

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO DE
LA CAÑA DE AZÚCAR EN LA COLECCIÓN NACIONAL DE
CENGICAÑA

Trabajo de graduación presentado por
Roberto Fernández Ruiz
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2014

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO DE
LA CAÑA DE AZÚCAR EN LA COLECCIÓN NACIONAL DE
CENGICAÑA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO DE
LA CAÑA DE AZÚCAR EN LA COLECCIÓN NACIONAL DE
CENGICAÑA

Trabajo de graduación presentado por
Roberto Fernández Ruiz
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2014

Vo. Bo.:

(F) 

Lic. Andrés Weinfeld Avalos Figueroa

Tribunal examinador:

(F) 

Licda. Elena María Dardón Fresse

(F) 

Lic. Andrés Weinfeld Avalos Figueroa

(F) 

M.Sc. Lucía Nitsch Velásquez

Fecha de aprobación: Guatemala 16 Junio 2014

ÍNDICE

	LISTA DE CUADROS	viii
	LISTA DE FIGURAS	ix
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	2
III.	JUSTIFICACIÓN	3
IV.	MARCO TEÓRICO	
	a. Caña de azúcar	4
	b. Virus del mosaico de la caña de azúcar	5
	c. Patogénesis	7
	d. Detección del virus	10
	e. Clasificación	11
	f. Bioinformática	11
	g. Área de cultivo	12
V.	Metodología	
	a. Localización	13
	b. Colecta de muestra	13
	c. Extracción de ARN	13
	d. Cuantificación de ARN	14
	e. RT-PCR	14
	f. PCR Convencional	15
	g. Electroforesis	15
	h. ELISA	16
	i. Análisis de secuencias de bases de datos	16
	j. Análisis de secuencia consenso y clasificación	16
	k. Deducción de secuencia para cebadores	17
VI.	Resultados	
	a. Análisis de cebadores específicos para SCMV	19
	b. Optimización de condiciones para RT-PCR	20
	c. Comparación de cebadores S400 551/990 y SCMV-860R/F	21
	d. Prueba comparativa ELISA	22
	e. Distancia genética y clasificación de secuencia consenso	23
VII.	Análisis de resultados	
	a. Análisis bioinformática de secuencias en NCBI	24
	b. Variables del muestreo y RT-PCR	25
	c. Prueba comparativa ELISA	27
	d. Deducción de una secuencia para cebadores específicos	28

VIII.	Conclusiones	29
IX.	Recomendaciones	30
X.	Bibliografía	31
XI.	Anexo	35

LISTA DE CUADROS

1. Decodificación de la nomenclatura IUPAC para la representación de nucleótidos en una secuencia	13
2. PCR <i>in silico</i> de ochenta secuencias de ADN de la cápside de SCMV contra cebadores S400910/S400551 y SCMV-F860/SCMV_R860 para la detección de potyvirus	19
3. ELISA de muestras de hojas de mosaico de caña de azúcar	22
4. Información de las secuencias utilizadas para el análisis bioinformático de las secuencias de la cápside SCMV.	35
5. Cuantificación de las extracciones de ARN adaptado de Locali 2003.	36
6. Matriz de distancia genética calculada por el modelo de Tajima Nei de la secuencia consenso.	38
7. Volumen calculado para reacciones de 25 μ L y 12.5 μ L a partir del volumen recomendado para la reacción de 50 μ L	41
8. Secuencia de cebadores específicos S400 910/551	46
9. Secuencia de cebadores específicos SCMVF860/SCMVR860	47
10. Reactivos para el PCR y el volumen sugerido por el Kit para 1 reacción	47

LISTA DE FIGURAS

1. Partes del tallo y hojas de la caña de azúcar	4
2. Angiosperma de la caña de azúcar	5
3. Maduración de la caña de azúcar	5
4. Morfología del nudo de la caña de azúcar	6
5. Propagación de la caña de azúcar por medio de clones	7
6. Patrón de mosaico característico de la mancha clorótica en caña de azúcar	8
7. Vector del SCMV en caña de azúcar S. flava	9
8. Representación del genoma del SMCV y localización de los genes en el genoma.	10
9. Áreas utilizadas para el cultivo de la caña de azúcar alrededor del mundo.	13
10. Metodología para la detección de SCMV en hojas de caña de azúcar.	15
11. Metodología propuesta para la deducción, análisis y uso de la secuencia consenso.	16
12. Análisis propuesto para la clasificación del fragmento secuenciado	17
13. Análisis de cebadores generados a partir de la secuencia consenso	18
14. Muestras analizadas con los cebadores S400 551 y S400 990	19
15. Determinación del volumen óptimo para la amplificación por RT-PCR	20
16. Comparación de los fragmentos amplificados por cebadores específicos	20
17. PCR convencional de los fragmentos utilizados para la secuenciación	21
18. Amplificación del fragmento con los cebadores SCMV-F/R860	21
19. Árbol filogenético de la secuencia consenso	22
20. PCR <i>in silico</i> de la secuencia consenso	23
21. Secuencia consenso de SCMV según nomenclatura IUPAC	37
22. Conservación de nucleótidos en la secuencia consenso de SCMV	38
23. Tendencia de la concentración de las extracciones de ARN de SCVM	39
24. Tendencia de la pureza de las extracciones de ARN de SCVM	39
25. Amplificación en duplicado del control positivo del kit	40
26. Ejemplo del resultado de un PCR <i>in silico</i>	40

27. Secuencia de la muestra T6	41
28. Cromatograma del fragmento positivo del cebador S400-551	42
29. Cromatograma del fragmento negativo del cebador S400-551	42
30. Cromatograma del fragmento positivo del cebador S400-910	43
31. Síntomas de una hoja de caña de azúcar con mosaico	43
32. Árbol filogenético de la secuencia de ADNc de la muestra T6	44

RESUMEN

El virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) es una enfermedad viral transmitida por áfidos en una manera no persistente. La enfermedad tiene una alta tasa de infección, pero en Guatemala se subestima la presencia del virus en la producción de azúcar. Se caracteriza por las manchas cloróticas amarillas en las hojas de caña de azúcar y una reducción en la producción de sacarosa. En este trabajo se reporta la optimización de las condiciones sugeridas para la detección de SCMV con dos cebadores (SCMV-F860, SCMV-R860 y S400 910, S400 551) por RT-PCR. El análisis bioinformático de secuencias nucleótidos de la cápside viral y nuevos cebadores sugeridos para la detección del SCMV (SCMV2F/SCMV2R) analizando secuencias de NCBI. Además se incluyen la secuencia consenso del análisis bioinformático y se sugieren los métodos para el análisis filogenético de las secuencias.

Del análisis de las muestras recolectadas de la Colección Nacional de CENGICAÑA se logró determinar una secuencia de la cápside del virus. Para la detección del virus se adoptó el protocolo utilizado en CENGICAÑA con los cebadores S400 910, S400 551. Además se logró optimizar las condiciones para la amplificación de los fragmentos de la cápside viral con los cebadores SCMV-F860, SCMV-R860. Se confirmó la presencia del virus por con una prueba de ELISA, realizada en el Laboratorio de Protección Vegetal de la UVG. Se detectó una baja cantidad de muestras positivas y se sugiere analizar las muestras por el método de ELISA previo al análisis por RT-PCR. La presencia de SCMV en las hojas de caña de azúcar fue confirmada realizando BLAST de la secuencia obtenida. Además se realizó análisis de secuencias de la cápside de SCMV en NCBI y se proponen secuencias para nuevos cebadores a partir de la secuencia consenso SCMV2F/SCMV2R.

Por último se propone un método para identificación de cepas virales realizando análisis filogenéticos, tomando como base los estudios realizados en SCMV y potyvirus con herramientas en línea y de acceso libre. Las herramientas utilizadas son: NCBI (Base de datos y diseño de cebadores), MEGA (alineamiento, agrupamiento y determinación de distancia genética) y CLC Sequence Viewer (Determinación de secuencia consenso). Además se sugiere una secuencia de pasos para el análisis bioinformático de las secuencias de SCMV. La deducción de cebadores a partir de un grupo de secuencias provenientes de bases de datos con el propósito mejorar la detección del SCMV.

I. INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico de la caña de azúcar pertenece a la familia *Potyviridae*. Este virus ha sido reportado a nivel mundial en cultivos de maíz, caña de azúcar, el sorgo, Abacá (especie de banano) y otras hierbas. Los síntomas del mosaico en la caña de azúcar es causado por las especies: virus del mosaico de la caña (SCMV), Johnsongrass Mosaic Virus (JGMV), Maize Dwarf mosaic virus (MDMV), Sugarcane Streak Virus (SCSMV), Maize Dwarf mosaic virus (MSMV) y Sorghum Mosaic Virus (SrMV) (Yang 1997 y Xu 2008). Estas especies de virus pertenecen a la familia potyviridae, poseen amplia similitud genética, algunos son transmitidos por el mismo vector y ser identificados utilizando ensayos serológicos. Se han realizado estudios de las secuencias de aminoácidos, ELISA, ensayo inmuno detección en los tejidos (TIBIA: "tissue blot immunobinding assay") y nucleótidos. Junto con análisis serológico y bioinformático son utilizados para la clasificación de las especies (Xu 2008, Gonçalves 2012).

El nombre de las cepas es dado por su lugar de origen, además parece existir una correlación entre algunas especies de virus que infectan a una misma variedad de la caña de azúcar (Comstock 1991). En Argentina se a encontrado que hay regiones donde la caña de azúcar es coinfectada por el SCMV y SrMV (Perera 2009). Se sabe que existen diferentes variedades que son resistentes a diferentes cepas del mosaico (Xia 1999). En Australia y China se determinó que SCMV puede reducir hasta el 30% del rendimiento de los cultivo en variaciones no resistentes. Esto dependerá de las condiciones, como temperatura, edad de la planta y condiciones óptimas para los vectores (BSES 2012, Ovalle 2012 y Rybcki 2012).

El agente causal en Guatemala para los síntomas de mosaico se le atribuye al SCMV y SrMV (Ovalle 2012). Según el censo realizado de la zafra 2012-2013 son CP88-1165, CP72-2086 y CP73-1547 , estas ocupan el 34.8%, 27.3% y 9,9% del área total de caña sembrada en Guatemala (Vásquez 2013). Sin embargo se ha reportado una alta tasa de infección de mosaico para la variedad CP72-2086 (Ovalle 2012).

La industria azucarera a nivel mundial utiliza distintas variedades de caña de azúcar. Las variedades varían entre los continentes, países y regiones. Cada industria determina la o las variedades que utilizará dependiendo del nivel de altura sobre el nivel del mar, rendimiento, tipo de suelos, enfermedades comunes, vectores de enfermedades y otras características, referirse a la sección Memorias en la pagina de la biblioteca en línea de CENGICAÑA. Las variedades sembradas alrededor del mundo generalmente provienen de cruces entre *Saccharum officinarum* y *S. spontaneum*. Existen variedades que poseen un mayor grado de resistencia a enfermedades, como al SCMV. No existe variedades con resistencia a todos los cepas del virus con un alto rendimiento en la producción de azúcar. Cada variedad de caña de azúcar generada tiene la probabilidad de adaptarse al medio ambiente, dependiendo de sus características, previamente mencionadas, esta puede ser seleccionada e introducida en la producción en masa de azúcar. La optimización del método para la detección de SCMV podría beneficiar estudios posteriores dirigidos a la detección sistemática de la enfermedad en Guatemala.

II. OBJETIVOS

A. General

Evaluar la especificidad de los cebadoras F860 y R860 para la detección del virus del mosaico de la caña de azúcar en hojas de caña de azúcar recolectadas en Guatemala.

B. Específicos

1. Determinar las condiciones óptimas a las variables involucradas del funcionamiento del RT-PCR para el par de cebadores R860/F860
2. Utilizar las herramientas bioinformáticas para los polimorfismos de las secuencias del SCMV
3. Realizar un PCR *in silico* de las secuencias de las cepas para la cápside viral de SCMV.
4. Explorar la incidencia del SCMV en la colección nacional de CENGICAÑA.

III. JUSTIFICACIÓN

El virus del mosaico de la caña es un potyvirus que pertenece a la familia *Potyviridae*. Es un virus filamentoso que mide entre 11 a 15 nanómetros de diámetro y generalmente forma cuerpos de inclusión cilíndricos. En su genoma posee la información para codificar una proteinasa para la unión del ARN o inclusión nuclear, transmisión a los insectos, helicasa cilíndrica para la inclusión en las plantas y las proteínas para la cápside del virus (Agrios 2005). El virus es transmitido por áfidos o por "semillas" contaminadas (Sharma 2004).

El color de las hojas en la caña de azúcar depende de dos pigmentos la clorofila y las antocianinas. Cuando la clorofila esta ausente se observa un color amarillento (James 2004). Los daños causados por el virus se observan como decoloraciones en las hojas. Se puede observar patrones de decoloración verde y a veces verde con amarillo. La intensidad en el patrón de la decoloración depende de las condiciones de crecimiento y el serotipo del virus (Comstock 2009). El daño a la planta varia dependiendo de la susceptibilidad de la variedad de la caña de azúcar hacia la cepa viral expuesta.

Se sabe que el mosaico de la caña de azúcar en Guatemala es causada por dos virus o la combinación de (SCMV y SrMV). La incidencia del mosaico en algunas variedades de alto uso generalmente altas (Ovalle 2010). En los cultivos susceptibles de caña de azúcar se han producido pérdidas enormes, como las ocurridas en China, Europa y Estados Unidos (Wu 2012). Aunque en Guatemala no se han reportado pérdidas como las reportadas en otros países, es importante realizar estudios moleculares para obtener mayor información de las especies de virus en Guatemala. Además de cuantificar el impacto del mosaico en la caña de azúcar guatemalteca. Ayudará a conocer las secuencias de ARN del SCMV guatemalteco para realizar estudios posteriores enfocados en la vigilancia de cepas virales del SCMV, estudios filogenéticos y descripción molecular del SCMV en distintas regiones del país.

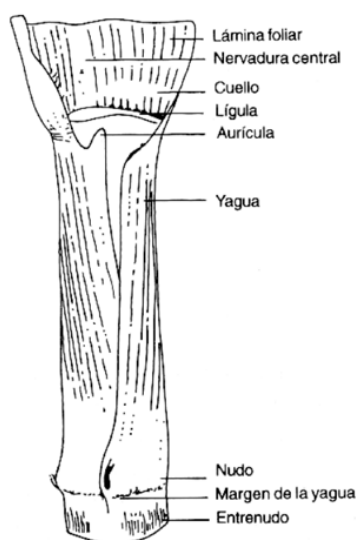
IV. MARCO TEÓRICO

A. Marco conceptual

1. Caña de Azúcar

a. Desarrollo de la caña de azúcar. El angiosperma tiene dos etapas de desarrollo: vegetativa y reproductiva (Quemé 2012). Mientras que el cultivo de la caña de azúcar tiene cuatro etapas de desarrollo: Iniciación, macollamiento, elongación y maduración (Espinoza 2012).

Figura 1. Partes del tallo y hojas de la caña de azúcar



(Estéves *et al* 2013).

