetilsulfoxido (DMSO) 15% (v/v), en medio MS suplementado con 0.4M de sacarosa por espacio de 15 minutos. Los ápices encapsulados se introducen en un criovial con aproximadamente 2 mL de solución PVS 2

los cuales son sumergidos rápidamente en nitrógeno líquido y mantenidos por un periodo de 30 minutos. Posteriormente de la congelación, se procede a una descongelación rápida en baño maría manteniendo a 35°C y después son transferidos a una solución de lavado (1.2 M de sacarosa) por 15 minutos, para ser transferidos a medio MS normal de recuperación.

5.8.2 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 2 con preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Las plantas donantes pertenecientes a la colección activa creada en el laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal, fueron pre-acondicionadas durante siete días en medio MS suplementado con 0.3M de sacarosa, y sometidos al protocolo anteriormente descrito.

5.8.3 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 3 sin preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Se aislaron ápices de plantas donantes (variedad MEX 69-290, sin síntomas de la enfermedad) pertenecientes a la colección activa creada en el laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal. Los ápices se transfieren a medio MS suplementado con 0.3M de sacarosa por 24 h. Posteriormente, los ápices fueron encapsulados como se describió anteriormente. Los ápices fueron sometidos a un tratamiento de carga con una solución 2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa por espacio de 20-30 minutos. Seguidamente, los ápices encapsulados se sometieron a la solución vitrificadora PVS 3 la cual está compuesta de glicerol 50% (p/p) y sacarosa 50% (p/p), en medio MS suplementado con 0.4 M de sacarosa por espacio de 15 minutos y se continuó con el protocolo descrito anteriormente.

5.8.4 Protocolo Encapsulación-Vitrificación con solución PVS 3 con preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Las vitroplantas (variedad MEX 69-290, sin síntomas de la enfermedad), fueron preacondicionadas durante siete días en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa, para después continuar con el protocolo anteriormente descrito.

5.9 Protocolo Gota-Vitrificación

5.9.1 Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 2 sin preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Se aislaron ápices de plantas donantes (variedad MEX 69-290, sin síntomas de la enfermedad) pertenecientes a la colección activa creada en el laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal. Los ápices se transfirieron a medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa por espacio de 1 día. Posteriormente, los ápices fueron sometidos al tratamiento de carga en una solución de 2 M de glicerol + 0.4 M de sacarosa por un tiempo de 20-30 minutos, y fueron expuestos a la solución vitrificadora PVS 2 anteriormente descrita, por un tiempo de 15 minutos. Los ápices fueron sometidos a la congelación rápida, por lo anterior, los ápices fueron depositados sobre una lámina de aluminio a la cual se le adicionó un volumen aproximado de 20 μ l de solución PVS 2. Posteriormente al tratamiento de congelación, las láminas se someten al lavado con una solución 1.2 M de sacarosa, y son transferidos a medio MS de recuperación, finalmente los ápices fueron incubados por espacio de 30 días en completa oscuridad, antes de ser trasferidos a las condiciones de fotoperiodo.

5.9.2 Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 2 con preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Las vitroplantas donantes (variedad MEX 69-290, sin síntomas de la enfermedad), fueron pre-acondionadas durante siete días en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa, para después continuar con el protocolo descrito anteriormente.

5.9.3 Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 3 sin preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Se aislaron ápices de plantas donantes (variedad MEX 69-290, sin síntomas de la enfermedad) pertenecientes a la colección activa creada en el laboratorio de Criobiología y Biotecnología Vegetal. Los ápices aislados de las vitroplantas se transfirieron a medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa por espacio de 1 día. Los ápices fueron sometidos al tratamiento de carga en una solución 2 M de glicerol + 0.4 M de sacarosa por espacio de 20-30 minutos, seguidamente se expusieron a la solución vitrificadora PVS 3 anteriormente descrita, por espacio de 15 minutos. Posteriormente al tratamiento, los ápices son sometidos

a la congelación rápida, para esto, los ápices son depositados sobre una lámina de aluminio a la cual se le adicionó un volumen aproximado de 20 μ l de la solución PVS 3 para ser sometidos a la congelación. Posterior al tratamiento de congelación, las láminas se sometieron al lavado con una solución de 1.2 M de sacarosa, y fueron transferidos al medio de cultivo de recuperación, después se incubaron por espacio de 30 días en ausencia de luz, antes de ser transferidos a las condiciones de fotoperiodo establecidas para los cultivos.

5.9.4 Protocolo Gota-vitrificación con solución PVS 3 con preacondicionamiento de la vitroplanta madre

Las vitroplantas (variedad MEX 69-290, sin síntomas de la enfermedad), fueron preacondionadas por espacio de 7 días en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa, para después continuar con el protocolo descrito anteriormente.

5.10 Protocolo Gota-Vitrificación con solución PVS 2, con y sin preacondicionamiento de la vitroplanta con presencia de la enfermedad de mosaico de la caña de azúcar

En base a los resultados obtenidos en la primera etapa del diagnóstico fitosanitario se tomaron vitroplantas infectadas con el SCMV, (“línea” No. 21) a las cuales se les aplicó el protocolo de Gota-Vitrificación descrito anteriormente.

Cabe mencionar que se realizó un diagnóstico confirmatorio para el material antes de aplicar el protocolo anteriormente descrito para asegurar la infección por el SCMV, donde los valores se mantuvieron en un mismo rango en comparación con el primer diagnóstico.

5.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software (Minitab versión 16.0). Los resultados son presentados como medias (\pm ES). Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos (propagación en medio MS semisólido y MS líquido), los resultados fueron analizados por un MANOVA balanceado y una agrupación de medias con una prueba de Tukey con un valor de $P < 0.05$. Cada experimento se realizó con cinco replicas por tratamiento y fue repetido al menos dos veces. Para la comparación de las técnicas criogénicas, los resultados fueron analizados por una prueba de ANOVA y una prueba de Tukey con un valor de $P < 0.05$ para determinar las diferencias significativas entre las medias, cada experimento se realizó al menos tres veces.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. Resultados y discusión

6.1 Propagación del material vegetal

Se propagó de manera masiva del cultivo *in-vitro* de caña de azúcar variedad MEX 69-290 y CP 72-2086 y se introdujo exitosamente el cultivo *in-vitro* del material colectado en campo de la variedad CP 72-2086 con la presencia de síntomas de la enfermedad. Todo el material biológico fue propagado periódicamente (15 a 20 días), y mantenidas en medio MS semi-sólido descrito anteriormente (Figura 1).

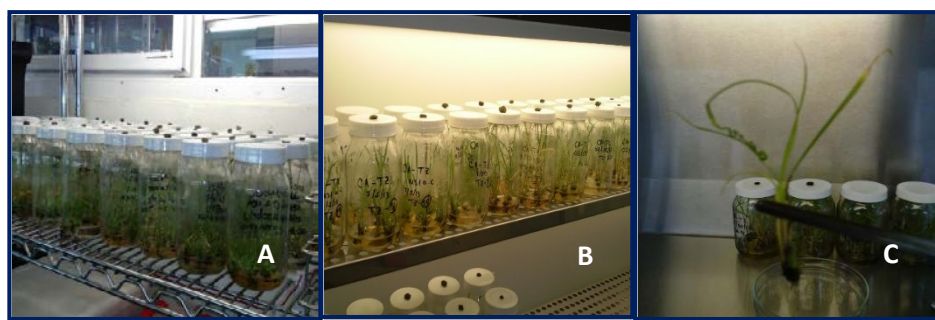


Figura 1. Colección activa de caña de azúcar A). Variedad MEX 69-290 B). Variedad CP 72-2086 C). Variedad CP 72-2086 con la presencia de síntomas de la enfermedad del mosaico.

6.2 Evaluación de la efectividad de diferentes medios de propagación de cultivo *in-vitro* para caña de azúcar

La comparación de la eficiencia en la micropropagación utilizando medio MS semisólido y medio MS líquido (inmersión parcial). De todos los explantes usados para la comparación, todos fueron viables en cuanto a la formación de nuevos brotes y el crecimiento.

En relación a la elongación de la hoja en la micropropagación utilizando medio MS semisólido y la micropropagación en inmersión parcial (medio líquido) no mostró diferencias significativas, obteniendo un promedio de elongación medida en cm de 2.98 y 3.33, respectivamente (Figura 2).