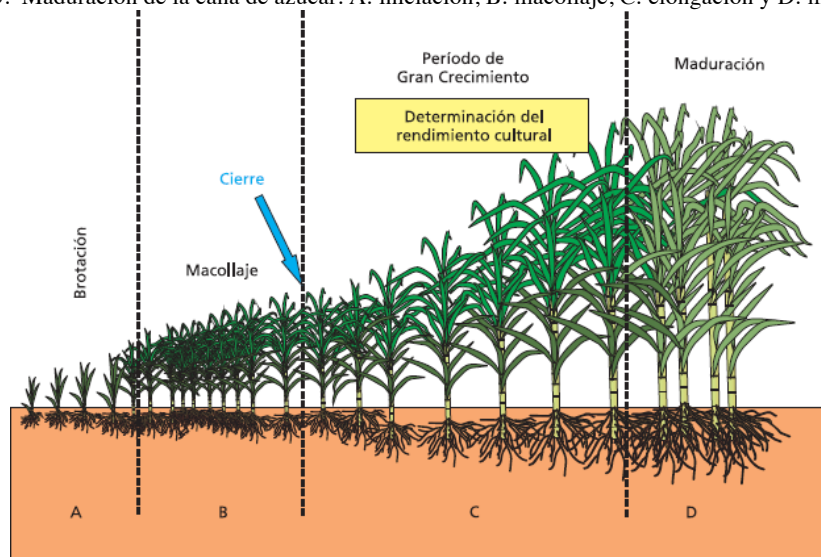
En el desarrollo del angiosperma la etapa vegetativa ocurre el desarrollo de las raíces, tallos y hojas. Mientras que el desarrollo reproductivo se desarrollan las flores, frutos y semillas. En la segunda etapa ocurre la floración y formación de los frutos (Quemé 2012). El cambio de la etapa vegetativa y reproductiva se utiliza para determinar la maduración de la caña de azúcar. Por que al alcanzar esta etapa de maduración fisiológica se tiene el mayor almacenamiento posible de azúcar para esa planta. Sin embargo en la industria se utiliza la maduración botánica para indicar que el almacenamiento de azúcar esta casi en el máximo nivel (Larrahondo 2009). En Guatemala las primeras cosechas generalmente tienen menor producción de azúcar, en comparación con las cosechas intermedias o finales (Espinoza 2012)

Figura. 2. Angiosperma de la caña de azúcar.



En la etapa de iniciación tiene como duración 45 días después de la siembra, el tiempo aproximado del macollamiento es de alrededor de tres meses, elongación seis meses y maduración 45 días aproximadamente. La etapa de acumulación de azúcar ocurre durante la maduración. Como características principales es la disminución en el crecimiento, humedad baja en el suelo o precipitación (30-100mm/mes), luz (11.5 a 12.5 horas/día), temperaturas bajas y como se mencionó anteriormente la acumulación de azúcar (Espinoza 2012).

Figura. 3. Maduración de la caña de azúcar. A: iniciación, B: macollaje, C: elongación y D: maduración.



(Romero *et al* 2012)

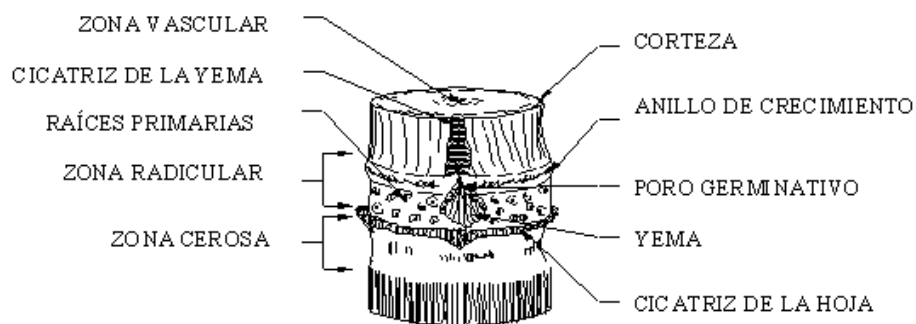
Los maduradores químicos ayudan a regular los procesos bioquímicos encargados en el desarrollo de la planta. Por definición “los maduradores alteran o modifican condiciones morfológicas y fisiológicas de la planta de caña de azúcar” (Espinoza 2012). Estos promueven la acumulación de sacarosa en el tallo. La enzima mas importante en la acumulación e hidrólisis de la sacarosa es la invertasa. Esta enzima esta encargada de regular el balance de síntesis de sacarosa e hidrólisis de la sacarosa (Joubert 2006).

Las funciones fisiológicas de la invertasa dependen de la localización celular y el pH optimo. Estas tienen la función de: ser una fuente de energía de hexosas para el crecimiento, generación de sacarosa, gradientes de concentración, división de las fuentes de sacarosa y los lugares de uso, transporte de sacarosa, turgor en las células y control en el almacenamiento de sacarosa. La invertasa acida (pH 5.0-5.5) se encuentra en el apoplasto y en vacuolas. Esta controla el flujo de sacarosa de los tejidos a las células jóvenes y controla los niveles de hexosas dependiendo de su localización celular. (Joubert 2006).

El desarrollo del angiosperma como el desarrollo de la planta ocurren en diferentes etapas de su vida. Esto permite predecir el la fecha de cosecha de la caña. En las variedades con flor hay mayor acumulación de fibras entre los entrenudos superiores y menor rendimiento de producción de azúcar, la humedad en la maduración de la caña de azúcar afecta en la eficiencia de recuperación de azúcar por cristalización y la aplicación de maduradores permite predecir la maduración de la planta (Espinoza 2012).

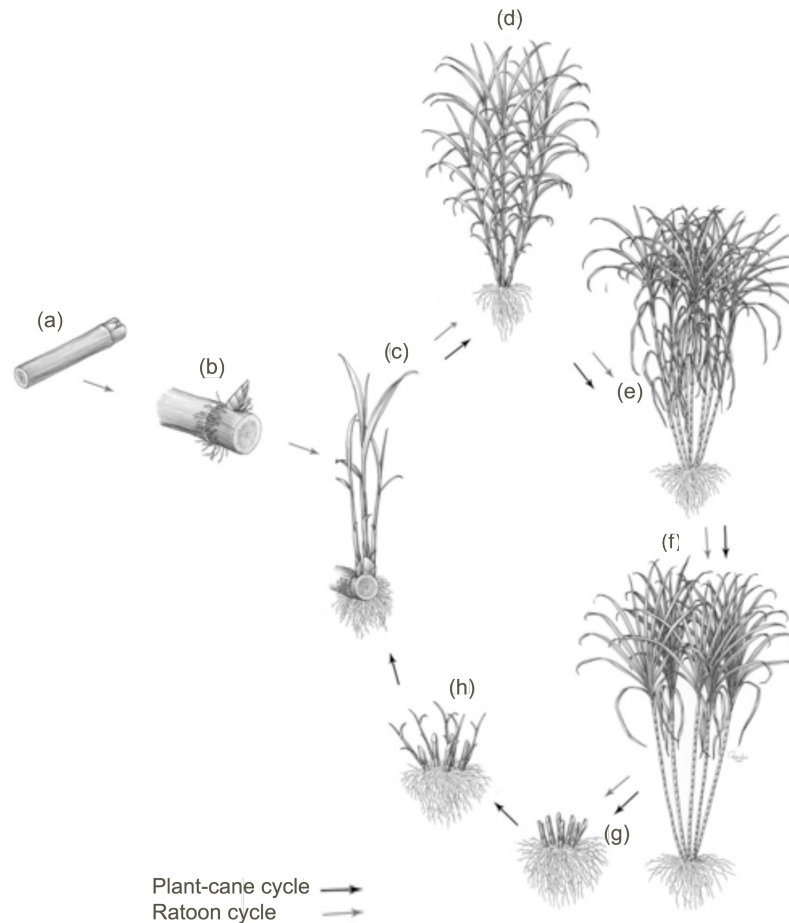
b. Propagación de la caña de azúcar.

Figura. 4. Morfología del nudo de la caña de azúcar.



(Benítez *et al* 2011).

Figura. 5. Propagación de la caña de azúcar por medio de clones. A) el primer paso es cortar una sección del caña de azúcar que contenga un nodo, B) eliminar el exceso y limpiar el nodo, C) el nodo comienza a generar raíces y tallo, "D" a "H" progreso del crecimiento de la planta.



(Gianotto *et al* 2011).

2. Virus del mosaico de la caña de azúcar

a. **Descripción.** El virus del mosaico de la caña pertenece al genero Potyvirus de a la familia de Potyviridae, las partículas virales son filamentosas miden de 11 a 15 nanómetros de diámetro y alrededor de 650 a 900 nanómetros de largo. Es un virus de ssARN o ARN de cadena única por sus siglas en ingles. El virus del mosaico de la caña de azúcar mide 11 por 750nm. Se sabe que la infección en las plantas ocurre durante su propagación en el campo y es transmitido por varias especies de áfidos. También puede ocurrir que el virus se mantenga a lo largo de las temporadas ó en plantas que crecen en los alrededores de los cultivos (Agrios 2005).

b. **Síntomas.** La identificación primaria se basa en la decoloración de las hojas de la caña de azúcar. Esta decoloración posee un patrón de bandas verticales. El color de las bandas varía entre verde pálido y amarillo. Las áreas cloróticas generalmente se localizan en la base de la hoja, algunas veces en la vaina y muy rara vez en el tallo (Comstock 2009). Los síntomas de mosaico son compartidos por cuatro especies de virus, virus del mosaico de la caña de azúcar, mosaico del sorgo, enanismo y mosaico del maíz y el mosaico de Johnsongrass (Comstock 2009).

Figura. 6. Patrón de mosaico característico de la mancha clorótica en caña de azúcar.



(Tomada por: Roberto Fernández 2013)

3. Patogénesis

a. **Ciclo de infección.** El SCMV puede ser transmitido por áfidos o por el mismo sistema de propagación de caña de azúcar a nivel industrial. La industria azucarera utiliza el control biológico de áfidos, fumigación, utilizar variantes resistentes de *Saccharum spp*, control y limpieza para la introducción de una nueva variedad y utilizar los nodos limpios sin infección viral (Ovalle 2012).

b. **Vector:** Además los áfidos pueden transmitir el virus cuando se alimentan del tallo. Se sabe que en Guatemala la especie *Sipha flava* o pulgón amarillo se encuentra en varios ingenios azucareros de Guatemala (Lastra 1990). Sin embargo no se encontró estudios de vigilancia de este especie que esté infectado con el virus.

El virus es transmitido por áfidos de una manera no persistente. Esto es por que el virus no sobrevive adentro del insecto. Es transmitido cuando un áfido se alimenta de una planta infectada. Este puede sobrevivir lo suficiente para infectar otra planta (Ovalle 2012). En otro estudio realizado en otras especies

de áfidos se encontró que el virus puede ser transmitidos cuando este se alimenta dentro de un periodo de 4 horas (Singh 2005).

Figura. 7. Vector del SCMV en caña de azúcar *S. flava*. Áfido alimentándose de una hoja de caña de azúcar. Este insecto mide entre 1-3mm de largo, tiene patas largas y finas, dos antenas y el cuerpo en forma de pera.



(Tremblay *et al* 2005).

c. Proteínas involucradas en la invasión del hospedero No se conoce el mecanismo de infección viral de SCMV. Para esto se necesita conocer las interacciones que existen entre el hospedero y las proteínas virales.

Por ejemplo la proteína HC-Pro tiene varias funciones. Por ejemplo esta involucrada como una poliproteína precursora que se divide espontáneamente. Se sabe que esta involucrada en la transmisión por áfidos, movimiento del virus en la planta, funciona como una proteína silenciadora de genes, interfiere con los miRNA de la planta y esta asociado con la expresión de varias síntomas (Cheng 2008).

El síntoma del mosaico se debe a la interacción entre la proteína HC-Pro con una proteína específica del cloroplasto, ferredoxina 5. La interacción específica entre estas proteínas puede inestabilidad el importa de Fd V al cloroplasto, lo que causaría falla en la estructura y función (Cheng 2008).

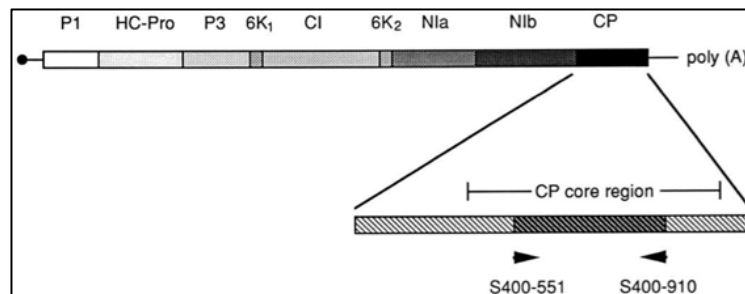
Las proteínas CL y P3N-PIPO son proteínas asociadas a la integración del genoma del virus y al movimiento dentro de la célula. Recientemente se demostró que P3N-PIPO interactúa con las proteínas del hospedero PCaP1, una proteína de unión que se encuentra en las membranas y en el plasmodesmata (Vijayapalani 2012). La unión con este receptor facilita el movimiento entre células. Plasmodesmata son los micro canales que conectan las células. Además la proteína cilíndrica de inclusión CI tiene la función de

ayudar al movimiento del virus a través de la célula interactuando con PIPO formando el complejo Cl:P3N-PIPO (Wei 2010).

La función general de las otras proteínas ya fueron mencionadas. Sin embargo se sabe que muchas de ellas interactúan entre si y tienen diversas funciones. Además no existe un virus donde se haya estudiado la función de cada una de sus proteínas. Muchos de los estudios encontrados fueron realizados en otros sistemas como el sistema doble de levaduras o la comparación de las mismas proteínas en otros organismos (Guo 2001).

Para lograr elucidar el mecanismo de infección se deben realizar estudios de la interacción de las proteínas virales. Una característica de los Potyvirus comparados con otros virus de ARN es que sus proteínas participan tanto en la replicación del genoma como el movimiento del virus (Guo 2001).

Figura 8. Representación del genoma virus SCMV y localización de los genes en el genoma. En el fragmento de la cápside viral CP se muestra la región de amplificación delimitada por los cebadores S400-551 y S400-910 de alrededor de 350pb.



(Smith *et al* 1994)

d. Sistema inmune de la planta contra patógenos virales. Aunque no se conoce el mecanismo de entrada del virus se sabe que existen plantas resistentes al virus. A continuación se describe el sistema inmune en plantas. Las plantas poseen dos tipos de respuesta inmune, una respuesta hipersensitiva (HR) o respuesta de necrosis sistémica (SN). En la respuesta HR se caracteriza por inhibir la multiplicación del virus y muerte celular (Komatsu 2010). En la respuesta SN no hay lesiones de necrosis para inhibir el crecimiento (Mandadi 2013).

El virus del mosaico de la caña activa una respuesta SN por que las plantas no son resistentes. Los síntomas característicos de una planta infectada es el mosaico. Una decoloración de las hojas, de verde a amarillo (Mandadi 2013).

4. Detección del virus

a. PCR: Es una técnica molecular desarrollada por Kary Mullins en 1980. La reacción involucra muchas proteínas utilizadas como andamio para iniciar la reacción, una secuencia de ADN con un grupo OH 3' accesible (llamados cebadores), otra hebra de ADN que actúa como sustrato, y los Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). Esta enzima cataliza la formación de una cadena de polinucleótidos a

b. partir de dNTP (NCBI 2014). Para que ocurra la reacción la enzima necesita de una cadena de ADN como sustrato, para agregar uno de los nucleótidos complementarios A, T, C o G (Adenina, Tirosina, Citosina o Guanina) (Berg 2002). De esta manera repitiendo el ciclo de la reacción permite generar millones de copias de un fragmento de interés.

Para el análisis de secuencias de ARN, como lo son algunos virus. Primero se transcribe el ARN en ADN por la enzima transcriptasa inversa, utilizando una RNA polimerasa. Esto permite generar copias de doble hebra de ADN, también llamada ADN complementario (ADNc). Luego estos fragmentos se visualizan por tamaño en un gel de agarosa. La detección por PCR es una de las técnicas más específicas y permite obtener información sobre la composición nucleotídica del virus.

5. Clasificación.

a. Clasificación del SCMV. El virus del mosaico de la caña de azúcar pertenece a la familia *Potyviridae*, género *potyvirus*. La clasificación de estos virus se realiza usando métodos moleculares y empíricos. Generalmente los potyvirus tienen la característica de tener una alta tasa de mutación y generalmente poseen un rango de hospederos reducidos. Son transmitidos por áfidos en una manera no persistente y el virus puede ser transmitido en el laboratorio por inoculación mecánica (King 2011). Los métodos moleculares consisten en la comparación de secuencias de ácidos nucleicos y amino ácidos (Shukla 1989). La detección de las especies virales pueden ser realizadas por inmunoensayos (King 2011)

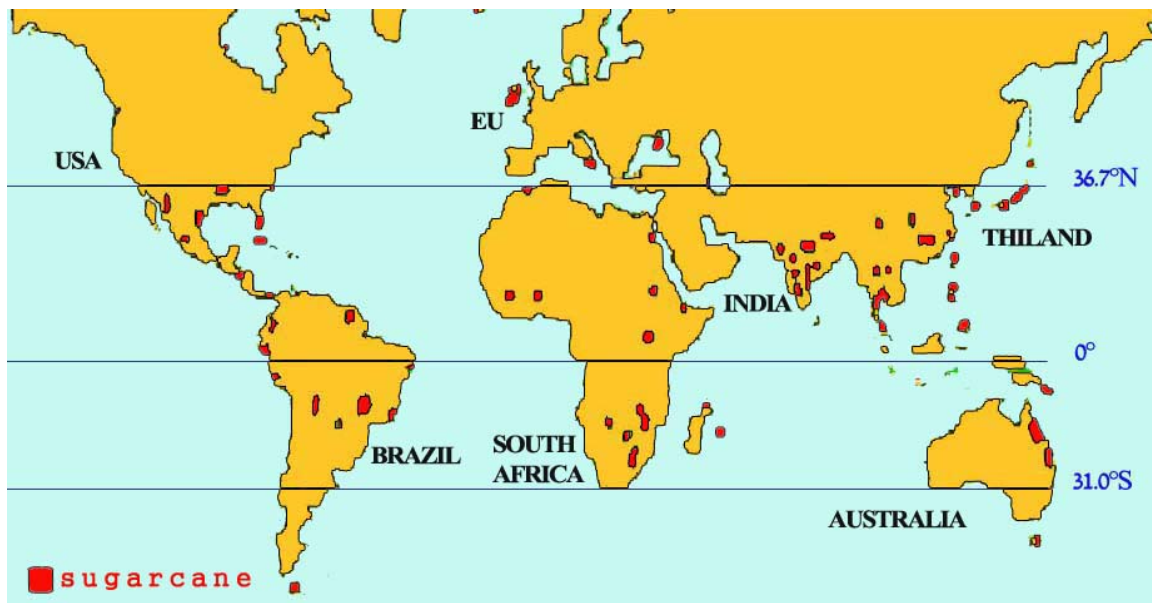
6. Bioinformática. La bioinformática es un conjunto de herramientas que permiten analizar grandes cantidades de datos de análisis biológicos. Las herramientas enfocadas al análisis de secuencias de ADN o ARN se enfocan en el análisis de polimorfismos, alineamientos, búsqueda de secuencias, análisis filogenéticos, análisis de chips y generación de gráficas (Saeys 2007). Las secuencias de nucleótidos pueden ser representadas en su forma clásica (A,T,C,G) o en nomenclatura IUPAC (Cuadro 1). Esta representación aumenta la información obtenida de una secuencia, conociendo los posibles nucleótidos que se esperarían encontrar en la secuencia.

Cuadro 1. Decodificación de la nomenclatura IUPAC utilizado en secuencias de nucleótidos.

Código IUPAC de nucleótidos	Base	Complementario
A	Adenina	T o U
C	Citosina	G
G	Guanina	C
T o U	Timina o Uracilo	A
R	A o G	Y
Y	C o T	R
S	G o C	S
W	A o T	W
K	G o T	M
M	A o C	K
B	C, G, T	V
D	A, G, T	H
H	A, C, T	D
V	A, C, G	B
N	Cualquier base	N
"," o "-"	Brecha	"," o "-"

7. Área de cultivo. La caña de azúcar alrededor del mundo es cultivada cerca de la línea del ecuador. Las áreas cultivadas tienen características similares en altura, temperatura, humedad, tipo de suelo, precipitación y otras características. El SCMV se encuentra presente en todo el mundo. Los brotes ocurridos alrededor del mundo han variado en su intensidad. En Guatemala el cultivo de la caña de azúcar se encuentra en su mayoría en la región sur del país. Los departamentos con mayor área de cultivo de caña de azúcar son: Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez y Retalhuleu.

Figura 9. Áreas utilizadas para el cultivo de caña de azúcar alrededor del mundo.



(www.sugarcane crops.com)

V. METODOLOGÍA

A. Procedimientos

1. **Localización:** Se realizaron siete muestreos en la Colección Nacional de CENGICANÑA. Se obtuvo un total de 48 muestras hojas de caña de azúcar de diferentes variedades, las cuales fueron recolectadas en un total de 7 muestreos al campo. Además 27 muestras de diferentes variedades fueron donadas por el Dr. Werner Ovalle tomadas en diferentes ingenios y fincas (Ingenio Santa Ana, Finca Refugio Nuevo, Finca Guanipa La Unión, San Bonifacio, Finca El Paso Chiquimulilla y El Retazo La Gomera) y 10 muestras de ARN y un control positivo fueron donados por el laboratorio de biotecnología de CENGICANÑA. Se tomaron muestras de plantas jóvenes o en etapa de macollage (Junio 2014) y plantas adultas en etapa de maduración (Diciembre 2014)

2. **Colecta de muestras:** Durante el muestreo se utilizó pantalón de tela gruesa, camisa de manga larga y zapatos adecuados para el campo, esto es para evitar cortes. Las precauciones que se deben tomar en cuenta durante la excursión al campo de caña son: tratar de evitar pararse sobre la caña de azúcar que fue derribada por el aire, estar alerta a hormigueros, quitar las hojas de caña de azúcar con las mangas de la camisa o guantes, estar alerta en caso de incendios, siempre llevar un celular o radio y en caso de incendio evacuar el lugar lo mas rápido posible.

El muestreo de las hojas fue realizado a conveniencia, dentro de una parcela definida se tomaron muestras de las hojas que presentaban los síntomas característicos. Los síntomas característicos del mosaico son la decoloración de la hoja, esta se caracteriza por las líneas de color amarillo pálido o verde claro. Para la toma de muestra se utilizó tijeras que fueron flameadas con etanol. Luego la hoja se cortó en secciones mas pequeñas, a modo de evitar doblarlas adentro de la bolsa hermética. Las hojas se transportaron en una hielera (~4°C), cada bolsa fue debidamente identificadas con la fecha, lugar de colecta y variedad de caña de azúcar. Se tomó hojas con síntomas de mosaico y hojas sin síntomas de mosaico como control negativo. El material vegetal se almacenó como hoja entera en refrigeradoras de 4°C y hojas trituradas en microtubos a -80°C.

3. **Extracción de ARN:** El tejido de hojas de caña de azúcar se cortó en pedazos mas pequeños y se pesó 0.1g de material vegetal. Luego en un microtubo de 2mL se congela la muestra utilizando nitrógeno liquido y es triturado utilizando un palillo de madera esterilizado. El material triturado puede ser almacenado a 4°C o es utilizado inmediatamente. Se adaptó la extracción de ARN utilizada en Locali 2003.

El primer paso para la extracción es mezclar el material vegetal con 500µL de solución de lavado (EDTA 1mM, NaCl 2M, BSA 0.05%(p/v) y Tris-HCl 10mM). Se agita vigorosamente y se realiza una

centrifugación a 14,000rpm durante 5 minutos. Luego de extraer con una pipeta la solución de lavado se agrega 600µL de la solución de extracción (CTAB 5%(p/v), 2-mercaptoetanol 2.5%(p/v), Tris-HCl 0.1mM y NaCl 1.4M). Luego se incubó en un baño maría previamente calentado a 55°C. Se mezcló la solución cada 10 min. Al terminar el tiempo de incubación se agrega 400µL de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se vuelve a centrifugar utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se transfiere la fase acuosa a un microtubo nuevo. Se agregó 500µL de isopropanol frío (-20°C) y 50µL de acetato de amonio 7.5M. Se mezcla por inversión y se incubó por 20min a -20°C. Se precipitó el ARN centrifugando a 14,000rpm por 5 min. Luego de decantar el sobrenadante se agregó 100µL de etanol 70%(v/v) y se incubó durante 15 min a -20°C. Se recuperó el ARN de la misma manera mencionada anteriormente y se elimina el alcohol por evaporación, incubando a temperatura ambiente durante 30-50min. Se resuspendió el pellet de ARN en 50µL de agua ultra pura o agua DEPC. Almacenar el ARN a 4°C el menor tiempo posible antes de su utilización.

4. **Cuantificación de ARN:** Para la cuantificación de ARN se utilizó una dilución de 1:200 dependiendo del valor observado se cambia la dilución para su cuantificación. Para muestras con poco ARN se utilizó una dilución 1:100. Las muestras se midieron a 260, 280 y 320nm en celdas de cuarzo de 1cm de largo. Luego se calculó la concentración del ARN asumiendo que 1 O.D. equivale a 40ng/µL. La concentración de ARN se calculó utilizando la Fórmula Número 1. Para la pureza del ARN se utilizó la Fórmula Número 2.

Fórmula Número 1. Cuantificación del ARN

$$\text{Concentración ARN} = \text{O.D. } 260\text{nm} * 40 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} * \text{Factor de dilución}$$

Fórmula Número 2. Cuantificación de la pureza del extracto de ARN.

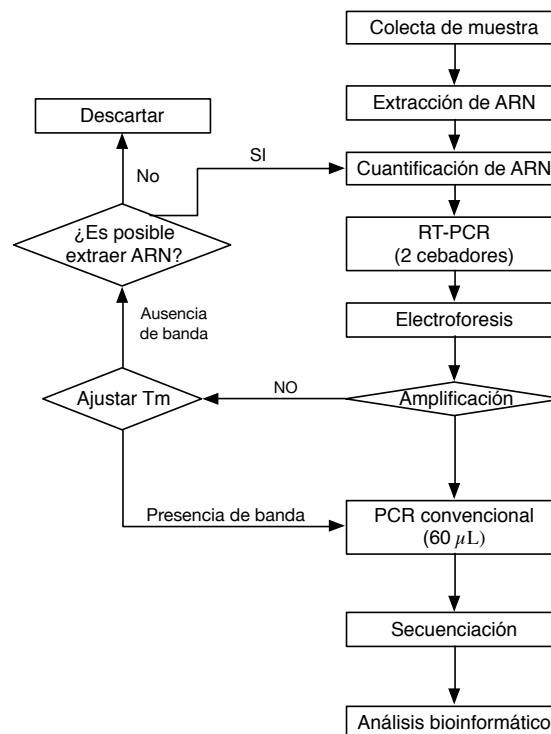
$$\text{Pureza ARN} = \frac{\text{O.D. } 260\text{nm}}{\text{O.D. } 280\text{nm}}$$

5. **RT-PCR:** Se utilizó el “One Step TR-PCR Master mix kit” de Novagen para la transcripción reversa del ARN, se utilizó una enzima recombinante capaz de amplificar fragmentos de ARN y ADN. Se siguió las instrucciones del fabricante con los siguientes cambios. El volumen de reacción sugerido por el fabricante fue de 50µL. Se utilizó la mitad y un cuarto del volumen recomendado para aumentar el número de muestras que pueden ser analizadas. Para una reacción con volumen final de 50µL se agregó 25µL de 2X One Step RT-PCR Master Mix, 2.5µL de Mn(OAc)₂, 2µL de los cebadores F y R. Las concentraciones de trabajo para los cebadores fueron: () y 2µL de muestra de ARN.

El programa de la termocicladora utilizado fue el siguiente: 30 segundos 90°C para la activación de la polimerasa, 30 minutos a 60°C para la transcripción reversa, 1 minuto a 94°C para su desnaturalización , luego 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 1 minuto a 72°C, por ultimo se incubó 7 minutos a 60°C.

6. **PCR convencional:** Se utilizó una enzima no recombinante para reducir los costos y generar un mayor volumen del producto de PCR que se utilizó en la secuenciación. Las muestras fueron diluidas 1:20 utilizando agua para PCR o agua ultrapura. Para preparar una reacción con un volumen de 12.5µL se agregó 6.05µL de agua para PCR, 1.25µL de buffer para PCR suplementado con 2.5mM de MgCl, 1µL de dNTPs, 1.0µL de cada cebador y 0.2µL de Taq Polimerasa. Por ultimo se agregó 2.0µL de ADNc diluido 1:20. El programa de la termocicladora fue: 3 minutos a 94°C, después 35 ciclos de 30segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 1 minuto a 72°C, por último se incubó la muestra durante 7minutos a 60°C. Se generó 60µL del producto de PCR que fue utilizado en la secuenciación

Figura 10. Metodología para la detección de SCMV en hojas de caña de azúcar.