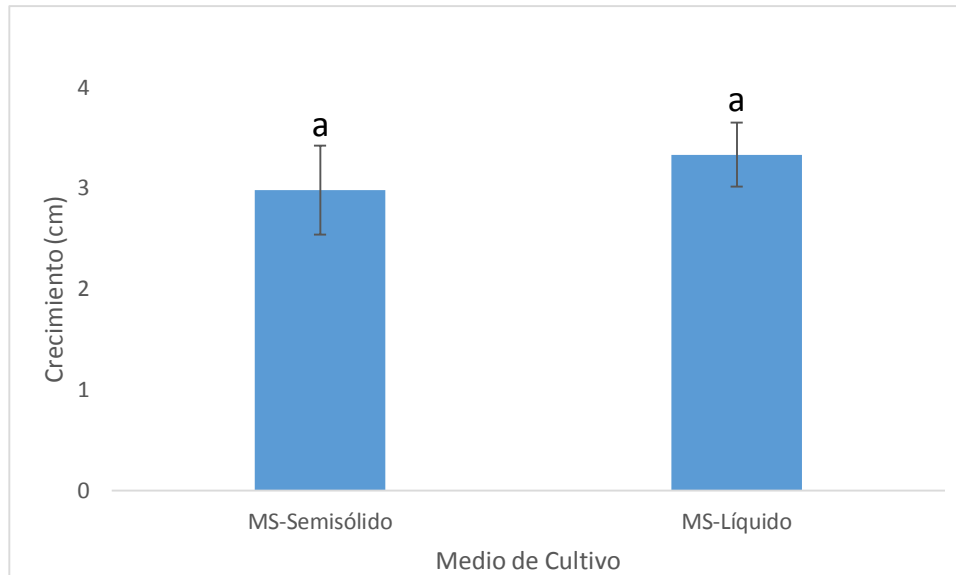


Figura 2. Evaluación de la elongación de la vitroplanta de caña de azúcar (MEX 69-290) en diferentes medios de propagación. Medio MS-semisólido y medio MS-líquido (inmersión parcial). Los resultados se presentan como medias (\pm ES) y fueron analizados con un ANOVA, con una prueba de Tukey con valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Cada experimento se realizó con cinco replicas por tratamiento y fue repetido al menos dos veces

El número de nuevos brotes formados durante la propagación en medio MS semisólido y la propagación en inmersión parcial (medio líquido) no mostró diferencias significativas, obteniendo un promedio de 29.4 y 30 brotes, respectivamente (Figura 3 y tabla 2).

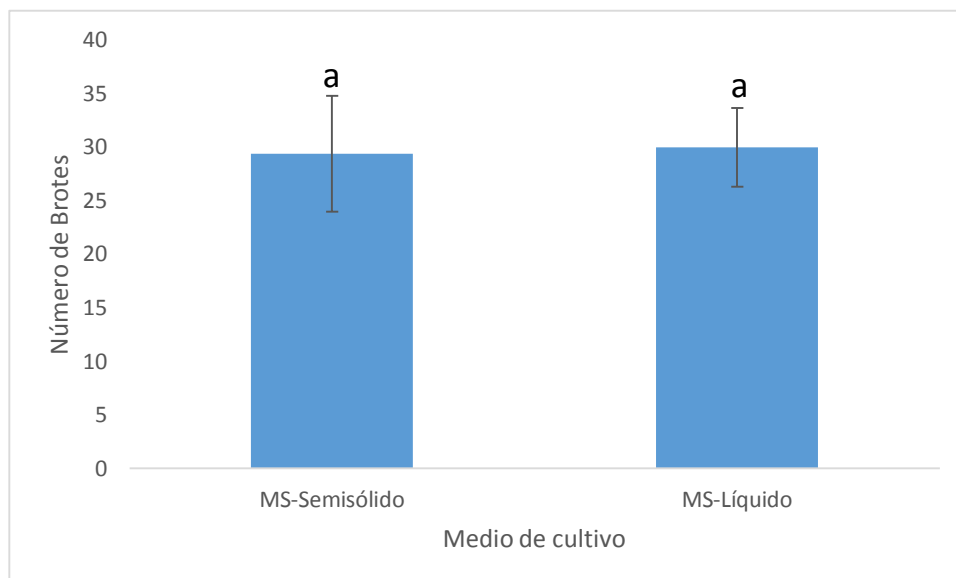


Figura 3. Evaluación de la formación de nuevos brotes de caña de azúcar (MEX 69-290) en diferentes medios de propagación. Medio MS-semisólido y medio MS-líquido

(inmersión parcial). Los resultados se presentan como medias (\pm ES) y fueron analizados con una prueba de ANOVA, y una prueba de Tukey con valores de $P < 0.05$ son considerados significativos. Cada experimento se realizó con cinco replicas por tratamiento y fue repetido al menos dos veces.

La evaluación de la capacidad de formación de brotes, tomando en cuenta los valores de la formación de nuevos brotes así como el porcentaje de los explantes que dieron lugar a nuevos brotes, no mostró diferencia significativa entre la propagación de medio líquido y la propagación en medio sólido (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la capacidad de formación de brotes entre medio MS-semisólido y medio MS-líquido (inmersión parcial).

Método de propagación	Capacidad de formación de brotes
Medio semi-sólido	5.88
Medio líquido	6

No obstante, aunque los resultados mostraron que no existe diferencia significativa entre los diferentes métodos de propagación, se decidió continuar la propagación del material vegetal en medio semisólido debido a que se obtienen ápices con mayor consistencia, teniendo una mejor turgencia de los tejidos lo que es mejor a la hora de realizar la extracción de los ápices que serán utilizados en los protocolos criogénicos.

6.3 Determinación fitosanitaria del material biológico.

Se determinó una línea de corte (cut off), para la cual se utilizó el promedio de las absorbancias de los controles negativos más tres veces la SD [sin la presencia de síntomas de la enfermedad (MEX 69-290)] y se comparó con la lectura de absorbancia de un blanco (amortiguador general de extracción) y de un control positivo (lío-filizado de tejido vegetal positivo al virus) incluido en el kit comercial. Obteniendo una línea de corte de 0.093 (Figura 4).

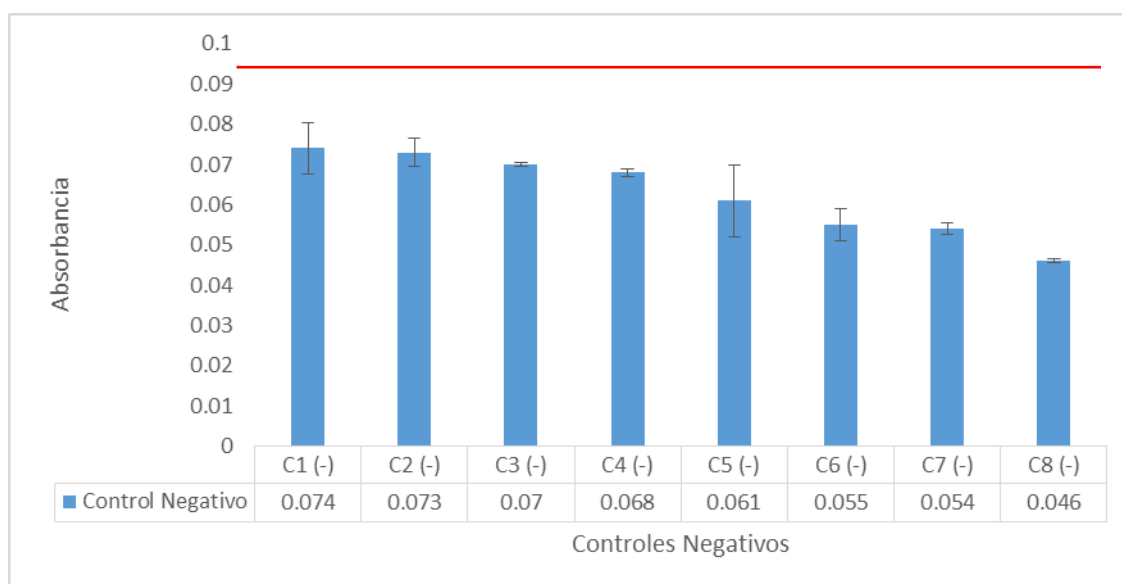


Figura 4. Determinación de la línea de corte (cut off), para el diagnóstico fitosanitario del material biológico utilizando el promedio de las absorbancias de los controles negativos más la suma de 3 veces la desviación estándar.

Una vez determinada la línea de corte (0.093), se comparó con las absorbancias que fueron obtenidas de las muestras problema colectadas en campo e introducidas *in-vitro* (CP 72-2086) con presencia de los síntomas de la enfermedad. Se observó que el 80% de las muestras analizadas fueron positivas al SCMV (Figura 5).

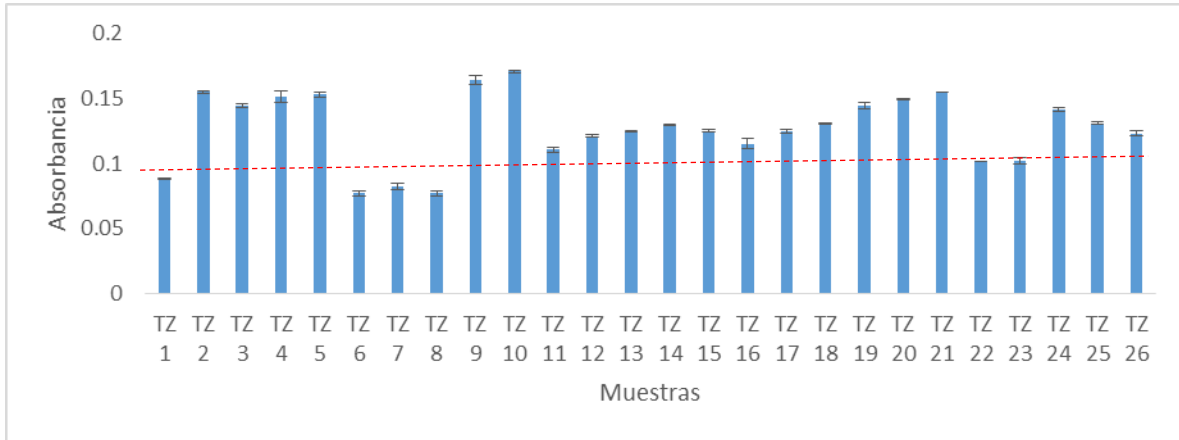


Figura 5. Evaluación fitosanitaria de las muestras colectadas en campo con presencia de síntomas de SCMV e introducidas *in-vitro*. Los resultados se presentan con error estandar y la línea punteada representa la línea de corte (0.093).