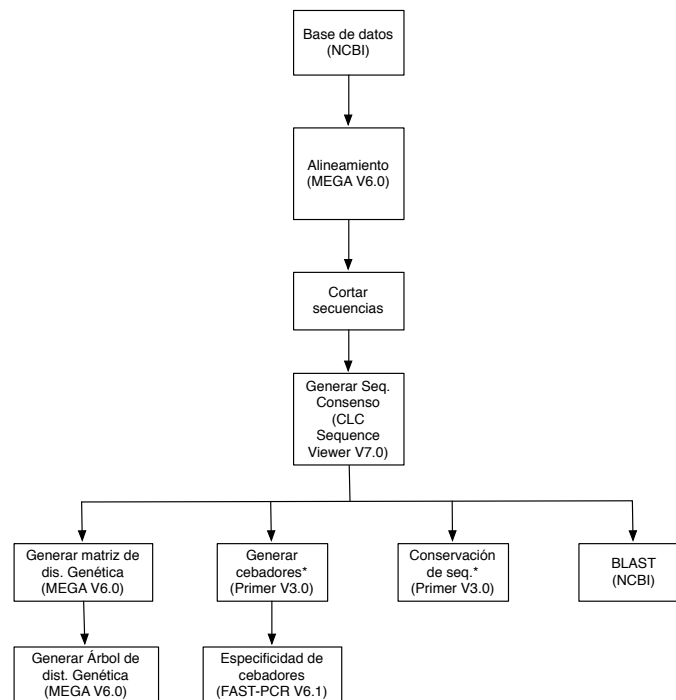
7. **Electroforesis:** Para visualizar el producto de PCR se utilizó geles de agarosa al 2%(p/v) preparados con TAE 1X. para observar las hebras de ADNc se agregó 1.0µL de GelRed previo a que polimerizara el gel. Se dejó polimerizar el gel durante 30min, se cargaron las muestras utilizando LoadingDye, se compararon los fragmentos contra la escalera PCR Markers. Se utilizó buffer TAE 1X al

momento de correr el gel y las condiciones de corrida fueron: 90V,500Ma,60-90Min. El tamaño de las bandas varia dependiendo de los cebadores utilizados. El tamaño de las bandas puede ser obtenido por el análisis bioinformático.

8. **ELISA:** Como método de confirmación se solicitó la detección por ELISA de SCMV al laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala para la detección de diez muestras de hojas de caña de azúcar.

9. **Análisis de las secuencias de las bases de datos:** Se utilizó la herramienta de búsqueda avanzada en la página www.ncbi.nlm.nih.gov para la obtener secuencias de la cápside del SCMV. Se utilizó 85 secuencias que generaban el resultado de una búsqueda específica. Además se agregó dos secuencias que no aparecían en el resultado de búsqueda pero se encontró por su número de acceso. Se obtuvo las secuencias en formato FASTA y luego se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW. Se editaron las secuencias para generar fragmentos continuos del mismo tamaño. A partir de esta matriz de secuencias alineadas se dedujo la secuencia consenso que fue utilizada en análisis posteriores.

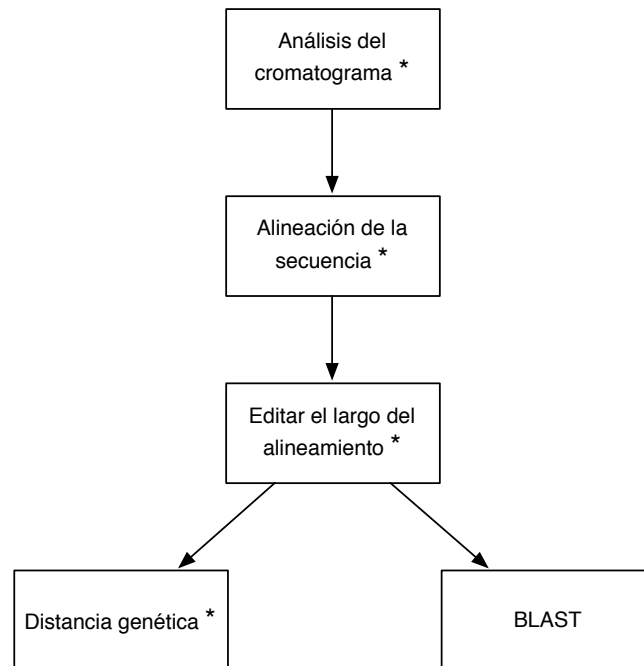
Figura 11. Metodología propuesta para la deducción, análisis y uso de la secuencia consenso.



10. **Análisis de la secuencia y su clasificación:** El primer paso para poder clasificar la secuencia es el análisis del cromatograma. En el análisis del cromatograma se observa la altura del pico,

la separación de estos y la presencia de múltiples picos. Es característico de las primeras posiciones un cromatograma que estos posean picos múltiples o picos no definidos. Se buscó picos definidos y separados entre sí. Se observó la base de la gráfica para observar el nivel del ruido o contaminación por otros fragmentos. Es poco común observar errores de la computadora en la interpretación de los picos, sin embargo se revisa toda la secuencia en búsqueda de errores cometidos por el programa. Cuando existen picos múltiples se compara con el ruido de la línea base, si es mayor se asume que es un polimorfismo. Las bases de los picos no deben traslaparse, cuando esto sucede se asumió que los datos no son confiables. Por último se puede truncar la secuencia cuando esta posee muchos errores. Se eligió la región con los picos de mejor calidad además de analizar en la secuencia la posición *in silico* de los cebadores. Luego de obtener la secuencia esta se alinea y se recorta la matriz de secuencias. Esta matriz truncada se utilizó para determinar la distancia genética y la identidad genética.

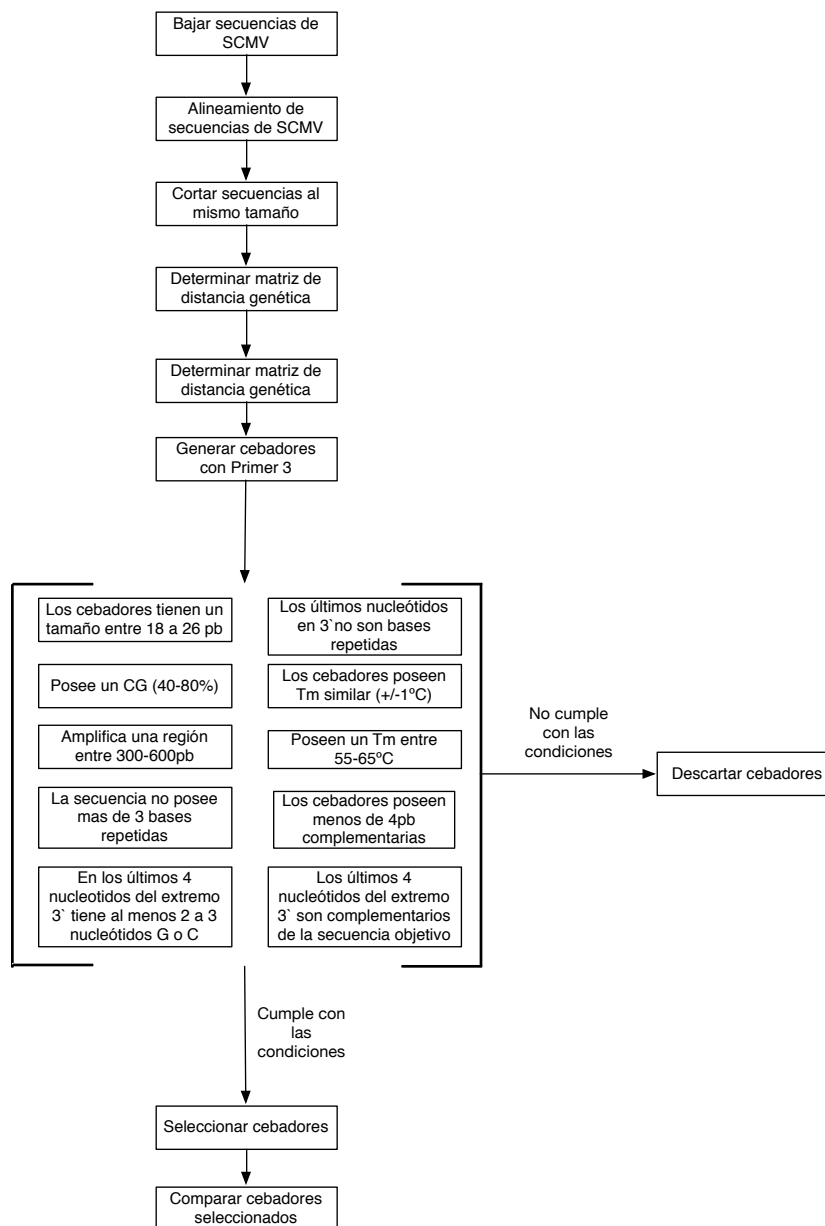
Figura 12. Análisis propuesto para la clasificación del fragmento secuenciado.



* MEGA 6.0

11. **Deducción de secuencias de cebadores:** A partir de la secuencia consenso se utilizó el programa Primer 3 en la página web <http://primer3.ut.ee/>. Luego se ingresó los parámetros de análisis como el tamaño del cebador, concentración de CG, Tm, tamaño del fragmento esperado y el número de resultados. A partir del número de cebadores propuestos por el programa se eligió el cebador que teóricamente tiene la mejor capacidad para la detección de la cápside de SCMV.

Figura 13. Análisis de cebadores generados a partir de la secuencia consenso.



VI. RESULTADOS

Para determinar la especificidad de los cebadores se analizó por PCR *in silico* 87 secuencias de nucleótidos para la cápside de SCMV, 10 secuencias de SrMC y 10 secuencias de Yellow streak virus con los cebadores SCMV-R860 y SCMV-F860. Se determinó que los cebadores son específicos para la amplificación de la cápside viral de SCMV, no se muestran los datos, se puede observar un ejemplo del PCR *in silico* en la Figura 21 en la sección de anexos. Además se encontró una baja tasa de detección para secuencias reportadas de SCMV en el PCR *in silico*. La lista con los números de acceso para las secuencias de la cápside de SCMV se encuentra en el cuadro 3 de la sección de anexos. El análisis *in silico* se resume en el Cuadro 2 donde se comparó ambos cebadores.

Cuadro 2. PCR *in silico* de ochenta secuencias de ADN de la cápside de SCMV contra cebadores S400910/S400551, SCMV-F860/SCMV_R860 y SCMV2F/SCMV2R para la detección del potyvirus. Se detectaron las secuencias hasta con 3 nucleótidos no complementarios. Se utilizó el programa FastPCR V6.1.

Cebadores	Número de Detecciones	Porcentaje de Detección
S400 910 y S400 551	7	8.05%
SCMV-R860 y SCMV-F860	16	18.39%
SCMV2F y SCMV2R	68	78.16%

Para el análisis de la especificidad de los cebadores se analizaron las condiciones para la amplificación de los fragmentos específicos de SCMV. Se analizó la concentración de agarosa, el Tm de los cebadores, el volumen de las alícuotas de reacción, la contaminación y el efecto del almacenamiento de las muestras con material vegetal.

Figura 14. Muestras analizadas con los cebadores S400 551 y S400 990. (izq) Se obtiene una doble banda inesperada en la amplificación. Gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de muestras T1 a T8, Tm=60°C. (der) Se cambió la concentración de la agarosa y la temperatura de unión de los cebadores. Gel de agarosa 2.0% con las mismas muestras, Tm= 65°C.

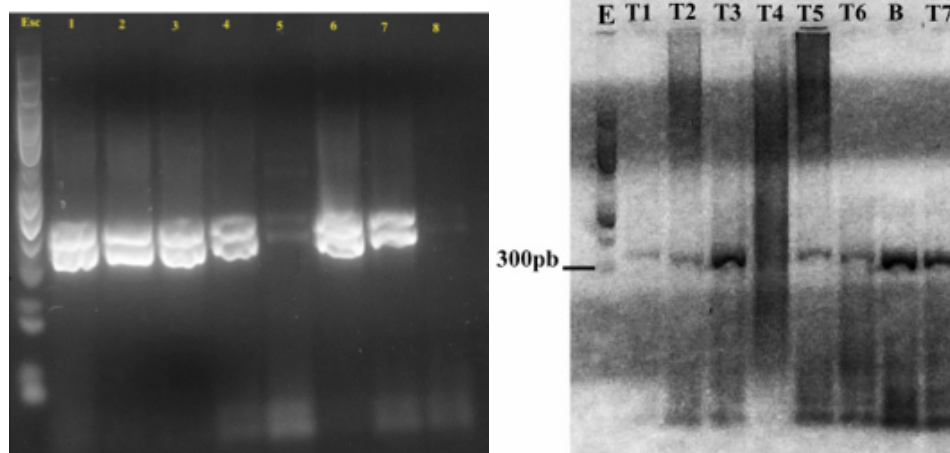


Figura 15. Determinación del volumen óptimo para la amplificación por RT-PCR. Comparación del efecto del volumen de reacción en la amplificación del fragmento los cebadores S400 551 y S400 990. Se utilizó la mitad (25 μ L) y un cuarto (12.5 μ L) del volumen recomendado. Se utilizó dos alícuotas distintas en la amplificación del control positivo utilizando un cuarto del volumen. T_m=65°C.

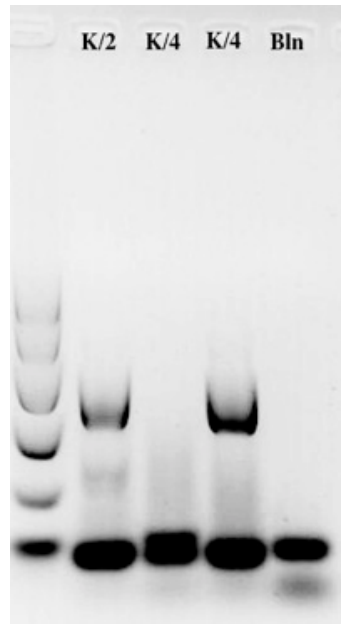
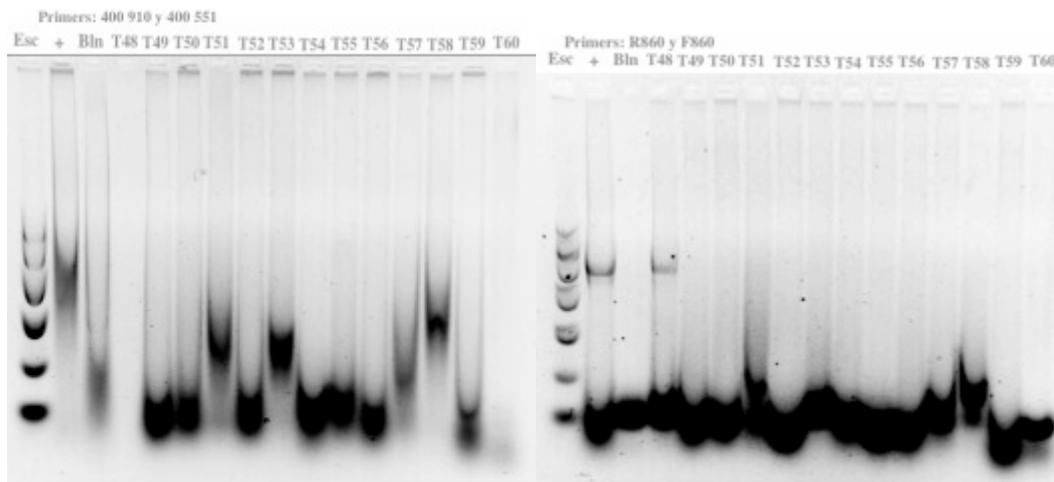


Figura 16. Comparación de los fragmentos amplificados por cebadores específicos. Amplificación de fragmentos S400 551/990 (izq) y SCMV-F/R860 (der) con extracciones realizadas adentro de un periodo de 48h. Se logró la amplificación del fragmento específico de la muestra T8 con un T_m=65°C.



La amplificación de fragmentos específicos de SCMV por ambos cebadores fue menor de lo esperado. Como se puede observar en la Figura 11 solamente se detectó una muestra positiva con un par de cebadores. Las bandas observadas con los cebadores S400 910/S400 551 indican degradación del ARN y no son concluyentes.

Figura 17. PCR convencional de los fragmentos para secuenciación. Secuencias a partir de la amplificación de los cebadores S400 551/990. $T_m=65^\circ\text{C}$. Se obtuvo la amplificación del fragmento específico de 360pb de SCMV. CAMBIAR FIGURAS 11->12

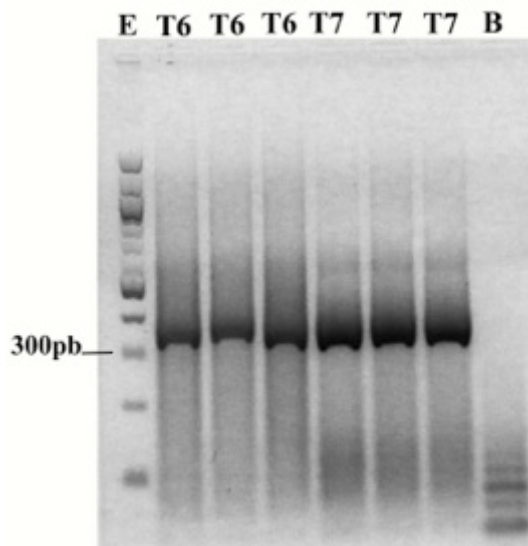
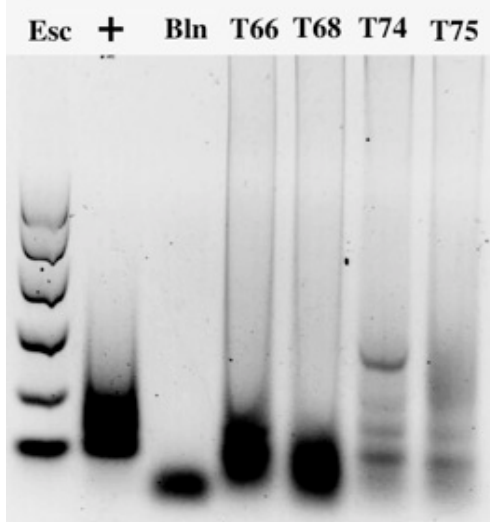


Figura 18. Amplificación del fragmento con los cebadores SCMV-F/R860.



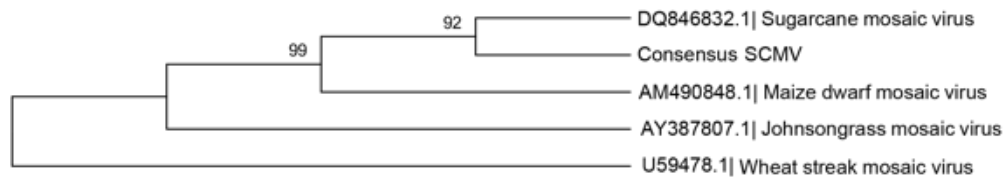
Cuadro 3. Detección del SCMV por anticuerpos dirigidos a la cápside viral. Se realizó dos mediciones de las muestras en el lapso de dos horas. Las muestras positivas se calcularon como dos veces la desviación estándar del control positivo. Para las primeras mediciones $T=1\text{h}$ la desviación estándar fue de: 0.049, 0.042 y 0.0035 para WSMV, MDMV y SCMV respectivamente. Para las mediciones $T=2\text{h}$ la desviación

estándar fue de 0.0410, 0.0346, 0.0049 y 0.0643 para WSMV, MDMV, SCMV y potyvirus general. Las muestras positivas fueron para Potyvirus general muestras 66, 67, 69, 70, 71, 72 y 74. Las muestra positivas se muestran como casillas resaltadas.

	1Hora			2Horas			
	WSMV	MDMV	SCMV	WSMV	MDMV	SCMV	General
Blanco	0.1050	0.1140	0.1310	0.1085	0.1170	0.1595	0
C-	0.1065	0.1290	0.0750	0.1130	0.1405	0.0900	0.279
C+	3.2455	1.8705	0.2715	3.7830	2.5605	0.3745	1.7735
66	0.1155	0.1225	0.1575	0.1235	0.1325	0.1955	1.7335
67	0.1120	0.1765	0.1965	0.1160	0.2105	0.2610	2.1265
68	0.1045	0.1420	0.1355	0.1085	0.1585	0.1700	1.1325
69	0.1140	0.1635	0.1705	0.1190	0.1915	0.2195	1.9175
70	0.1150	0.1780	0.1850	0.1200	0.2110	0.2365	2.1365
71	0.1100	0.1445	0.1560	0.1125	0.1625	0.1980	1.967
72	0.1105	0.1510	0.1580	0.1130	0.1715	0.1995	2.1145
73	0.1115	0.1585	0.1795	0.1175	0.1840	0.2315	1.579
74	0.1160	0.1805	0.2130	0.1215	0.2135	0.2835	1.9635
75	0.1130	0.1410	0.1390	0.1165	0.1555	0.1700	1.476

La secuencia consenso se dedujo a partir de la alineación de las 87 secuencias. Se utilizó el programa CLC “Sequence Viewer” para el alineamiento de las secuencias. De esta secuencia consenso se eligió el fragmento donde las secuencias se encuentran conservadas. Esta región esta delimitada desde la posición 841 a 1745 de la secuencia consenso en la Figura 17 de área de anexo. Esta secuencia consenso se comparó con los dos cebadores utilizados en el análisis. Se encontró que los cebadores S400 910/551 amplificaban una región de 360pb.

Figura 19. Árbol filogenético de la secuencia consenso. Se utilizó el modelo de Tajima Nei para producir la matriz de distancia genética, se utilizó el método de “Neighbor Joining” con bootstrap de 1000



Con la secuencia consenso se pueden realizar análisis para proponer cebadores nuevos. Con el diagrama de flujo propuesto para el análisis *in silico* se podrían realizar posteriores investigaciones. El análisis puede ser utilizado para analizar secuencias nuevas de diferentes organismos.

Figura 20. PCR *in silico* de la secuencia consenso.

In silico Primer(s) search for: 1		
scmv860 r 5'-agatcttctgggtctcgcgacatttcc	s400 910 r 5'-agtcaaaggcataccgcgcta	s400 551 f 5'-acacaaggaaccagagagg
Position: 832<-852 72% Tm = 60.1°C	Position: 707<-727 98% Tm = 55.9°C	Position: 368->388 100% Tm = 56.3°C
<-cctttacagccgctctgggtccttctaga-5 acggaaatgtcggcgagaccag	<-atcgcgccatacggaaactga-5 : cttagcgcggtatgcatttgacttta	5-acacaaggaaccagagagg-> aaacacaaggaaccagagaggatt
>s400 551 f 368->388 5'-acacaaggaaccagagagg >scmv860 r 832<-852 5'-agatcttctgggtctcgcgacatttcc PCR product size: 493bp Ta=63°C	>s400 551 f 368->388 5'-acacaaggaaccagagagg >s400 910 r 707<-727 5'-agtcaaaggcataccgcgcta PCR product size: 360bp Ta=63°C	

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la determinación de la especificidad de los cebadores para la secuencia de la cápside de SCMV se realizó un análisis *in silico* de los cebadores con las secuencias virales en NCBI. Se evaluó las condiciones del PCR para la detección del virus por medio de cebadores (S400 551 y S400 990) y (SCMV-F860 y SCMV-RR860) diseñados para detectar SCMV. Por último se analizó con herramientas bioinformáticas las secuencias de la cápside de SCMV, a partir de una base de datos en la computadora obtenida de NCBI para proponer cebadores específicos de SCMV.

Para el análisis bioinformático de los cebadores se analizó 87 secuencias obtenidas de NCBI (Cuadro 2) y se incluyó las secuencias que se utilizó en Viswanathana 2010 (DQ343236; DQ842503; EF655889; U57354; U57355; U57356; U57357). Se alineó las secuencias en el programa MEGA 5.2.2, se utilizó el algoritmo ClustalW y con un costo por espacio de 8.0 y extensión del espacio de 3.2. Los espacios se introducen en base a los algoritmos en la alineación de múltiples secuencias de ADN para mejorar el alineamiento de las mismas secuencias. El algoritmo decide si en una misma posición de la secuencia pueden estar dos nucleótidos distintos (ej. A y G) o si la mejor opción es insertar un espacio. Los espacios son utilizados para ajustar el alineamiento de varias secuencias (Carroll 2006). El costo de los espacios y extensión permitió obtener las notas mas bajas de parsimonia cuando se realizan los arboles filogenéticos. Por esta razón se utilizó los valores de costo por espacio y costo de extensión sugeridos en Carroll 2006.

Se evaluó la eficiencia *in silico* de los cebadores realizando el PCR con el programa Primer Digital FastPCR V6.5. Se analizaron 87 secuencias y los resultados se resumen en el cuadro 2. Se obtuvo una baja tasa de identificación de los cebadores para todas las secuencias seleccionadas. Se encontró que solo el 18.39% de las secuencias analizada eran detectados por los cebadores. Los Potyvirus tienen la característica de poseer una alta tasa de mutación debido a su mecanismo de replicación adentro de un hospedero. Las diferentes cepas de SCVM suelen encontrarse dentro de áreas geográficas o el brote de nuevas cepas que invaden a una variedad en específico de caña de azúcar (Bedoya 2011 y Gonçalves 2012). Es por esto que los cebadores desarrollados para el estudio de un virus adentro de un área geográfica pueden no ser los mas óptimos para ser utilizados en un área distinta. No se recomienda utilizar estos cebadores como método de vigilancia para SCMV. Existen medidas preventivas para detectar y eliminar enfermedades de las variedades de caña importadas. Los cebadores utilizados en una región geográfica específica, como en India, pueden no ser los mas adecuados para detectar el mismo virus en Guatemala.

Aunque la tasa de identificación de las secuencias de SCMV encontrada por el análisis *in silico* es bastante baja por ambos cebadores, previamente se han utilizado los cebadores S400910/550 y se ha reportado en el laboratorio de CENGICANÑA una tasa de identificación satisfactoria. Los cebadores SCMV-F/R860 no habían sido utilizados previamente, pero su alta especificidad para detectar solamente SCMV los convirtió en el mejor candidato para comenzar la detección.

Se tomó 85 hojas de caña de azúcar con síntomas de mosaico en el área de Escuintla y Chiquimulilla. Se recolectó 48 muestras de la colección nacional de CENGICAÑA de variedades de caña de azúcar nacionales e importadas, 27 muestras fueron donadas por el Licenciado Werner Ovalle recolectadas en Finca Esperancita, Ingenio Santa Ana Finca Jaronu el Salto, Finca Refugio Nuevo, Finca Guanipa La Unión, San Bonifacio, Finca El Paso Chiquimulilla, Finca Montealegre, El Retazo La Gomera y 10 muestras de ARN fueron tomadas como control positivo donadas por el laboratorio de CENGICAÑA. Las hojas se seleccionaron según los síntomas manchas cloróticas verticales, se observó que el tallo no estuviera roto y se tomó las plantas que poseen mosaico en todas las demás hojas.

El material vegetal de las muestras T13 a T36 fueron almacenadas a 4°C durante seis meses. Se observó tendencia a la disminución en la concentración de ARN del material fue almacenado durante 6 meses (ver cuadro 4 en anexos). Esto se debe a la degradación del ARN debido a nucleasas o especies reactivas de oxígeno generadas como respuesta de la planta cuando esta es dañada mecánicamente. Además se analizó la pureza de la extracción de ARN. No se observó una tendencia en la pureza de la extracciones para las muestras almacenadas. Pero se observó una tendencia de las extracciones a tener una razón 260/280nm mayor a 2.0. Cuando la razón de absorbancia de 260/280nm se encuentra dentro del rango 1.8 a 2.0. Los puntos que se encuentran por debajo de 1.8 generalmente es por contaminación por trazas de fenoles que son añadidos durante la extracción y proteínas que se encuentran naturalmente en el tejido (NanoDrop 2007 y Barbas 2001). La absorbancia de la razón 260:280 es similar a la media de la absorbancia de las fracciones de los nucleótidos involucrados. La guanina posee una razón 260/280 de 1.15, adenina 4.50, citosina 1.51, uracilo 4.00 y timina 1.47. En las extracciones de ARN que poseen un valor superior a 2.0 se debe a una alta presencia de Uracilos en la matriz o debido a que la secuencia posee una alta cantidad repetida de Uracilos (NanoDrop 2007). Se recomendó utilizar un paso previo de purificación de ARN para mejorar la pureza del ARN después de la extracción.

Las variables analizadas para el RT-PCR fueron el diseño de los cebadores, la enzima adecuada para la reacción, temperatura de fusión o T_m (melting temperature), concentraciones de los reactivos, contaminación, volumen de reacción y cantidad de ARN. Se decidió utilizar el kit One Step RT-PCR de Novagén por su enzima recombinantes *Thermus thermophilus* (rTh) polimerasa que tiene una afinidad hacia ARN como ADN (Novagen 2008). Se utilizó la concentración de acetato de manganeso sugerida por el fabricante (50mM). Se reportado el uso de esta enzima recombinante con el magnesio mejora significativamente la eficiencia de una amplificación en comparación de la enzima Taq pol con magnesio (Myers and Gelfand, 1991).

Se determinó que la temperatura óptima para la amplificación de ambos fragmentos es a 65°C. Como se observa en la Figura 9. Las variables que se analizaron para lograr una amplificación exitosa fueron: contaminación, temperatura y flujo de trabajo. Como se observa la doble banda en la Figura 9 (izq), se

aumentó la temperatura de anillamiento 5°C. Esto mejoró la especificidad de la amplificación. Al aumentar mucho la temperatura se reduce el rendimiento del PCR obteniendo menor producto del esperado.

Como parte del análisis se buscó reducir el volumen de reacción para aumentar la utilidad del kit. Para esto se evaluó la eficiencia de amplificación utilizando 25µL y 12.5µL, es posible detectar fragmentos utilizando volúmenes muy pequeños (Gaines 2002). Como control positivo se amplificó un control positivo donado por el laboratorio de CENGICANÑA. En ambas reacciones se agregó 200ng de ARN. Se observó amplificación de los fragmentos en ambos volúmenes de reacción sin diferencia. No se modificó la cantidad de ARN utilizado debido a las cuantificaciones con bajo rendimiento.

Se obtuvo una baja tasa de identificación de todas las muestras analizadas, de las 85 muestras analizadas solo se encontró 3 muestras positivas. Se realizó un ELISA para comparar las amplificaciones realizadas por el PCR. El ELISA (Cuadro 3) logró identificar que los síntomas de las hojas de caña de azúcar se deben a la presencia de algún potyvirus y al mismo tiempo se descartó la presencia de SCMV. Debido a que no se poseen los anticuerpos para JGMV o SrMV no se puede confirmar por cual de los virus esta infectado. Se recomienda iniciar analizando con el método de ELISA, luego de identificar las muestras positivas amplificar con los cebadores específicos de RT-PCR. De esta manera se asegura que una muestra sea verdadera negativa.