6.4 Estudio del proceso de desecación.

Para establecer el porcentaje de humedad óptimo en las cápsulas de alginato de calcio de 20-22%, para la implementación del procedimiento criogénico de Encapsulación-Deshidratación reportando por González-Arno & Engelmann (2006). Se realizaron cinco curvas de desecación utilizando sílica gel, después de ser precultivadas a diferentes tiempos (1-5 días) en medio MS líquido suplementado con 0.75M de sacarosa.

El contenido de humedad de las cápsulas disminuyó de manera gradual cada hora hasta alcanzar un nivel de 20-22%, después de cinco horas de desecación, independientemente del tiempo de precultivo (1 a 5 días) a las que fueron sometidas (Figura 5).

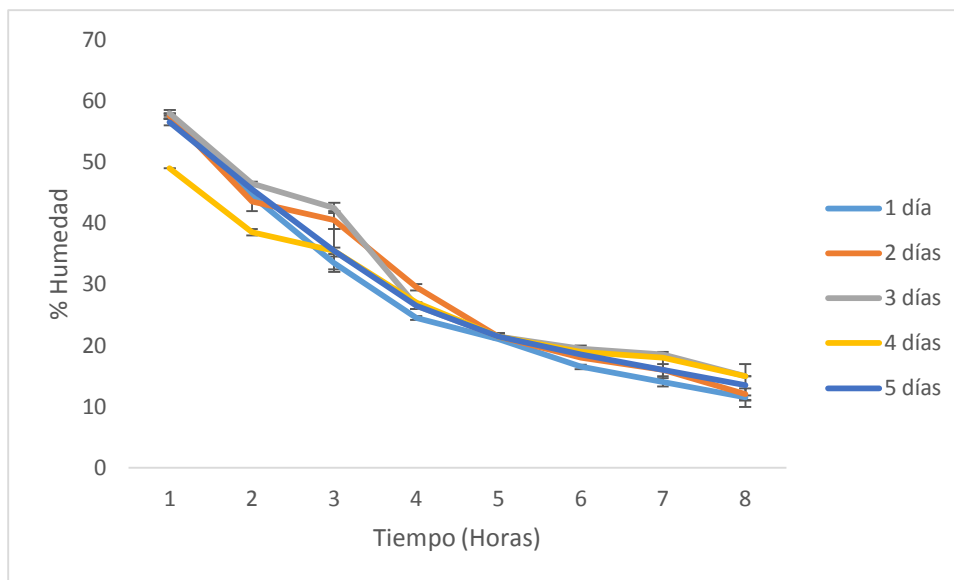


Figura 6. Determinación del porcentaje de humedad en cápsulas de alginato de calcio precultivadas en medio MS líquido suplementado con 0.75 M de sacarosa (1-5 días) y sometidas a un tratamiento de desecación con gel de sílice.

6.5 Protocolo Encapsulación-Deshidratación para ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento de la vitroplanta donante.

Se aislaron ápices a partir de material asintomático (MEX 69-290), provenientes de vitroplantas donantes sin preacondicionar y preacondionadas por siete días en medio semisólido MS suplementado con 0.3 M de sacarosa.

Como se observa en la Tabla 3, el precultivo en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa por 24 horas, de ápices provenientes de vitroplantas con y sin preacondicionamiento, mostraron un 96.66 y 100% de sobrevivencia y regeneración respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas en estas etapas iniciales del protocolo.

El precultivo de los ápices encapsulados con 0.75 M de sacarosa, a diferentes intervalos de tiempo (1-5 días), mostró que los ápices provenientes de vitroplantas preacondionadas y sin preacondicionar de 1 y 2 días de precultivo presentaban mayor viabilidad comparadas con el resto de los tratamientos [3-5 días (anexo IV)], los cuales su sobrevivencia y regeneración fue mínima o escasa. No obstante, los ápices precultivados provenientes de

vitroplantas sin precondicionar de 1 y 2 días de precultivo, mostraron significativamente mayor índice de sobrevivencia y regeneración de 55 y 65.66 % respectivamente, comparado con los ápices precultivados provenientes de vitroplantas precondicionadas, las cuales mostraron un índice significativamente menor 19 y 9.66 % de sobrevivencia y regeneración respectivamente en los mismos tiempos de precultivo.

Las cápsulas con material vegetal, después de haber sido precultivadas, fueron expuestas a la desecación física por la exposición sobre gel de sílice, durante cinco horas para alcanzar un 20-22% de humedad.

Mostraron un comportamiento similar, es decir, las cápsulas sometidas a la desecación que mostraron sobrevivencia y regeneración de entre 10 y 30 % fueron las provenientes de vitroplantas precondicionadas y sin precondicionar de 1 y 2 días de precultivo. Sin embargo, una vez que fueron expuestas en nitrógeno líquido, tanto los ápices provenientes con y sin precondicionamiento no mostraron sobrevivencia ni regeneración (Tabla 3).

Tabla 3. Supervivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo Encapsulación-Deshidratación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin precondicionamiento, los resultados se muestran los promedios con el error estándar.

	Sin precondicionamiento	Con precondicionamiento
	Sobrevivencia-Regeneración (%) (a)	Sobrevivencia-Regeneración (%) (b)
Precultivo MS + 0.3 M de Sac. (1 día)	100±0(a)	96.66±3.33(a)
Precultivo MS +0.75 M de Sac. (1 día)	55±2.88(c)	19±1(e)
Precultivo MS + 0.75 M de Sac. (2 días)	65.66±2.96(b)	9.66±0.33(f)
MS + 0.75 M de Sac. (1 día) + desecación	19±1(e)	20±0(e)
MS + 0.75 M de Sac. (2 día) + Desecación	28±1.52(d)	19.33±0.33(e)
MS + 0.75 M de Sac. (1 día) + Desecación + N.L.	0(g)	0(g)
MS + 0.75 M de Sac. (2 día) + Desecación + N.L.	0(g)	0(g)

6.6 Protocolo Encapsulación-Vitrificación para ápices de caña de azúcar con y sin precondicionamiento de la vitroplanta donante.

Se aislaron ápices a partir de material asintomático (MEX 69-290) provenientes de vitroplantas donantes sin precondicionar y precondicionadas por siete días en medio semisólido MS suplementado con 0.3 M de sacarosa.

El precultivo de los ápices en medio MS suplementado con 0.3M de sacarosa por 24 horas, provenientes de vitroplantas con y sin precondicionamiento, mostraron un 100% de regeneración sin diferencias significativas en estas etapas iniciales del protocolo (Tabla 4).

Durante el tratamiento de carga (solución 0.4 M de sacarosa y 2 M de glicerol), los ápices de caña de azúcar que fueron aislados de vitroplantas con preacondicionamiento, mostraron significativamente mayor índice de regeneración de 35.5% en comparación con los ápices aislados de las vitroplantas con preacondicionamiento con un 13.3% de sobrevivencia.

El tratamiento con la solución vitrificadora PVS 2 mostró un índice de sobrevivencia bajo, tanto en los ápices provenientes de la vitroplanta donante con y sin preacondicionamiento de 4.43% y 6.66%, respectivamente. Con respecto al tratamiento con solución PVS 3, fue nula la sobrevivencia de los ápices provenientes de las vitroplantas donantes con y sin preacondicionamiento.

Los ápices del tratamiento con la solución vitrificadora PVS 2 no mostraron sobrevivencia después de la exposición en nitrógeno líquido (Tabla 4).

Tratamiento	E-V Sin preacondicionamiento	E-V Con preacondicionamiento
	Sobrevivencia-Regeneración (%)(a)	Sobrevivencia-Regeneración (%)(b)
Precultivo MS + 0.3 M de Sac. 1 día	100(a)	100(a)
Solución de Carga	13.3 ± 0(c)	35.5 ± 7.9(b)
Solución PVS 2	6.66 ± 6.6(c)	4.43 ± 4.3(c)
Solución PVS 3	0(c)	0(c)
PVS 2 + N.L.	0(c)	0(c)
PVS 3 + N.L.	0(c)	0(c)

Tabla 4. Sobrevivencia–regeneración de plantas provenientes del protocolo Encapsulación-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar, con y sin preacondicionamiento, los resultados se muestran los promedios con el error estándar.

6.7 Protocolo Gota-Vitrificación para ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento de la vitroplanta donante.

Se aislaron ápices a partir de material asintomático (MEX 69-290) provenientes de vitroplantas donantes sin preacondicionar y preacondionadas por siete días en medio semisólido MS suplementado con 0.3 M de sacarosa.

El precultivo de los ápices en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa por 24 horas, de plantas con y sin preacondicionamiento, mostraron un 100 % de sobrevivencia y regeneración, sin diferencias significativas entre ellas en estas etapas iniciales del protocolo (Tabla 5).