Las fuentes de error detectadas durante el procesamiento de la muestra y el PCR fueron: El tiempo que toma procesar una muestra desde que es tomada en el campo hasta el momento de la extracción. Inicialmente las muestras se almacenaron varas semanas y algunas varios meses. Se puede observar una tendencia de la concentración del ARN extraído de muestras almacenadas en -80°C y 4°C (T13-T36) figura 18 en anexos (muestras T76-T85). Sin embargo no se observa diferencia en las concentraciones almacenadas en -80 con el material cuyo ARN se extrajo el día de la colecta (T48 a T75). Se recomienda extraer el ARN inmediatamente o guardar el material vegetal a -80°C para obtener la mayor concentración de ARN.

Análisis de las muestras T1 a T10 mostraron amplificación cuando se inició el análisis. En la Figura 9 se puede observar la disminución del tamaño de las bandas. Debido a la pérdida de integridad del ARN se decidió volver a extraer ARN de material vegetal almacenado. Se logró obtener amplificación de las muestras T6 y T7. Estas se amplificaron utilizando un PCR convencional en triplicado. Se descartó la secuencia de la muestra T7 debido a que la información no era suficiente y la secuencia fue contaminada con una muestra de salmón en el momento de la secuenciación. Se obtuvo una secuencias en sentido positivo y negativo con el cebador S400-551 y una secuencia en sentido positivo con el cebador S400-910. Se realizó un BLAST de las secuencias en el sitio NCBI.com, se encontró que 2 fragmentos del cebador

S400 551 en sentido positivo y negativo fueron detectados como SCMV y solo se identificó un fragmento en sentido positivo para el fragmento S400 910.

En la Figura 23 en anexos se puede observar que hay migración de fragmentos más pequeños junto con los tintes en la posición 0 a 93 y en la posición 338 a 400, estos producen señales se caracterizan por tener varios picos o picos no definidos. Luego se observan picos definidos bastante altos, posiciones 93-338. Esta región será utilizada para definir la secuencia. En el fragmento del cebador s400 551 negativo (figura 24, anexo) se obtuvo una secuencia mas grande de lo esperado. Cuando se obtienen fragmentos mas grandes de lo esperado puede ser por dos razones. Primero el alineamiento de los *contigs* generados fueron mal interpretados por el programa y se generó una secuencia de mayor tamaño, por la presencia de secuencias que contaminan la muestra. Es muy probable que la fuente de contaminación en la secuencia es la presencia de una segunda cepa de SCMV, una co-infección de cepas de SCMV en una misma planta. Pero con la información disponible no es posible determinar el número de cepas que co-infectan a la planta. La contaminación son secuencias del mismo tamaño que poseen un cromóforo distinto o secuencias de un menor tamaño que no fueron separadas por el gel. Además de esto se observa una región donde los picos se encuentran los suficientemente separados. Esta secuencia de 210 a 561 con que se utilizó para los análisis posteriores. La secuencia de la Figura 25 es muy corta y los niveles del cromatograma son muy bajos, esta secuencia no se utilizó. Con la herramienta en línea de NCBI se realizó un BLAST de las secuencias y se determinó que las secuencias pertenecen a SCMV. Sin embargo no hay suficiente información de la secuencia para determinar la cepa. La secuencias obtenidas a partir del cromatograma son muy cortas para estimar distancia genética. Como se puede observar en la Figura 27 de la sección de anexo la secuencia se encuentra afuera del grupo de SCMV. Se necesitaría mas secuencias de SCMV de Guatemala para lograr comparar las secuencias y clasificarlas.

Para determinar la cepa viral de acuerdo a la secuencia de ADNc se comparó contra las secuencias obtenidas de NCBI reportadas para las cepas. Estas cepas fueron reportadas en diferentes países como se muestra en la tabla de la sección de anexos. Utilizando el programa MEGA se determinó cual es el mejor modelo para analizar las secuencias de ADN. La matriz de distancia genética con el modelo de Tajima Nei, el mismo árbol se utilizó para generar un árbol filogenético y se determinó que la secuencia no parece pertenecer a ninguna cepa ni a la especie SCMV (Figura 27 anexos) se recomienda obtener secuencias nuevas para SCMV de Guatemala.

Para la generación de nuevos cebadores de SCMV se utilizó la secuencia consenso generada por 87 secuencias para la cápside viral del SCMV. Se obtuvo una secuencia consenso de 840pb del alineamiento de estas secuencias, en la Figura 17 se muestra el nivel de conservación para cada nucleótido. El programa asigna un nucleótido cuando este se encuentra en mas del 50% de las secuencias comparadas. En casos donde el alineamiento produce espacios este porcentaje de conservación baja considerablemente y no se

asigna ningún nucleótido. En la Figura 16 se muestra la secuencia consenso con nomenclatura IUPAC (Cuadro 1, antecedentes). En esta secuencia se pueden visualizar los posibles nucleótidos que fueron encontrados en cada posición de las secuencias alineadas. Esto es importante para las posiciones donde el nivel de conservación es muy cercano a 50%, indicando la posibilidad que comparta otro nucleótido en el mismo lugar. Adentro de esta región consenso se determinó que las posiciones con mayor contenido de conservación son aquellas las que poseen un nivel de conservación arriba del 90%, Figura 17.

El primer análisis para determinar que la secuencia consenso es específica de SCMV se realizó el árbol filogenético de la secuencia consenso se utilizó el modelo de Tajima Nei por que toma en cuenta la composición de cada nucleótido y en cada secuencia y mejora el calculo de distancia genética (Tajima 1984). Este árbol filogenético demuestra que la secuencia consenso es diferente de los Potyvirus comparados. El principal problema de proponer una secuencia consenso es la gran variabilidad genética de los Potyvirus. Los cebadores propuestos se encuentran en posiciones donde la mayoría de los nucleótidos tienen un nivel de conservación mayor que 80%. Los cebadores generados se analizan por el tamaño del fragmento generado, estabilidad, similitud en T_m y contenido GC. Los cebadores elegidos utilizando el programa Primer3 son: SCMV2F (5' CAG GAG GCC AAA GAG ACA AGG A `3), $T_m=61.95$, GC=54.55% y SCMV2R (5'TTT GCC GGA ATG TTG GAG ATG C `3), $T_m=62.04$, GC=50.00%. Estos cebadores amplifican una región de 392 pb. Se propuso el diagrama de flujo de la F11 en la sección de metodología. Aunque el programa tiene los algoritmos necesarios para comparar y mostrar un número de secuencias óptimas, el investigador debe decidir cuáles debe descartar o conservar.

VIII. CONCLUSIONES

- En el análisis *in silico* los cebadores SCMV-F860 y SCMV-R860 y S400 910 S400 551 se determinó que los cebadores son específicos para SCMV, sin embargo su bajo nivel de detección podría no ser los adecuados para ser utilizados en vigilancia de SCMV.
- Se logró optimizar el método de detección de SCMV con los cebadores SCMV-F860 y SCMV-R860 y se logró identificar una muestra positiva.
- Se identificaron los factores para obtener la mayor concentración de ARN en la extracción.
- Se logró identificar la especie del virus tomando como referencia su secuencia de la cápside.
- No se logró determinar la cepa del virus debido a la falta de información.
- La detección de SCMV fue muy baja para ambos cebadores.
- Se logró proponer cebadores nuevos con base a la secuencia consenso de 87 secuencias de SCMV, para aumentar las posibilidades de detección por RT-PCR.

IX. RECOMENDACIONES

- Para asegurar obtener la mayor cantidad de ARN luego de tomar la muestra se sugiere realizar la extracción de ARN cuanto antes. En el caso estas muestras serán almacenadas por un largo periodo de tiempo almacenar el material vegetal en micro tubos a -80°C
- En análisis posteriores a SCMV por RT-PCR se sugiere seleccionar las muestras positivas realizando una prueba de ELISA.
- En análisis posteriores los cebadores SCMV2F/SCMV2R podrían ser de gran utilidad para la detección de SCMV.
- Para evitar contaminación cruzada de las muestras y evitar la degradación de ARN se sugiere trabajar en campana o asegurarse que el laboratorio tenga estaciones definidas de trabajo.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, George N. (2005). *Plant Pathology*. 5ta edición. Estados Unidos de América. Elsevier Academic Press. 912 págs.
- Barbas, C. *et al* (2001). Quantitation of DNA and RNA. Cold Spring Harb. Protoc. Recuperado el 10 de Abril del 2014 de la página de internet de <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.full>
- Bedoya, G. *et al* (2011). *Short distance movement of genomic negative strands in a host and nonhost for Sugarcane mosaic virus (SCMV)*. Virology Journal. 8(15):1-8
- Benítez, A. M. y Braunbeck, O. A. (2011) *Comportamiento físico-mecánico de un biomaterial sometido a bajas cargas*. *Ingeniería mecánica*. 14(1): 65-73.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer L. (2002) *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman. 5ta edición. Sección 27.2, DNA Polymerases Require a Template and a Primer. Recuperado el 3 de febrero del 2014 de la página de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22374/>
- BSES. (2012). *Sugarcane mosaic*. Australia. bses.com.au. 2 Págs.
- Carroll, H. *et al* Effects of Gap Open and Gap Extension Penalties. Brigham Young University.
- Cheng, Y. (2008). *HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in-vivo and in planta*. Journal of General Virology. 89:2046- 2054.
- Comstock, J. y Gilbert R. (2009) *Sugarcane Mosaic Virus Disease: Symptoms*. University of Florida. Recuperado el 9 de enero del 2013 de la página de internet: <http://ufdc.ufl.edu/IR00003412/00001>
- Cronjé, C.P.R, Bachet, G.R. y Bailey, R.A. (1994) «*Symptom expression of sugarcane mosaic virus (SCMV) and associated effects on sugarcane yield*» Proceedings of The South African Sugar Technologists. 8-15
- Dardón, Elena María. (2006). *Diagnóstico molecular del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Guatemala*. Universidad del Valle.: Facultad de Ciencias y Humanidades. 85 págs.
- Dong, Y. y Zhu, H. (2005). *Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice*. Methods Mol. Med. 108: 149-157
- Espinoza, Gerardo. 2012. «*Enfermedades de la caña de azúcar*» El Cultivo de Caña de Azúcar en Guatemala. Litografías Modernas S.A. págs. 260-277.
- Estéves, A. A. *et al* (2013) *Biología*. Capítulo: Morfología de la Caña de Azúcar. Recuperado el 3 Diciembre 2013 de la página de internet: http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seridados/libro_el_cultivo_cana/libro_p31-62.pdf
- [Gaines, M. et al \(2002\) Reduced Volume PCR Amplification Reactions Using the AmpSTR Profiler Plus Kit. J.Forensic Sci. 6\(47\):1-14](#)
- [Gonçalves, M. C., et al \(2012\) «Virus Diseases of Sugarcane. A Constant Challenge to sugarcane Breeding in Brazil.» Functional Plant Science and Biotechnology 6\(2\):108-116.](#)

- Gianotto, A. C. *et al* (2011) *Sugarcane (Saccharum X officinarum): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil*. *Tropical Plant Biology*. 4:62-89
- Guo, D. (2001) *Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system*. *Journal of General Virology*. 82:935-939
- James, Glyn. (2004). *Sugarcane*. 2ª edición. Estados Unidos. Blackwell Science Ltd. 244 págs.
- Jones, Neil *et al* 2009. «Markers and mapping revisited: finding your gene». *New Phytologist*. 183 (4): 935-966.
- Jó, Wendy Karen. (2010). Utilización de la técnica Polimorfismos de Conformación de Cadena Individual como herramienta para la detección de mutaciones puntuales en los genes EVC y EVC2 implicados en el síndrome de Ellis van Creveld. Universidad del Valle de Guatemala.: Facultad de Ciencias y Humanidades. 105 págs.
- Joubert, Debra. (2006). Manipulation of Neutral Invertase Activity in Sugarcane.
- King, A., Lefkowitz, E., Adams, M. y Carstens, E. (2011) «Virus Taxonomy: Ninth Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.» Elsevier. Pags:1069-1089
- Larrahondo, E y Villegas, F. sin fecha de publicación. Control y características de maduración. Consultado el 3 de junio del 2013, Disponible en: http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seriados/libro_el_cultivo_cana/libro_p297-313.pdf
- Lastra, L.A. (2004). Biología de *Sipha flava* (forbes) en tres hospederos y algunas observaciones preliminares sobre predadores. Memorias. Recuperado el 17 de noviembre del la página de internet: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CIDCA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000540>
- Locali, E.; J. Freitas-Astua; R. Antonioli; E. Kitajima y M. Machado. 2003. «Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas». *Plant Disease* 87(11): 1317-1321.
- Mandadi, K. (2013) Plant Immune Response Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease?. *The Plant Cell*. 25:1489-1505
- Myers, T. y Gelfand, D. (1991) «Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase». *Biochemistry* 6(30): 7661-7666
- NanoDrop (2007). 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. NanoDrop Technologies, Inc. Recuperado el 10 de abril del 2014 de la página de internet: http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf
- NCBI (2014). PCR: Introduction. Recuperado el 3 de febrero del 2014 de la página de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>
- Novagen (2008). One-Step RT-PCR Master Mix kit. EMD Chemicals Inc.
- Ovalle, Werner. (2012). «Enfermedades de la caña de azúcar» *El Cultivo de Caña de Azúcar en Guatemala*. Litografías Modernas S.A. págs. 252.

- Nájera, Arnoldo Font. (2007). Detección de Biotipo Q de *Bemisia tabaci* en tomate mediante marcadores de ADN Mitocondrial. Universidad del Valle de Guatemala.: FODECYT No. 25-2007. 96 págs.
- Orozco, Oscar Castro *et al* (2010). *Variedades en la Novena Prueba Regional de CENGICANA en Plantía, Primera y Segunda SOCA*. Memorias 2011-2012 Programa de variedades CENGICANA. 145 Págs.
- Perera M.F.*et al* (2009) «Genetic diversity among viruses associated with sugarcane mosaic disease in Tucumán, Argentina.» *Phytopathology* 99, 38-49
- Quemé, Jose Luis y Espinoza, G. (2012). « Enfermedades de la caña de azúcar» *El Cultivo de Caña de Azúcar en Guatemala*. Litografías Modernas S.A. págs. 282-291.
- Romero, E. R. (2012) Fases Fenológicas: Caña de Azúcar EEAOC. Recuperado el 4 noviembre 2013 disponible en: virologyj.com/content/8/1/15
- Rybicki, Edward P. y Pietersen, G. (2012). *Plants Virus Disease Problems in the Developing World*. Department of Microbiology University of Cape Town y Plant protection Research Institute. South Africa. 60 Págs.
- Saeys, Y. *et al* (2007). A review of feature selection techniques in bioinformatics. *Bioinformatics* 19(23):2507-2517
- Singh, M. (2005). Transmission Studies on an Indian Isolate of Sugarcane Mosaic Potyvirus. *Sugar Tech.* 7(2&3):32-38
- Sharma, P. D. (2004). *Plant Pathology*. Rastogi Publications. 468 Págs.
- Shukla, D. *et al* (1989) « Taxonomy of Potyviruses Infecting Maize, Sorghum, and Sugarcane in Australia and the United States as Determined by Reactivities of Polyclonal Antibodies Directed towards Virus-Specific N-Termini of Coat Proteins». *The American Phytopathological Society* 2(79):223-229
- Smith, Grant R. (1994). «Detection of Sugarcane Mosaic Virus and Fiji Disease Virus in Diseased Sugarcane using the Polymerase Chain Reaction». *Plant Disease*. 78:557-561
- Tajima y Nei. (1984). «Estimation of Evolutionary Distance Between Nucleotide Sequence». *Molec. Biol. & Evol.* 1(3): 269-285.
- Tremblay, M. N. (2005) Fotografía del pulgón amarillo. Recuperado el 31 julio 2013 en la página de internet: <http://www.bio.georgiasouthern.edu/bio-home/mondor/publications.htm>
- USDA (2013). Sugar:World Markets and Trade. Recuperado el 17 de nov de la página de internet: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/sugar.pdf>
- Vásquez, Héctor Orozco. *Censo de Variedades de Caña de Azúcar en Guatemala, Zafra 2012-2013*. <http://www.cengicana.org/es/publicaciones/memorias/memorias/memoria-2010-2011/variedades/Censo-variedades-Guatemala-zafra--2011-2012-y-proyecciones-al-2015/> [4 Abril 2013].
- Vijayapalani, P. (2012). Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PcaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathogens* 8(4): e1002639-e1002639

- Viswanathana, R., Karuppaiah, R. y M. Balamuralikrishnan. (2009). «Identification of new variants of SCMV causing sugarcane mosaic in India and assessing their genetic diversity in relation to SCMV type strains». *Virus Genes*. (39):375-386.
- Viswanathana, R., Karuppaiah, R. y M. Balamuralikrishnan. (2010). «Detection of three major RNA viruses infecting sugarcane by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (multiplex-RT-PCR)» *Australasian Plant Pathology*.(39):79-84
- Wei, T. (2010). Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intracellular movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*. 6(6): e1000962- e1000962
- Wu, L. Zu, X., Wang, S. y Chen, Y. (2012) «Sugarcane mosaic virus- Long history but still a threat to industry. *Crop Protection*. 42: 74-78
- Xia, Xianchun *et al* (1999). «Quantitative Trait Loci Mapping of Resistance to Sugarcane Mosaic Virus in Maize». Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, Universidad de Hohenheim. [Alemania]. 89 (9): 660-667
- Yang, Z. N. y Mirkov, T. E. (1997). «Sequence and Relationships of Sugarcane Mosaic and Sorghum Mosaic Virus Strains and Development of RT-PCR Based RFLPs for Strain Discrimination». *Departament of Plant Pathology and Microbiology* [Texas]. 87 (9): 932-939

XI. ANEXO

Cuadro 4. Información de las secuencias utilizadas para el análisis bioinformático de las secuencias de la cápside SCMV, primera parte.

Titulo	Tamaño del fragmento	Número de acceso a GenBank
1. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM1-1	852 bp	AJ491917.1
2. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM2-1	852 bp	AJ491918.1
3. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM3-1	852 bp	AJ491919.1
4. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM4-1	852 bp	AJ491920.1
5. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM5-1	852 bp	AJ491921.1
6. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM6-1	852 bp	AJ491922.1
7. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM78-1	852 bp	AJ491923.1
8. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM79-1	852 bp	AJ491924.1
9. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM80-1	852 bp	AJ491925.1
10. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM81-1	852 bp	AJ491926.1
11. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM82-1	852 bp	AJ491927.1
12. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM83-1	852 bp	AJ491928.1
13. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM84-1	852 bp	AJ491929.1
14. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM85-1	852 bp	AJ491930.1
15. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM86-1	852 bp	AJ491931.1
16. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM87-1	852 bp	AJ491932.1
17. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM88-1	852 bp	AJ491933.1
18. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM89-1	852 bp	AJ491934.1
19. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM90-1	852 bp	AJ491935.1
20. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM91-1	852 bp	AJ491936.1
21. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM92-1	852 bp	AJ491937.1
22. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM93-1	852 bp	AJ491938.1
23. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM94-1	852 bp	AJ491939.1
24. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM95-1	852 bp	AJ491940.1
25. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM96-1	852 bp	AJ491941.1
26. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CAM97-1	852 bp	AJ491942.1
27. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON10-1	852 bp	AJ491943.1
28. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON100-1	852 bp	AJ491944.1
29. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON101-1	852 bp	AJ491945.1
30. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON102-1	852 bp	AJ491946.1
31. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON103-1	852 bp	AJ491947.1
32. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON104-1	852 bp	AJ491948.1
33. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON105-1	852 bp	AJ491949.1
34. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON106-1	852 bp	AJ491950.1
35. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON107-1	852 bp	AJ491951.1
36. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON108-1	852 bp	AJ491952.1
37. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON109-1	852 bp	AJ491953.1
38. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON11-1	852 bp	AJ491954.1
39. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON110-1	852 bp	AJ491955.1
40. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON111-1	852 bp	AJ491956.1
41. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON112-1	852 bp	AJ491957.1
42. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON113-1	852 bp	AJ491958.1
43. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON12-1	852 bp	AJ491959.1

Cuadro 5. Información de las secuencias utilizadas para el análisis bioinformático de las secuencias de la cápside SCMV, segunda parte.

Titulo	Tamaño del fragmento	Número de acceso a GenBank
44. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON9-1	852 bp	AJ491960.1
45. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON98-1	852 bp	AJ491961.1
46. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate CON99-1	852 bp	AJ491962.1
47. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate EGY7-1	852 bp	AJ491963.1
48. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Flo 8-1	840 bp	AJ491964.1
49. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Lou 40-1	828 bp	AJ491965.1
50. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Lou 41-1	828 bp	AJ491966.1
51. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Lou 42-1	840 bp	AJ491967.1
52. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Lou 43-1	840 bp	AJ491968.1
53. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Lou 44-1	840 bp	AJ491969.1
54. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Lou 45-1	840 bp	AJ491970.1
55. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate USA Flo 36-1	852 bp	AJ491971.1
56. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate ZAF 52-1	852 bp	AJ491972.1
57. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate ZAF 53-1	852 bp	AJ491973.1
58. Sugarcane mosaic virus partial cp gene for capsid protein, genomic RNA, isolate ZAF 54-1	852 bp	AJ491974.1
59. Sugarcane mosaic virus isolate Mx polyprotein gene, partial cds	1,184 bp	AY195610.2
60. Sugarcane mosaic virus isolate RIB-1 capsid protein (cp) gene, partial cds	887 bp	AY819716.1
61. Sugarcane mosaic virus isolate JAU-1 capsid protein (cp) gene, partial cds	889 bp	AY819717.1
62. Sugarcane mosaic virus isolate PIR-2 capsid protein (cp) gene, partial cds	886 bp	AY819718.1
63. Sugarcane mosaic virus isolate FER-1 capsid protein (cp) gene, partial cds	851 bp	AY819719.1
64. Sugarcane mosaic virus isolate CB671-1 coat protein gene, partial cds	898 bp	DQ343236.2
65. Sugarcane mosaic virus isolate CB740 nonfunctional coat protein gene, partial sequence	897 bp	DQ842503.1
66. Sugarcane mosaic virus isolate Shaanxi polyprotein mRNA, partial cds	1,839 bp	DQ846832.1
67. Sugarcane mosaic virus isolate CBP84213-3 coat protein-like mRNA, partial sequence	898 bp	EF655889.1
68. Sugarcane mosaic virus isolate CB94270-1 coat protein mRNA, partial cds	898 bp	FJ185217.1
69. Sugarcane mosaic virus isolate CAMP polyprotein gene, partial cds	1,162 bp	HQ342698.1
70. Sugarcane mosaic virus isolate STAP polyprotein gene, partial cds	1,143 bp	HQ439439.1
71. Sugarcane mosaic virus isolate RV polyprotein gene, partial cds	1,173 bp	HQ439440.1
72. Sugarcane mosaic virus clone mosIAC capsid protein gene, partial cds	360 bp	JF699509.1
73. Sugarcane mosaic virus isolate Pira-SM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950337.1
74. Sugarcane mosaic virus isolate Pira-IM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950338.1
75. Sugarcane mosaic virus isolate Pira-MM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950339.1
76. Sugarcane mosaic virus isolate Pira-StM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950340.1
77. Sugarcane mosaic virus isolate RB-SM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950341.1
78. Sugarcane mosaic virus isolate RB-IM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950342.1
79. Sugarcane mosaic virus isolate RB-MM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950343.1
80. Sugarcane mosaic virus isolate ASS-SM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950344.1
81. Sugarcane mosaic virus isolate ASS-IM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950345.1
82. Sugarcane mosaic virus isolate ASS-MM capsid protein gene, partial cds	740 bp	JQ950346.1
83. Sugarcane mosaic virus strain A polyprotein mRNA, partial cds	1,977 bp	U57354.1
84. Sugarcane mosaic virus strain B polyprotein mRNA, partial cds	1,989 bp	U57355.1
85. Sugarcane mosaic virus strain D polyprotein mRNA, partial cds	1,989 bp	U57356.1
86. Sugarcane mosaic virus strain E polyprotein mRNA, partial cds	2,001 bp	U57357.1
87. Sugarcane mosaic virus RNA for capsid/nuclear inclusion protein (3' terminal genome)	1,782 bp	X05040.1

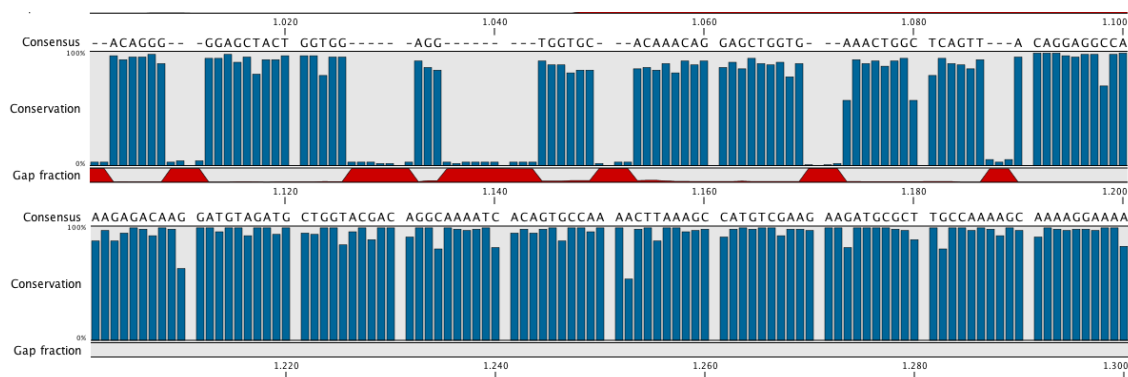
Figura 21. Secuencia consenso de SCMV según nomenclatura IUPAC de 2289pb sin editar. El producto de la alineación de 80 secuencias de la cápside de SCMV. La alineación se realizó en MEGA6.0 utilizando un costo por espacio de 8.0 y extensión del espacio de 3.2. La secuencia consenso fue generada con el programa CLC Sequence Viewer 7.

```

Consensus  GGGAAACAATAGTGGGCAGCCGTCAACAGTTGTAGACAACACACTCATGGTGATATTAGCGTTTAATTATGCAATGTTGTGCGAGTGGCGTTAAAGAGGAAG
Consensus  AAATAGATAACTGTTGCCGAATGTTCCCAATGGTGATGATCTGTTGCTTGCAGTGCACCCAGACTTCGAACATATATTGGATGGATTTCAAATCACTT
Consensus  TGGAAACTTGGGTCTCAACTTTGAGTTCACATCACGAACAAGAAACAAGTCAGAGTTATGGTTCATGTCCACACGAGGTATCAAATGCGAAGGCGTCTAT
Consensus  ATACCAARGMWTRRRRAAGAWMKAWKRKTRYSWYRCWYSRRKGSRWKYKWMRRA YK KAS YTKASMMWCSKMWMGWAGMMYWKRRRSRGYYRYSGYMR
Consensus  WKKYRKRKRKGRKAYHSMRRYMTTGWBCMHGARMWHCGDMWATYHKMHR YRTGKS YWS YVRWVATSSAA YCWTKKGSMWAYBNWGMWWWRRMRKRNYWR Y
Consensus  HCSWYRWWTYKMSARWSDGYMCTMVRMMAWSWKYMYWYBRRVRMR SKVR YMMWR SARGRMRARR YTSMRWAMTWBTYHRRARMMRKYVYVHMR RRAWYTH
Consensus  YMTSKWKR YRWAKMWKR YKAYMAWR RDGAWSDYTMCRY YADKMNGRWDMDRTNKATRMRVRHRCAATGANSRRKSNRSDVHRRNRHBNHRGRRCHMM
Consensus  NMMRYCDRSHRMHGRNGRDRCWR CRGRAHYR GHR RMGT BMR RVHRCRSMDYHGS HRRHVRHACDDSWRSTRGDDHTGGT GCAACTGRADSHHRHRMVRV
Consensus  VNMHKGMNDYRVHNSHR RVVHMVVRDSBVNAGCNWHDRRDR YMMRDCHRVHRBWSRHRRHMVDYVVBRNWCVARHRRVNSTDSDRDHBVVRVHRGNDCN
Consensus  RNYGBWR CAGBRRSNMARMRRGMYARRGAYGTGAYG YGGHWCVACNGGNAMDWTDHYWRTVCCRAAR YTHAARRMRTKTCRMMRAARATGCRYTVC
Consensus  CVAWRGYDARVRRVAARGMYRTHYYNMAYYTNGAYWY YDHTVMVVTAYAARCCR SANCARMRRGAYATWKYAAAMYR YWAGAGWCAYAVRS AVRAKT
Consensus  YYRRYWSRTGGTAYRMHR SMRTMAGAARGARTAYGAWRTHGAYRAYRMRCAAATGMSRRTHKTBATGAR YGGBYTVATGGTDTGGWG YATHGARAAYGG
Consensus  YWSMTCVCCWRABATAAAYGGWVRTTGMCVATGR TGGAYGGRRAHRADCARWSRGHNTTYCCR YTVAA RCYARTHR YKGRRAAYGCRWMNCCAACWTTM
Consensus  MGRCARDKHATGMWKCAYTT YRRYGATGYHSCWAGRCRTR YATHGARWVBMGARAYTYNRHDGAGCSDTWYATGCCAMGR TAYGGDCTYCWKMGNATC
Consensus  TMRMYGACWABAGCYTVGCDGCRKAYGSHHTYSA YTHWAHGARATVMYKCRVGVACR CCHVMTASDGCKARRRRRGCMCRYR YRCARRKGAARYMGC
Consensus  RSCRDTYMGWGGKTCMAMBAMMCRNHTGTT YGGHYTSRAYGGR AATGYGGMGAGAS YMKGAGAAACAGAGMGR CACACAGCTRVHSA YGT YWSWCCS
Consensus  AAYRTKCA YTKYWSYKKGGRGYSMARMWBYAMS RMKRKSSWMCWR SMRWCYMTSTKWS SWKWAMSKATRR YWKRY YAMKWHKARWWWKDYGWGAKRC
Consensus  CWKKYCYSRWDWGTMYGTRMRGHYTRSMKSKRWYWRMKA KYMMWDTAMRYRTK TASTWKDRR YCGRKGRAYSASWCKMRGRMYWCARKWYSRWSCY
Consensus  WRKSKCYWSYRKTGTRKSRHGYWCTARCRYVAGS YRHKDBMYKSMSRGCWBTGGKRRTSKYKTWVCCMKDRGTRCYMKRKGKSYCTYRGYRMSAGACMG
Consensus  TACTGGACTATGGATCTTTCTTGCAATCACTAGTATTATAAATCGTCTGCAACGGCAGAGTGGTGT TTTACACCTGGTGGGATTCTAATGCTGT
Consensus  TATACAGTTATGGATAACGGCCCGTGTTCGTATTTACTAGTTGCATCAAACCATCTGAGCCTCAGAGTGAGCTTCTCACCACGTAGTCTCTTATGGC
Consensus  GAGAT

```

Figura 22. Conservación de nucleótidos en la secuencia consenso de SCMV. La secuencia fue cortada desde la posición 841 a 1,745 y sin los espacios entre las secuencias se obtiene una secuencia consenso de 852 nucleótidos. El nucleótido en cada posición se dedujo a partir del porcentaje de conservación (>50%). La línea roja describe el porcentaje de espacio que se encuentra en esa posición tomando en cuenta todas las secuencias analizadas. Mientras mas alta sea la línea mayor numero de secuencias tienen un espacio en esa posición.