Durante el tratamiento de carga (solución 0.4 M de sacarosa y 2 M de glicerol), los ápices de caña de azúcar que fueron aislados de las vitroplantas sin preacondicionamiento, mostraron un mayor índice estadísticamente no significativo de sobrevivencia y regeneración del 53.3 % en comparación con los ápices aislados de las vitroplantas con preacondicionamiento con un 44.4% de sobrevivencia (Tabla 5).

El tratamiento con la solución vitrificadora PVS 2 mostró un índice de sobrevivencia y regeneración de los ápices provenientes de las vitroplantas donantes sin preacondicionar

mayor (44.4%), estadísticamente no significativo en comparación al tratamiento con la solución PVS 3 con un 35.5%. Para el caso del tratamiento de los ápices provenientes de vitroplantas con precondicionamiento, al igual que en los protocolos anteriores mostraron una sobrevivencia y regeneración moderable sin diferencias significativas de 17.7% tanto con el tratamiento con solución PVS 2 como con la PVS 3 (Tabla 4). Los ápices del tratamiento con la solución vitrificadora PVS 3 no mostraron sobrevivencia ni regeneración después de la exposición en nitrógeno líquido (Tabla 5).

Sin embargo, por primera vez, los ápices del tratamiento con la solución vitrificadora PVS 2 mostraron sobrevivencia y regeneración después de la exposición al nitrógeno líquido tanto en los ápices provenientes de vitroplantas con y sin precondicionamiento de 2.2 y 13.5% respectivamente sin diferencias significativas (Tabla 5).

Tabla 5. Sobrevivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo de Gota-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin precondicionamiento, los resultados se muestran los promedios con el error estándar.

Tratamiento	G-V Sin precondicionamiento	G-V Con precondicionamiento
	Sobrevivencia- Regeneración (%) (a)	Sobrevivencia- Regeneración (%) (b)
Precultivo MS + 0.3 M de Sac. 1 día	100(a)	100(a)
Solución de Carga	53.3 ± 11.7(b)	44.4 ± 4.4(bc)
Solución PVS 2	44.4 ± 15.4(bc)	17.7 ± 2.2(bcd)
Solución PVS 3	35.5 ± 2.2(bcd)	17.7 ± 2.2(cde)
PVS 2 + N.L.	13.3 ± 3.86(de)	2.2 ± 2.2(e)
PVS 3 + N.L.	0(e)	0(e)

No obstante, mediante una comparación global entre los tratamientos con y sin precondicionamiento de 0.3 M de sacarosa durante 7 días de las vitroplantas donantes utilizando la técnica criogénica (Gota-Vitrificación), en la cual se obtuvo regeneración de los ápices después de la exposición al nitrógeno líquido. Se determinó que existe un efecto

positivo y estadísticamente significativo al usar ápices de vitroplantas sin precondicionar en comparación a los ápices provenientes de vitroplantas precondicionadas. Lo anterior, posiblemente debido a la susceptibilidad de los ápices a un estrés previo a las etapas criogénicas (ANEXOS IV, V y V).

6.8 Evaluación de la técnica de crioconservación Gota-Vitrificación para el saneamiento del virus del mosaico (SCMV) en vitroplantas de caña de azúcar colectadas en campo e introducidas in-vitro.

Una vez confirmado el estado fitosanitario positivo al SCMV del cultivo *in vitro* provenientes del campo, se utilizaron vitroplantas de la “línea” 21 (Fig.5).

Se extrajeron ápices de las vitroplantas donantes sin precondicionar y precondicionadas; en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa por espacio de siete días.

Durante la etapa del precultivo en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa (24 horas), los ápices aislados de vitroplantas sin precondicionamiento mostraron un índice mayor de sobrevivencia y regeneración estadísticamente no significativo de 88.88% comparado, con el material precondicionado que mostró un índice de sobrevivencia y regeneración de 75.55% (Tabla 6).

Durante el tratamiento de carga (solución 0.4 M de sacarosa + 2 M glicerol), los ápices aislados a partir de vitroplantas sin precondicionar mostraron significativamente un mayor índice de sobrevivencia y regeneración del 68.88% en comparación con los ápices aislados de las vitroplantas con precondicionamiento mostrando un índice de sobrevivencia y regeneración de 33.33% (Tabla 6).

Con respecto a la solución vitrificadora PVS 2 los ápices provenientes de vitroplantas sin precondicionamiento mostró un índice de sobrevivencia y regeneración mayor (26.66%), estadísticamente no significativo en comparación con los ápices provenientes de vitroplantas precondicionadas de 13.33% (Tabla 6).

Como en el caso anterior, los ápices provenientes de vitroplantas sin precondicionamiento después del tratamiento con nitrógeno líquido mostró índice de sobrevivencia y regeneración 8.88% en comparación con los ápices con precondicionamiento donde la

regeneración y la sobrevivencia fue nula (Tabla 6), confirmando el análisis global entre tratamientos con y sin preacondicionamiento.

Por otra parte, cabe señalar, que el precultivo en medio MS suplementado con 0.3 M por 24 horas como primera etapa del protocolo de G-V; el índice de regeneración fue menor en comparación al índice de regeneración del material vegetal sano en las mismas condiciones. Esta disminución se podría atribuir a la susceptibilidad del material vegetal al estar infectado con el SCMV.

Tabla 6. Sobrevivencia y regeneración de plantas infectadas con el SCMV, provenientes del protocolo Gota-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento, los resultados se muestran los promedios con el error estándar.

Tratamiento	G-V Sin preacondicionamiento	G-V Con preacondicionamiento
	Sobrevivencia- Regeneración (%)	Sobrevivencia- Regeneración (%)
Precultivo MS + 0.3 M de Sac. 1 día	88.88±5.87(a)	75.55±4.44(a)
Solución de Carga	68.88±2.22(a)	33.33±7.69(b)
Solución PVS 2	26.66±3.84(bcd)	13.33±6.66(bc)
PVS 2 + N.L.	8.88±4.44(cd)	0(d)

6.9 Evaluación de la efectividad de la técnica de crioconservación Gota-Vitrificación para el saneamiento del virus (SCMV).

Antes de aplicar el tratamiento criogénico Gota-Vitrificación se realizó nuevamente la prueba inmunoenzimática comercial “doble anticuerpo sándwich” (DAS-ELISA, Alkaline phosphatasa label) confirmando la presencia de la enfermedad del mosaico en las vitroplantas de la “línea” 21.

6.9.1 Material preacondicionado.

Las vitroplantas donantes se preacondicionaron durante siete días en medio semisólido MS suplementado con 0.3 M de sacarosa, a partir de las cuales se aislaron los ápices para el protocolo anteriormente descrito.

En cada etapa del protocolo de Gota-Vitrificación se dejaron controles y se evaluaron por lotes, es decir, control de ápices (C. ápices), el lote 1 (precultivo en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa), el lote 2 (tratamiento de carga solución 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol), el lote 3 (solución vitrificadora PVS 2) y el lote 4 (congelación en nitrógeno líquido), con el objetivo de compararlos antes y después de la técnica criogénica.

El estatus fitosanitario del lote 1 (precultivo) antes del tratamiento, mostró una absorbancia de 0.132 la cual se encuentra por encima de la línea de corte (0.093) confirmando la presencia de la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar. La absorbancia determinada por la prueba inmunoenzimática DAS-ELISA después del tratamiento de precultivo disminuyó significativamente a 0.083 la cual se encuentra por debajo de la línea de corte obteniéndose la eliminación del SCMV desde la primera etapa del protocolo criogénico. De igual manera, se observó que conforme se avanzó en las etapas del protocolo criogénico, el lote 2 (tratamiento de carga) y el lote 3 (PVS 2), las absorbancias obtenidas por el ensayo DAS-ELISA de 0.245 y 0.286 respectivamente, antes del tratamiento, disminuyeron significativamente después de aplicar el protocolo criogénico, registrando un valor de absorbancia de 0.073 y 0.063 respectivamente, los cuales se encuentran por debajo de la línea de corte, indicando de igual manera un saneamiento de la enfermedad y mostrando una tendencia a disminuir significativamente conforme se avanza en el protocolo criogénico. (Figura 6)

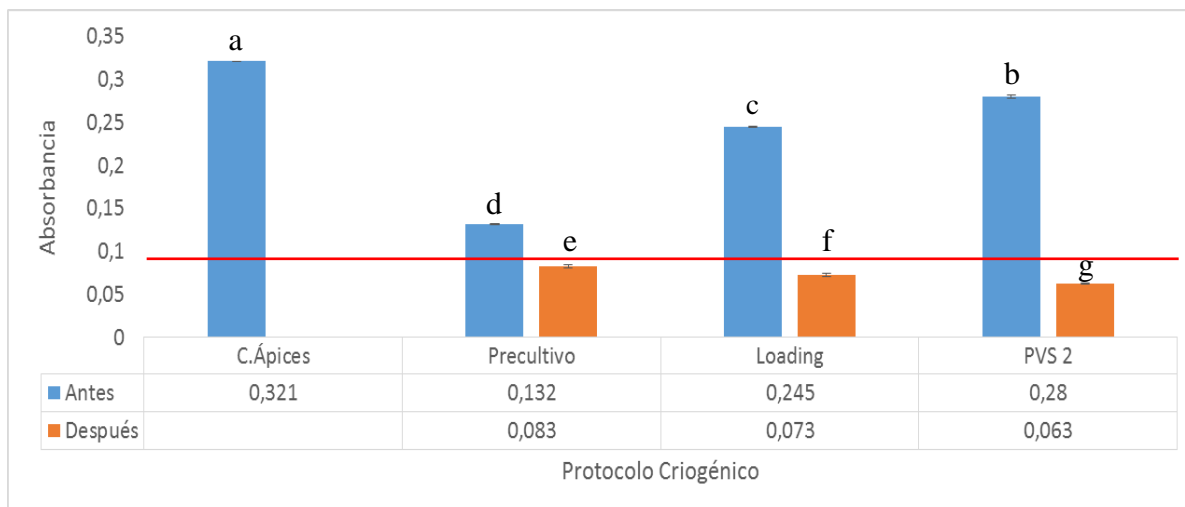


Figura 7. Evaluación del saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (CP 72-2086) utilizando la técnica de Gota-Vitrificación en material con preacondicionamiento. Los resultados se presentan como medias (\pm ES) y fueron analizados por una prueba de ANOVA además de una agrupación de medias con una prueba de Tukey con un valor de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

6.9.2 Material sin preacondicionar.

El estatus fitosanitario del lote 1 (precultivo) antes del tratamiento, mostró una absorbancia de 0.217 la cual se encuentra por encima de la línea de corte (0.093) confirmando la presencia de la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar. La absorbancia determinada por la prueba inmunoenzimática DAS-ELISA después del tratamiento de precultivo disminuyó de manera significativa a 0.085 la cual se encuentra por debajo de la línea de corte, lo anterior confirma el saneamiento del SCMV desde la primera etapa del protocolo criogénico.

No obstante, cabe señalar que conforme se avanzó en las etapas del protocolo criogénico, el lote 2 (tratamiento de carga) y el lote 3 (PVS 2) mostraron una absorbancia de 0.233 y 0.180 respectivamente antes del tratamiento, y después del tratamiento tanto el lote 2 como el lote 3 presentaron una absorbancia de 0.073 y 0.063 respectivamente encontrándose por debajo de la línea de corte, indicando un saneamiento de la enfermedad y mostrando una tendencia significativa al disminuir conforme se avanza en el protocolo criogénico (Figura 7). Esto pudiera corresponder al estrés adicional sobre los ápices ocasionado por las soluciones osmoprotectoras (solución de carga y PVS 2) y finalmente lote 4 (N.L.) antes del tratamiento da una absorbancia de 0.183 y después del tratamiento baja significativamente a 0.045.

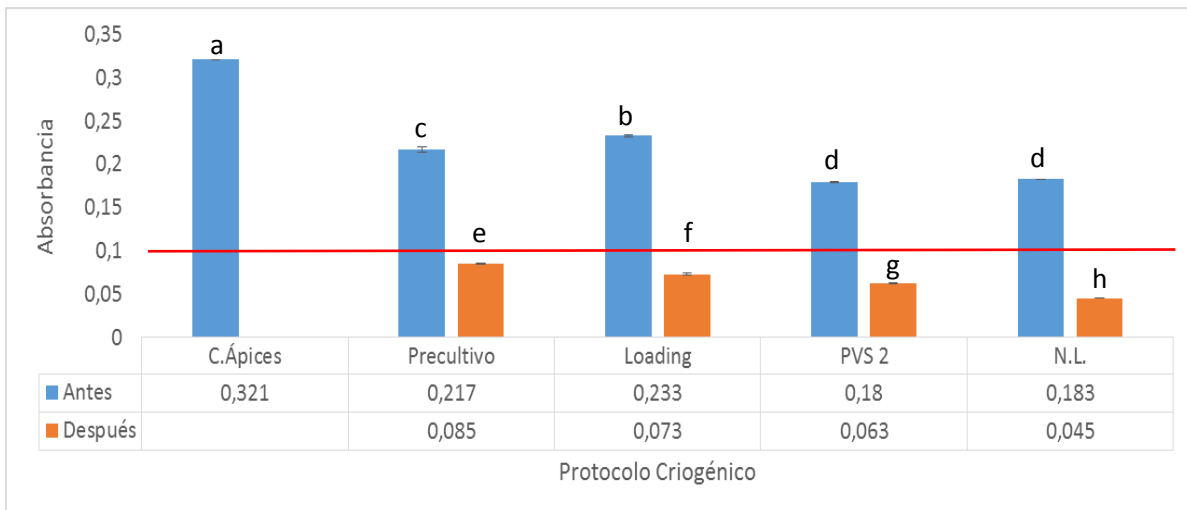


Figura 8 Evaluación del saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (CP 72-2086) utilizando la técnica de Gota-Vitrificación en material sin preacondicionamiento. Los resultados se presentan como medias (\pm ES) y fueron analizados por una prueba de ANOVA además de una agrupación de medias con una prueba de Tukey con un valor de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones.

1. Se propagó masivamente el cultivo *in-vitro* de caña de azúcar variedad MEX 69-290 y CP 72-2086 y se introdujo exitosamente el cultivo *in-vitro* del material colectado en campo (CP 72-2086) con la presencia de síntomas característicos de la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar (SCMV).
2. La propagación del material biológico en medio sólido comparado con inmersión parcial (medio líquido) no mostró diferencia significativa.
3. El preacondicionamiento de la vitroplanta donante en medio MS sólido suplementado con 0.3 M de sacarosa por siete días no mostró índice de recuperación después de la exposición al nitrógeno líquido en el protocolo de Encapsulación-Deshidratación y Encapsulación-Vitrificación.
4. El protocolo Gota-Vitrificación, utilizando la solución PVS 3, no mostró sobrevivencia, tanto para ápices provenientes de vitroplantas preacondicionadas como sin preacondicionar.
5. Se obtuvo regeneración de plantas [MEX 69-290 (material asintomático)] con el protocolo Gota-Vitrificación utilizando la solución PVS2 y ápices de vitroplantas con y sin preacondicionamiento, obteniendo con esta última condición un índice de 13.3%.
6. Aplicando el protocolo de G-V, se obtuvo una regeneración de 8.88% de los ápices provenientes de vitroplantas infectadas (CP 722086), sin preacondicionar y con la solución PVS2.
7. Se confirmó el saneamiento del SCMV desde la primera etapa del protocolo criogénico. Este saneamiento corresponde, al saneamiento tradicional por cultivo de tejidos meristemáticos.
8. Existe una tendencia significativa en el saneamiento del SCMV conforme se avanza en el protocolo criogénico, esto posiblemente se deba al estrés adicional que producen las soluciones osmoprotectoras (solución de carga y solución vitrificadora PVS 2) sobre los ápices de caña de azúcar.

Perspectivas

1. Determinar la efectividad del saneamiento por medio de la RT-PCR en plantas regeneradas después de la exposición al nitrógeno líquido.
2. Evaluar otra técnica criogénica (crio-lámina) para aumentar el porcentaje de plantas regeneradas después del tratamiento con nitrógeno líquido.
3. Evaluar el saneamiento de otros patógenos sistémicos de importancia de la caña de azúcar [virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (ScYLV) y el fitoplasma del síndrome del amarillamiento foliar de la caña de azúcar (YLS)].
4. Aplicar la técnica del saneamiento a otras especies de importancia agrícola.

9. BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía.

1. SAGARPA, (2011). www.siacon.sagarpa.gob.mx
2. Romero, E. R., Digonzelli, P.A., Scandaliaris, J. (2009). Manual del cañero. 1 ra ed. Las Talitas: Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. Tucumán, Argentina.
3. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.
4. Bernal, JJ., Jiménez, I., Moreno, M., Hord, M., Rivera, C., Koenig, R., Rodríguez-Cerezo E. (2000). *Chayote mosaic virus*, a New Tymovirus Infecting Cucurbitaceae. *Phytopathology*. 90:1098-1104.
5. Xie, Y., Wang, M., Xu, D., Li, R., Zhou, G. (2009). Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 162: 64-68.
6. Loebenstein, G., Thottapilly, G. (2003) *Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
7. Waterworth, HE., and Hadidi A. (1998). Economical losses due to plant viruses. In *Plant Virus Disease Control*, Eds. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa. St. Paul, MN, USA: APS Press. pp. 1-13.
8. Bhojwani, SS., Razdan, MK. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised Edition. Amsterdam: Elsevier Science BV.
9. Faccioli, VC, Marani, F. (1998). Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H, editors. *Plant virus disease control*. St. Paul, MN, USA: APS Pres. pp. 346-80.
10. Mink, GI., Wample, R., Howell, WE. (1998). Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses and viroids while maintaining plant survival. In *Plant Virus Disease Control*, Eds A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa. St. Paul, MN, USA: APS Press. pp. 332-345.
11. Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Irely, M., Lockhart, BEL., Rott, P. (2001). Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease*. 85: 1177-1180.

12. González-Arno, M., Panta, A., Roca, WM., Escobar, RH., Engelmann, F. (2008). Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 92: 1-13.
13. González-Arno, MT., Lázaro-Vallejo, CE., Engelmann, F., Gamez-Pastrana, R., Martínez-Ocampo, YM., Pastelin-Solano, MC., Díaz-Ramos, C. (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* “Andrews”). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 45:574-582.
14. Ashmore S. (1997). Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
15. Abdelnour-Esquivel, A., Bermúdez, L.C., Alvarenga, S., Rivera, C. (2006). Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechiumedule*Jacq. Sw.) Para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*. 77:17-23.
16. Wang, QC., Valkonen, JPT. (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*.14:119-22.
17. Brison, M., De Boucaud, MT., Pierronnet, A., Dosba, F. (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv of *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science*. 123:189-196.
18. Wang, QC., Liu, Y., Xie, Y., You, M. (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leaf roll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). *Potato Research*. 49:119-29.
19. Helliot, B. *et al.*, (2002) Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Report*. 20: 1117-1122.
20. Wang, QC., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E. (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*. 165:321-327.
21. Wang, QC., Cuellar, WJ., Rajamäki, ML., Hirata, Y., Valkonen, JPT. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus

- distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants. *Molecular Plant Pathology*. 9: 237-250.
22. Wang, QC., and Valkonen, JPT. (2008a). Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathology*. 57: 338-347.
 22. Wang, QC., and Valkonen, JPT. (2008b). Eradication of two synergistically interacting viruses from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy of shoot tips. *Journal of Virological Methods*. 154:135-145.
 23. Wang, QC., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M., Valkonen, J.T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology*. 154:351-363.
 24. Ding, F. *et al.* (2008). Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. *Plant Cell Report*. 27, 241-250.
 25. Feng, C., Yin, Z., Ma, Y., Zhang, Z., Chen, L., Wang, B., Li, B., Huang, Y., Wang, Q. (2011). Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology Advances*. 29:84-93.
 26. Wang, QC., Laamanen, J., Uosukainen, M., Valkonen, JPT. (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubusidaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Report*. 24:280-288.
 27. Panis, B., Strosse, H., Van den Henda, S.; Swennen, R. (2002) Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *Cryo-Letters*. 23: 375-384.
 28. Kaczmarczyk, A., Rokka, VM., Keller, ERJ. (2011). Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review. *Potato Research*. 54:45-79.
 29. Keller, ERJ., Senula, A., Kaczmarczyk, A. (2008). Cryopreservation of herbaceous dicots. In: Reed B. M. (ed) *Plant cryopreservation a practical guide*. Springer, New York, pp. 281-332.

30. Engelmann, F., Takagi, H. (2000). Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications. JIRCAS, Tsukuba.
31. Towill, LE., Bajaj, YPS. (2002). Cryopreservation of plant germplasm II. In: Towill LE, Bajaj YPS (eds). *Biotechnology in agriculture and forestry*, 50. Berlin: Springer-Verlag.
32. Wang, QC., and Perl, A. (2006). Cryopreservation in Floricultural Plants. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, Ed J.A. Teixeira da Silva. Isleworth, UK: Global Science Books. pp. 524-539.
33. Reed, BM. (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Reed, BM. (ed.) Springer.
34. Engelmann, F. (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 40:427-433.
35. Kartha, KK. (1985). *Cryopreservation of Plant Cell and Organs*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
36. Engelmann, F. (1997). In vitro conservation methods. In *Biotechnology and Plant Genetic Resources*, Eds J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. Oxford, UK: CAB International. pp. 119–161.
37. Fahy, GM., MacFarlane, DR., Angell, CA., Meryman, HT. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 21: 413-426.
38. Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 47:5-16.
39. González-Arnao, MT., Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo-Letters*. 27: 155-168.
40. Panis, B. and M. Lambardi. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In *The Role of Biotechnology for the Characterization and Conservation of Crop, Forest, Animal and Fishery Genetic Resources in Developing Countries*. Eds. FAO. Turin, Italy, pp 43–54.
41. Benson, EE. (2008). Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 27:141-219.

42. Engelmann, F., González-Arno, MT., Wu, WJ., Escobar, RE. (2008). Development of encapsulation-dehydration. In: Reed B. M. (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, Berlin, pp. 59-76.
43. Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In Cryopreservation of Tropical Germplasm. Current Research Progress and Application. Eds. F. Engelmann and H. Takagi. JIRCAS, Rome, pp 8–20.
44. Sakai A, Engelmann F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. *CryoLetters* 28:151-172.
45. Kuniyoshi L. Sakai, Arihito Nauchi, Yoshinori Tatsuno, Kazuyoshi Hirano, Yukimasa Muraishi, Masakazu Kimura, Mike Bostwick, and Noriaki Yusa. (2009). Distinct Roles of Left Inferior Frontal Regions that Explain Individual Differences in SecondLanguage Acquisition. *Human Brain Mapping* 30:2440–2452
46. Hendre, RR., Mascarenhas, AF, Nadgir, AL., Pathak, M., Jagannathan, V. (1975). Growth of mosaic virus-virus free sugarcane plants from apical meristems. *Indian Phytopathology*. 28:175-178.
47. Ramgareeb, S., Snyman, SJ., van Antwerpen, T., Rutherford, RS. (2010). Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100: 175-181.
48. Irvine, J E., Benda, GTA. (1985). Sugarcane mosaic virus in plantlets regenerated from diseased leaf tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5: 101-106.
49. Leu, LS. (1978). Apical meristem culture and redifferentiation of callus masses to free some sugarcane systemic disease. *Plant Protect Bulletin* (Taiwan). 20: 77-82.
50. Dean, JL. (1982). Failure of sugarcane mosaic virus to survive in cultured sugarcane tissue. *Plant Disease*. 66: 1060-1061.
51. Snyman, SJ., Van Antwerpen, T., Ramdeen, V., Meyer, GM., Richards, JM., Rutherford, RS. (2007). Micropropagation by direct somatic embryogenesis: is disease elimination also a possibility? *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. 26: 943-946.

52. Parmessur, Y., Aljanabi, S., Saumtally, S., Dookun-Saumtally, A. (2002). Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue-culture. *Plant Pathology*. 51: 561-566.
53. Arias-González Gloria. (2007). Desarrollo del diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en Cuba y su aplicación práctica. FITOSANIDAD vol. 11, no. 3
54. Cultek, (2011). www.cultek.com/inf/otros/.../Soluciones-ELISA-protocolos.pdf
55. González-Arno, MT., Engelmann, F., Huet, C., Urra, C. (1993). Criopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *Cryo-Letters*, 14, 303-308.
56. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
57. González-Arno, MT., Urra, C., Engelmann, F., Ortiz, R., de la Fé, C. (1999). Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage temperature and storage duration. *Cryo-Letters*. 20: 347-352.
58. Chaves-Bedoya Giovanni, Espejel Fulgencio, Alcalá-Briseño Ricardo I., Hernández-Vela Juan, Silva-Rosales Laura. (2011). Short distance movement of genomic negative strands in a host and nonhost for Sugarcane mosaic virus (SCMV). *Virology Journal*. 8:15

10. ANEXOS

9. Anexos.

ANEXO I. Evaluación de la efectividad de diferentes medios de cultivo in-vitro para caña de azúcar.

Formación de nuevos brotes de caña de azúcar (MEX 69-290) en medio MS-semisólido

FRASCO	R1	R2	R3	R4	R5	SUMA
A	2	3	5	4	5	19
B	3	3	3	5	4	18
C	15	3	12	3	6	39
D	15	10	10	5	5	45
E	5	7	6	5	3	26
					PROMEDIO	29.4

Formación de nuevos brotes de caña de azúcar (MEX 69-290) en medio MS-líquido (inmersión parcial)

FRASCO	R1	R2	R3	R4	R5	SUMA
A	3	5	5	4	7	24
B	3	2	3	7	7	22
C	9	6	5	5	4	29
D	7	9	5	6	5	32
E	10	10	7	7	9	43
					PROMEDIO	30

MANOVA

$s = 1$ $m = 0.0$ $n = 20.5$

Criterio	Estadística de prueba	F	Número	GL Denom	P
De Wilks	0.90498	2.258	2	43	0.117
Lawley-Hotelling	0.10500	2.258	2	43	0.117
De Pillai	0.09502	2.258	2	43	0.117
De Roy	0.10500				

Elongación de la hoja (cm) de las vitroplantas de caña de azúcar (MEX 69-290) en medio MS-semisólido.

FRASCO	R1	R2	R3	R4	R5	PROMEDIO
A	2.37	2.55	4.19	2.25	2.56	2.784
B	2.59	2.1	2.31	2.45	2.94	2.478
C	3.51	3.1	3.31	2.71	2.14	2.954
D	3.21	2.55	2.7	3.75	2.87	3.016
E	3.47	3.61	3.1	4	4.21	3.678
					PROMEDIO	2.982

Elongación de la hoja (cm) de las vitroplantas de caña de azúcar (MEX 69-290) en medio MS-líquido (inmersión parcial).

FRASCO	R1	R2	R3	R4	R5	PROMEDIO
A	3.1	3.35	3.15	2.79	3.91	3.26
B	3.89	4.1	3.51	2.91	2.87	3.456
C	3.54	3.1	3.21	3.14	3.21	3.24
D	4.1	4.35	3.79	3.57	3.1	3.782
E	2.54	3.1	2.1	3.45	3.4	2.918
					PROMEDIO	3.3312

MANOVA

s = 1 m = 0.0 n = 20.5

Criterio	Estadística de prueba	F	Número	GL Denom	P
De Wilks	0.90498	2.258	2	43	0.117
Lawley-Hotelling	0.10500	2.258	2	43	0.117
De Pillai	0.09502	2.258	2	43	0.117
De Roy	0.10500				

ANEXO II. Diagnóstico fitosanitario del material biológico (CP 72-2086)

Determinación de la línea de corte (cut off), utilizando las absorbancias de los controles negativos.

Muestra	Absorbancia	Absorbancia	Promedio	SD	N	ES
Blanco	0.045	0.045	0.045	0	2	0
C (+)	0.606	0.605	0.6055	0.00070711	2	0.0005
C1 (-)	0.068	0.081	0.0745	0.00919239	2	0.0065
C2 (-)	0.07	0.077	0.0735	0.00494975	2	0.0035
C3 (-)	0.071	0.07	0.0705	0.00070711	2	0.0005
C4 (-)	0.069	0.068	0.0685	0.00070711	2	0.0005
C5 (-)	0.052	0.07	0.061	0.01272792	2	0.009
C6 (-)	0.051	0.059	0.055	0.00565685	2	0.004
C7 (-)	0.053	0.056	0.0545	0.00212132	2	0.0015
C8 (-)	0.046	0.047	0.0465	0.00070711	2	0.0005

Evaluación fitosanitaria de las muestras colectadas en campo con presencia de síntomas de SCMV e introducidas in-vitro.

Muestra	Absorbancia	Absorbancia	Promedio	SD	N	ES
TZ 1	0.088	0.089	0.088500	0.00070711	2	0.0005
TZ 2	0.154	0.156	0.155000	0.00141421	2	0.001
TZ 3	0.146	0.143	0.144500	0.00212132	2	0.0015
TZ 4	0.147	0.156	0.151500	0.00636396	2	0.0045
TZ 5	0.155	0.151	0.153000	0.00282843	2	0.002
TZ 6	0.075	0.079	0.077000	0.00282843	2	0.002
TZ 7	0.080	0.085	0.082500	0.00353553	2	0.0025
TZ 8	0.075	0.079	0.077000	0.00282843	2	0.002
TZ 9	0.168	0.161	0.164500	0.00494975	2	0.0035
TZ 10	0.172	0.170	0.171000	0.00141421	2	0.001
TZ 11	0.112	0.109	0.110500	0.00212132	2	0.0015
TZ 12	0.120	0.122	0.121000	0.00141421	2	0.001
TZ 13	0.124	0.125	0.124500	0.00070711	2	0.0005
TZ 14	0.130	0.129	0.129500	0.00070711	2	0.0005
TZ 15	0.124	0.126	0.125000	0.00141421	2	0.001
TZ 16	0.111	0.119	0.115000	0.00565685	2	0.004
TZ 17	0.123	0.126	0.124500	0.00212132	2	0.0015
TZ 18	0.130	0.131	0.130500	0.00070711	2	0.0005
TZ 19	0.142	0.147	0.144500	0.00353553	2	0.0025
TZ 20	0.150	0.149	0.149500	0.00070711	2	0.0005
TZ 21	0.155	0.155	0.155000	2.7756E-17	2	1.9626E-17
TZ 22	0.102	0.102	0.102000	1.3878E-17	2	9.8131E-18
TZ 23	0.100	0.105	0.102500	0.00353553	2	0.0025
TZ 24	0.140	0.143	0.141500	0.00212132	2	0.0015
TZ 25	0.130	0.132	0.131000	0.00141421	2	0.001
TZ 26	0.121	0.125	0.123000	0.00282843	2	0.002

ANEXO III. Determinación del porcentaje de humedad en cápsulas de alginato de calcio precultivadas en medio MS líquido suplementado con 0.75 M de sacarosa (1-5 días) y sometidas a un tratamiento de desecación con gel de sílice.

Precultivo en medio MS suplementado con 0.75 M de sacarosa (1 día)

Horas	% Humedad	% Humedad	Promedio	SD	N	ER
1	57	58	57.5	0.5	2	0.35355339
2	45	44	44.5	0.5	2	0.35355339
3	32	35	33.5	1.5	2	1.06066017
4	24	25	24.5	0.5	2	0.35355339
5	21	21	21	0	2	0
6	16	17	16.5	0.5	2	0.35355339
7	15	13	14	1	2	0.70710678
8	12	11	11.5	0.5	2	0.35355339

Precultivo en medio MS suplementado con 0.75 M de sacarosa (2 días)

Horas	% Humedad	% Humedad	Promedio	SD	N	ER
1	58	57	57.5	0.70710678	2	0.5
2	42	45	43.5	2.12132034	2	1.5
3	39	42	40.5	2.12132034	2	1.5
4	29	30	29.5	0.70710678	2	0.5
5	21	22	21.5	0.70710678	2	0.5
6	18	18	18	0	2	0
7	17	15	16	1.41421356	2	1
8	13	11	12	1.41421356	2	1

Precultivo en medio MS suplementado con 0.75 M de sacarosa (3 días)

Horas	% Humedad	% Humedad	Promedio	SD	N	ER
1	57	59	58	1.41421356	2	1
2	49	44	46.5	3.53553391	2	2.5
3	45	40	42.5	3.53553391	2	2.5
4	26	27	26.5	0.70710678	2	0.5
5	21	22	21.5	0.70710678	2	0.5
6	20	19	19.5	0.70710678	2	0.5
7	19	18	18.5	0.70710678	2	0.5
8	15	15	15	0	2	0

Precultivo en medio MS suplementado con 0.75 M de sacarosa (4 días)

Horas	% Humedad	% Humedad	Promedio	SD	N	ER
1	49	49	49	0	2	0
2	39	38	38.5	0.70710678	2	0.5
3	36	35	35.5	0.70710678	2	0.5
4	27	27	27	0	2	0
5	21	22	21.5	0.70710678	2	0.5
6	19	19	19	0	2	0
7	18	18	18	0	2	0
8	15	15	15	0	2	0

Precultivo en medio MS suplementado con 0.75 M de sacarosa (5 días)

Horas	%Humedad	% Humedad	Promedio	SD	N	ER
1	57	56	56.5	0.70710678	2	0.5
2	46	45	45.5	0.70710678	2	0.5
3	32	39	35.5	4.94974747	2	3.5
4	26	27	26.5	0.70710678	2	0.5
5	21	22	21.5	0.70710678	2	0.5
6	19	18	18.5	0.70710678	2	0.5
7	18	14	16	2.82842712	2	2
8	17	10	13.5	4.94974747	2	3.5

ANEXO IV. Supervivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo Encapsulación-Deshidratación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin preacondicionamiento.

Material sin preacondicionamiento MEX 69-290.

Etapa	R1	R2	R3	Promedio	N	SD	ES
Precultivo 0.3	100	100	100	100	3	0	0
Precultivo 0.75	60	50	55	55	3	5	2.88675135
Precultivo 0.75	70	60	67	65.6666667	3	5.13160144	2.96273147
Precultivo 0.75	30	30	27	29	3	1.73205081	1
Precultivo 0.75	10	10	9	9.66666667	3	0.57735027	0.33333333
Precultivo 0.75	0	10	0	3.33333333	3	5.77350269	3.33333333
Desección	20	17	20	19	3	1.73205081	1
Desección	30	25	29	28	3	2.64575131	1.52752523
Desección	10	10	10	10	3	0	0
Desección	10	9	7	8.66666667	3	1.52752523	0.8819171
Desección	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0

Material preacondicionado MEX 69-290.

Etapa	R1	R2	R3	Promedio	N	SD	ES
Precultivo 0.3	100	100	90	96.6666667	3	5.77350269	3.33333333
Precultivo 0.75	20	20	17	19	3	1.73205081	1
Precultivo 0.75	10	10	9	9.66666667	3	0.57735027	0.33333333
Precultivo 0.75	10	10	10	10	3	0	0
Precultivo 0.75	7	7	5	6.33333333	3	1.15470054	0.66666667
Precultivo 0.75	0	0	0	0	3	0	0
Desección	20	20	20	20	3	0	0
Desección	20	19	19	19.3333333	3	0.57735027	0.33333333
Desección	10	10	10	10	3	0	0
Desección	9	5	5	6.33333333	3	2.30940108	1.33333333
Desección	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0
N.L.	0	0	0	0	3	0	0

Análisis de varianza para Respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Etapa	15	58099.7	58099.7	3873.3	860.74	0.000
Momento	1	1608.8	1608.8	1608.8	357.52	0.000
Etapa*Momento	15	5753.p	5753.0	383.5	85.23	0.000
Error	64	288.0	4.5			
Total	95	65749.5				

S = 2.12132 R-cuad. = 99.56% R-cuad. (Ajustado) = 99.35%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Etapa	Momento	N	Media	Agrupación
1	1	3	100.000	A
1	2	3	96.667	A
3	1	3	65.667	B
2	1	3	55.000	C
4	1	3	29.000	D
8	1	3	28.000	D
7	2	3	20.000	E
8	2	3	19.333	E
2	2	3	19.000	E
7	1	3	19.000	E
9	1	3	10.000	F
4	2	3	10.000	F
9	2	3	10.000	F
5	1	3	9.667	F
3	2	3	9.667	F
10	1	3	8.667	F
5	2	3	6.333	F-G
10	2	3	6.333	F-G
6	1	3	3.333	F-G
11	1	3	0.000	G
12	1	3	0.000	G
15	1	3	0.000	G
14	1	3	0.000	G
15	2	3	0.000	G
11	2	3	0.000	G
12	2	3	-0.000	G
14	2	3	-0.000	G
16	2	3	-0.000	G
16	1	3	-0.000	G
13	1	3	-0.000	G
6	2	3	-0.000	G

ANEXO V. Supervivencia–regeneración de plantas provenientes del protocolo Encapsulación-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar, con y sin preacondicionamiento.

Material sin preacondicionamiento MEX 69-290.

Etapa	R1	R2	R3	Promedio	N	ES	SD
Precultivo	100	100	100	100	3	0	0
Loading	13.3	13.3	13.3	13.3	3	0	0
PVS 2	20	0	0	6.66666667	3	6.666666667	11.54700538
PVS 3	0	0	0	0	3	0	0
N.L. + PVS 2	0	0	0	0	3	0	0
N.L. + PVS 3	0	0	0	0	3	0	0

Material con preacondicionamiento MEX 69-290.

Etapa	R1	R2	R3	Promedio	N	ES	SD
Precultivo	100	100	100	100	3		0
Loading	20	46.6	40	35.53333333	3	7.996943861	13.85111307
PVS 2	13.3	0	0	4.433333333	3	4.433333333	7.67875858
PVS 3	0	0	0	0	3	0	0
N.L. + PVS 2	0	0	0	0	3	0	0
N.L. + PVS 3	0	0	0	0	3	0	0

Análisis de varianza para Respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Etapa	5	46825.6	46825.6	9365.1	380.95	0.000
Momento	1	44.4	44.4	44.4	1.81	0.191
Etapa*Momento	5	331.9	331.9	66.5	2.70	0.045
Error	24	590.0	590.0	24.6		
Total	35	47791.9				

S = 4.95816 R-cuad. = 98.77% R-cuad. (Ajustado) = 98.20%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Etapas	Momento	N	Media	Agrupación
1	2	3	100.000	A
1	1	3	100.000	A
2	2	3	28.667	B
2	1	3	13.000	C
3	1	3	6.667	C
3	2	3	4.333	C
4	1	3	0.000	C
4	2	3	0.000	C
5	1	3	0.000	C
5	2	3	0.000	C
6	1	3	-0.000	C
6	2	3	-0.000	C

ANEXO VI. Supervivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo de Gota-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin precondicionamiento.

Material sin precondicionamiento MEX 69-290.

Etapa	R1	R2	R3	Promedio	N	ES	SD
Precultivo	100	100	100	100	3	0	0
Loading	26.6	53.3	80	53.3	3	15.41525219	26.7
PVS 2	40	26.6	66.6	44.4	3	11.75471537	20.35976424
PVS 3	40	33.3	33.3	35.53333333	3	2.233333333	3.868246804
N.L. + PVS 2	6.6	13.3	20	13.3	3	3.868246804	6.7
N.L. + PVS 3	0	0	0	0	3	0	0

Material con precondicionamiento MEX 69-290.

Etapa	R1	R2	R3	Promedio	N	ES	SD
Precultivo	100	100	100	100	3	0	0
Loading	40	53.3	40	44.43333333	3	4.433333333	7.67875858
PVS 2	13.3	20	20	17.76666667	3	2.233333333	3.868246804
PVS 3	20	20	13.3	17.76666667	3	2.233333333	3.868246804
N.L. + PVS 2	6.6	0	0	2.2	3	2.2	3.810511777
N.L. + PVS 3	0	0	0	0		0	0

Análisis de varianza para Respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Etapa	5	38883.6	38883.6	7776.7	71.38	0.000
Momento	1	1013.4	1013.4	1013.4	9.30	0.006
Etapa*Momento	5	789.1	789.1	157.8	1.45	0.243
Error	24	2614.7	2614.7	108.9		
Total	35	43300.7				

S = 10.4376 R-cuad. = 93.96% R-cuad. (Ajustado) = 91.19%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Etapa	Momento	N	Media	Agrupación
1	2	3	100.000	A
1	1	3	100.000	A
2	1	3	53.000	B
2	2	3	44.333	BCD
3	1	3	44.000	BC
4	1	3	35.333	BCD
3	2	3	17.667	CDE
4	2	3	17.667	CDE
5	1	3	13.000	E
5	2	3	2.000	E
6	2	3	-0.000	E
6	1	3	-0.000	E

ANEXO VII. Supervivencia y regeneración de plantas provenientes del protocolo Gota-Vitrificación utilizando ápices de caña de azúcar con y sin precondicionamiento e infectadas con SCMV CP 72-2086.

Material sin precondicionamiento CP 72-2086

Etapa	R1 (%)	R2 (%)	R3 (%)	Promedio	SD	N	ES
Precultivo	86.66	80	100	88.8866667	10.1842296	3	5.87986772
Loading	66.66	66.66	73.33	68.8833333	3.8509263	3	2.22333333
PVS 2	26.66	33.33	20	26.6633333	6.66500063	3	3.84803991
N.L. + PVS 2	0	13.33	13.33	8.88666667	7.69607909	3	4.44333333

Material precondicionado CP 72-2086

Etapa	R1 (%)	R2 (%)	R3 (%)	Promedio	SD	N	ES
Precultivo	66.6	80	80	75.5533333	7.70185259	3	4.44666667
Loading	33.33	46.66	20	33.33	13.33	3	7.69607909
PVS 2	0	20	20	13.3333333	11.5470054	3	6.66666667
N.L. + PVS 2	0	0	0	0	0	3	0

Análisis de varianza para Respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Etapa	3	21413.9	21413.9	7138.0	96.37	0.00
Momento	1	740.7	740.7	740.7	10.00	0.006
Etapa*Momento	3	1807.0	1807.0	602.3	8.13	0.002
Error	16	1185.1	1185.1	74.1		
Total	23	25146.7				

S = 8.60625 R-cuad. = 95.29% R-cuad. (Ajustado) = 93.23%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Etapa	Momento	N	Media	Agrupación
1	1	3	88.8867	A
1	2	3	75.5533	A
2	1	3	68.8833	A
2	2	3	33.3300	B
3	2	3	26.6633	BC
3	1	3	13.3333	BCD
4	1	3	8.8867	CD
4	2	3	-0.0000	D

ANEXO VIII. Evaluación del saneamiento del SCVM utilizando la técnica de Gota-Vitrificación en material sin precondicionar antes y después de aplicar el protocolo criogénico (CP 72-2086).

Material sin precondicionar antes de aplicar el protocolo criogénico CP 72-2086

Muestra	Absorbancia	Absorbancia	Promedio	SD	N	ES
Blanco	0.043	0.045	0.044	0.00141421	2	0.001
Control (+)	0.657	0.753	0.705	0.06788225	2	0.048
Precultivo R1	0.123	0.127	0.125	0.00282843	2	0.002
Loading R1	0.119	0.121	0.12	0.00141421	2	0.001
PVS2-R1	0.234	0.23	0.232	0.00282843	2	0.002
N.L.- R1	0.256	0.257	0.2565	0.00070711	2	0.0005
Precultivo R2	0.21	0.218	0.214	0.00565685	2	0.004
Loading R2	0.231	0.232	0.2315	0.00070711	2	0.0005
PVS2-R2	0.183	0.18	0.1815	0.00212132	2	0.0015
N.L.-R2	0.111	0.112	0.1115	0.00070711	2	0.0005
Precultivo R3	0.223	0.22	0.2215	0.00212132	2	0.0015
Loading R3	0.236	0.234	0.235	0.00141421	2	0.001
PVS2-R3	0.169	0.172	0.1705	0.00212132	2	0.0015
N.L.-R3	0.18	0.186	0.183	0.00424264	2	0.003

Material sin precondicionar después de aplicar el protocolo criogénico CP 72-2086

Etapas	Absorbancia	Absorbancia	Promedio	SD	N	ES
Blanco	0.054	0.056	0.055	0.00141421	3	0.0008165
Control (+)	0.356	0.353	0.3545	0.00212132	3	0.00122474
Precultivo R1	0.085	0.086	0.0855	0.00070711	3	0.0008165
Loading R1	0.07	0.075	0.0725	0.00353553	3	0.00122474
PVS2-R1	0.06	0.064	0.062	0.00282843	3	0.00040825
Precultivo R2	0.086	0.082	0.084	0.00282843	3	0.00204124
Loading R2	0.07	0.073	0.0715	0.00212132	3	0.00163299
PVS2-R2	0.062	0.064	0.063	0.00141421	3	0.00163299
Precultivo R3	0.085	0.088	0.0865	0.00212132	3	0.00122474
Loading R3	0.077	0.076	0.0765	0.00070711	3	0.0008165
PVS2-R3	0.065	0.064	0.0645	0.00070711	3	0.00122474

Análisis de varianza para Respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Etapa	2	0.003755	0.003755	0.001878	219.47	0.000
Momento	1	0.083777	0.083777	0.083777	9792.10	0.000
Etapa*Momento	2	0.001453	0.001453	0.000726	84.90	0.000
Error	12	0.000103	0.000103	0.000009		
Total	17	0.089088				

S = 0.00292499 R-cuad. = 99.88% R-cuad. (Ajustado) = 99.84%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Etapa	N	Media	Agrupación
3	3	0.23333	B
1	3	0.21700	C
5	3	0.18000	D
2	3	0.08500	E
4	3	0.07300	F
6	3	0.06300	G
7	3	0.32112	A