Cuadro 6. Cuantificación de las extracciones de ARN adaptado de Locali 2003. La concentración media de todas las muestras fue de 299.57ng/μL y la pureza promedio entre todas las muestras fué 2.1, asumiendo uniformidad en la extracción de ARN.

Muestra	260	280	320	Concentración (ng/μL)	Pureza
T1	0.030	0.013	0.005	720	2.3
T2	0.011	0.012	0.015	264	0.9
T3	0.016	0.013	0.013	384	1.2
T4	0.011	0.010	0.010	264	1.1
T5	0.020	0.016	0.016	480	1.3
T6	0.019	0.020	0.017	456	1.0
T7	0.010	0.014	0.015	240	0.7
T8	0.015	0.015	0.016	360	1.0
T9	0.017	0.017	0.014	408	1.0
T10	0.080	0.013	0.070	1920	6.2

Figura 23. Tendencia de la concentración de las extracciones de ARN de SCVM

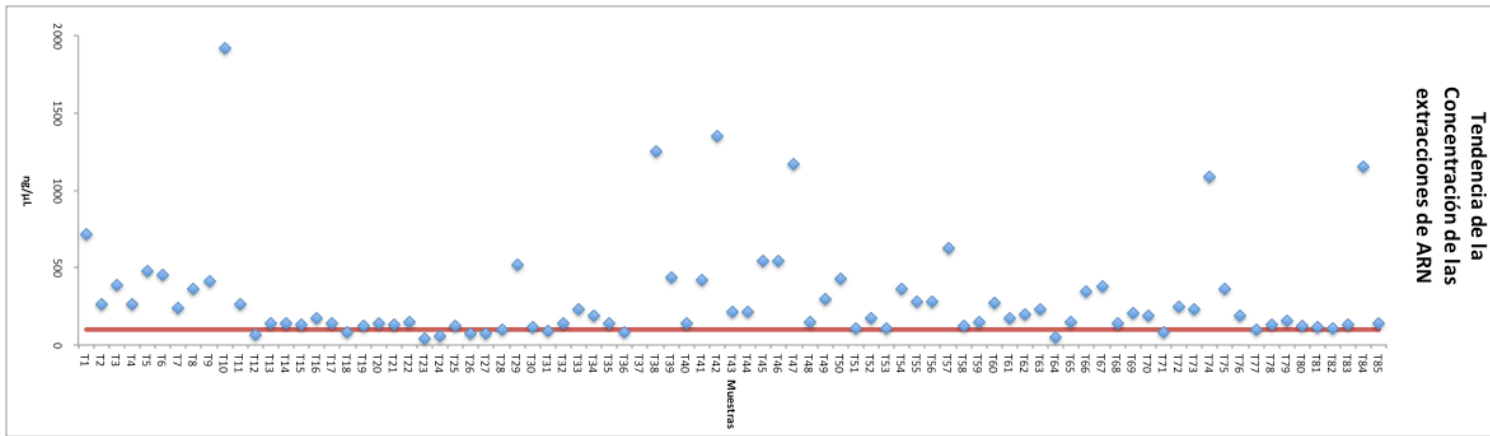


Figura 24. Tendencia de la pureza de las extracciones de ARN de SCVM

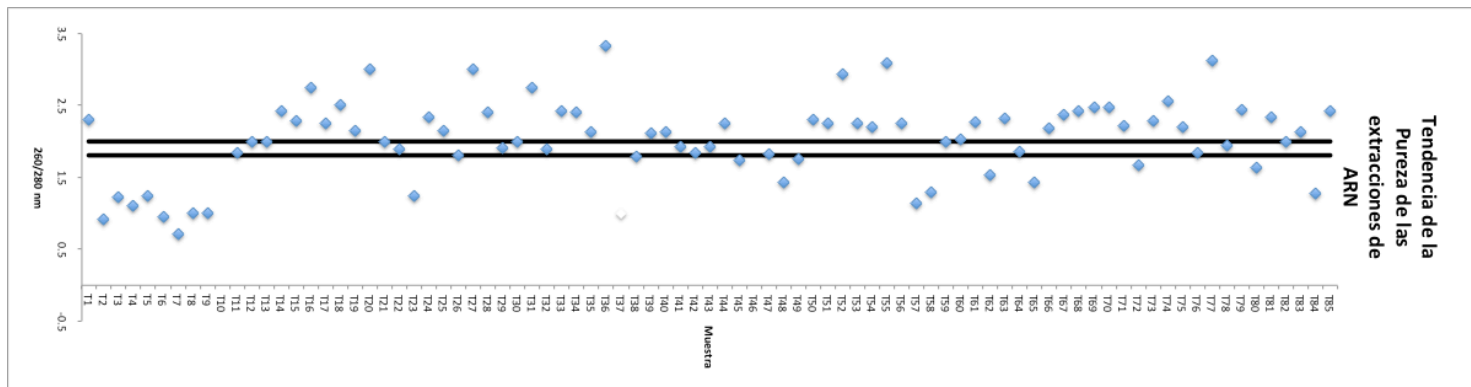


Figura 25. Amplificación en duplicado del control positivo del kit utilizado para asegurar el funcionamiento de la enzima Taq Polimerasa en el RT-PCR. Se amplificó el fragmento G3PDH 450pb, $T_m=60^{\circ}\text{C}$.

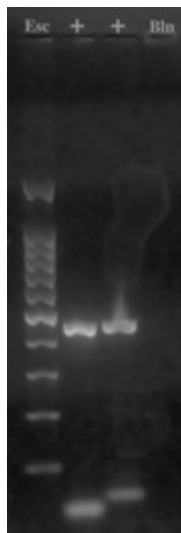


Figura 26. Ejemplo del resultado de un PCR *in silico* en la detección de ambos cebadores para una secuencia. Primero se muestra el nombre de la secuencia analizada, el nombre del cebador y la secuencia del mismo. Además se muestra la posición donde se unen los cebadores, el porcentaje de unión a la secuencia objetivo y la T_m teórica. Las líneas representan la interacción por puentes de hidrógeno de los nucleótidos complementarios. Los puntos entre los nucleótidos representa una posición donde los nucleótidos no son complementarios.

In silico Primer(s) search for: gb|hq439440.1| sugarcane mosaic virus isolate rv polyprotein gene, partial cds
especifico860 f 5'-ggatccgctggaacagtcatgcagg

Position: 235->260 70% $T_m = 38.1^{\circ}\text{C}$

```
5-ggatccgctggaacagtcatgcagg->
|:: :| ||||| || |||||
tccatcagtcgggaactgtgatgcaggca
```

especifico860 r 5'-agatcttctgrgtctgccgacattcc

Position: 1129<-1157 89% $T_m = 58.4^{\circ}\text{C}$

```
<-cctttacagccgctctgrgtccttctaga-5
|||||:|||||:|||||:|:|:
acggaaatgtcggcgagactcaggagaatacagag
```

```
>especifico860 f 235->260
5'-ggatccgctggaacagtcatgcagg
>especifico860 r 1129<-1157
5'-agatcttctgrgtctgccgacattcc
PCR product size: 923bp  $T_a=71^{\circ}\text{C}$ 
```

Cuadro 7. Matriz de distancia genética calculada por el modelo de Tajima Nei de la secuencia consenso.

	Distancia genética				
	MDMV	JGMV	SCMV	WSMV	Consenso_SCMV
MDMV	-				
JGMV	0.590	-			
SCMV	0.355	0.566	-		
WSMV	1.101	1.027	1.035	-	
Consenso_SCMV	0.335	0.581	0.215	1.026	-

Figura 27. Secuencia de la muestra T6. Se muestran las secuencias no alineadas del fragmento positivo y negativo del fragmento de s400 551 y el fragmento positivo de S400 910

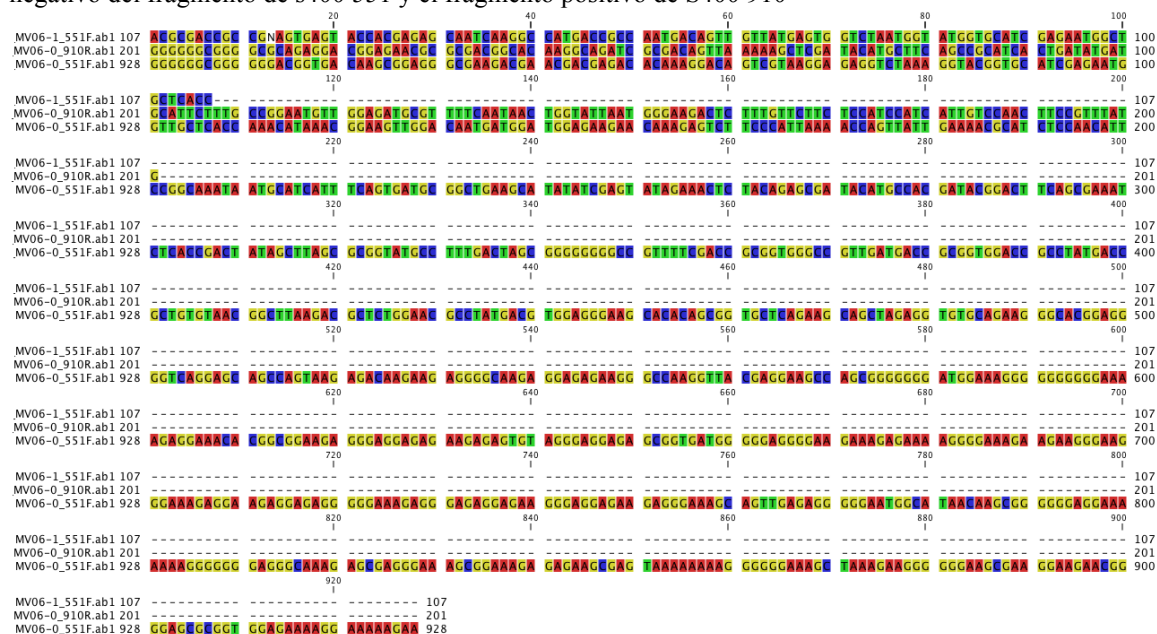


Figura 30. Cromatograma del fragmento positivo del cebador S400-910, muestra T6.

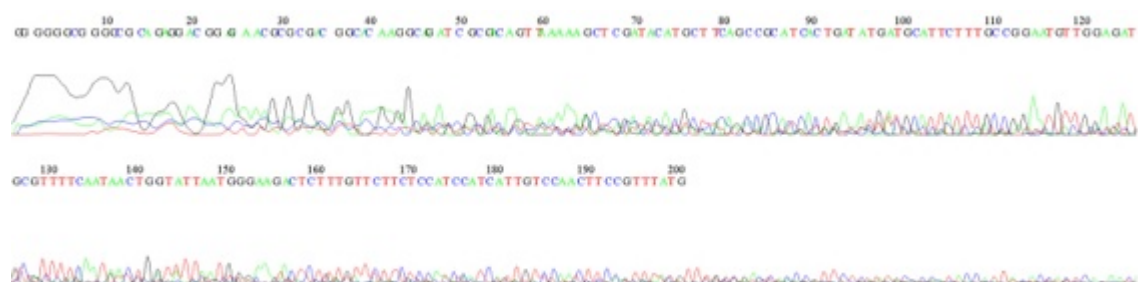


Figura 31. Síntomas de una hoja de caña de azúcar con mosaico

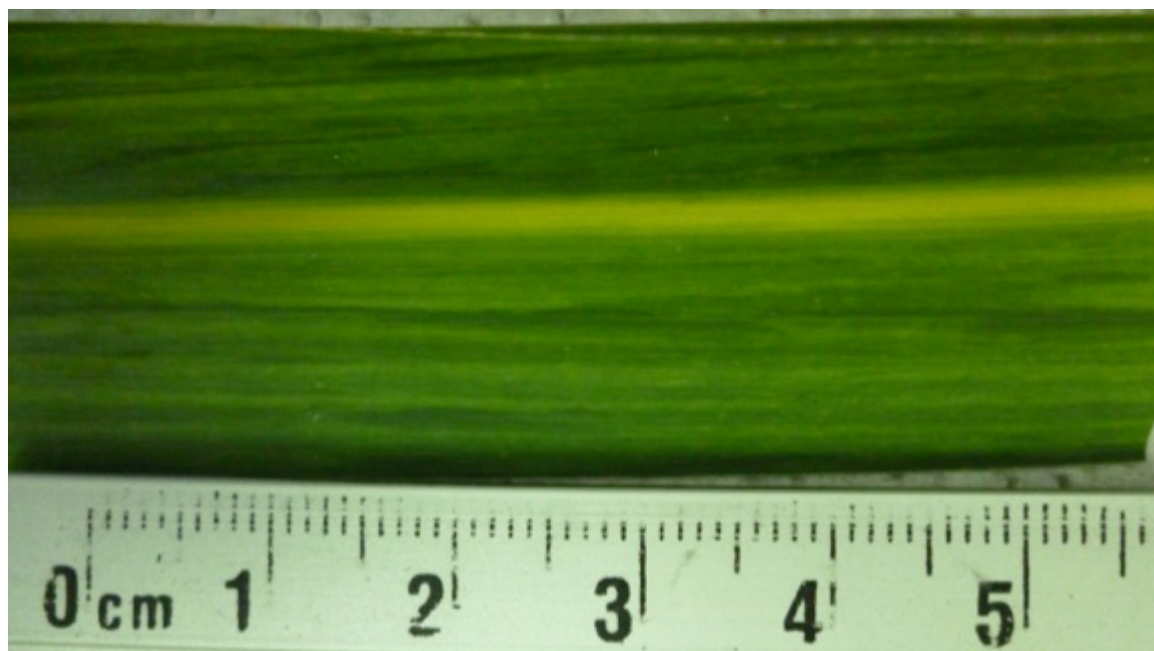
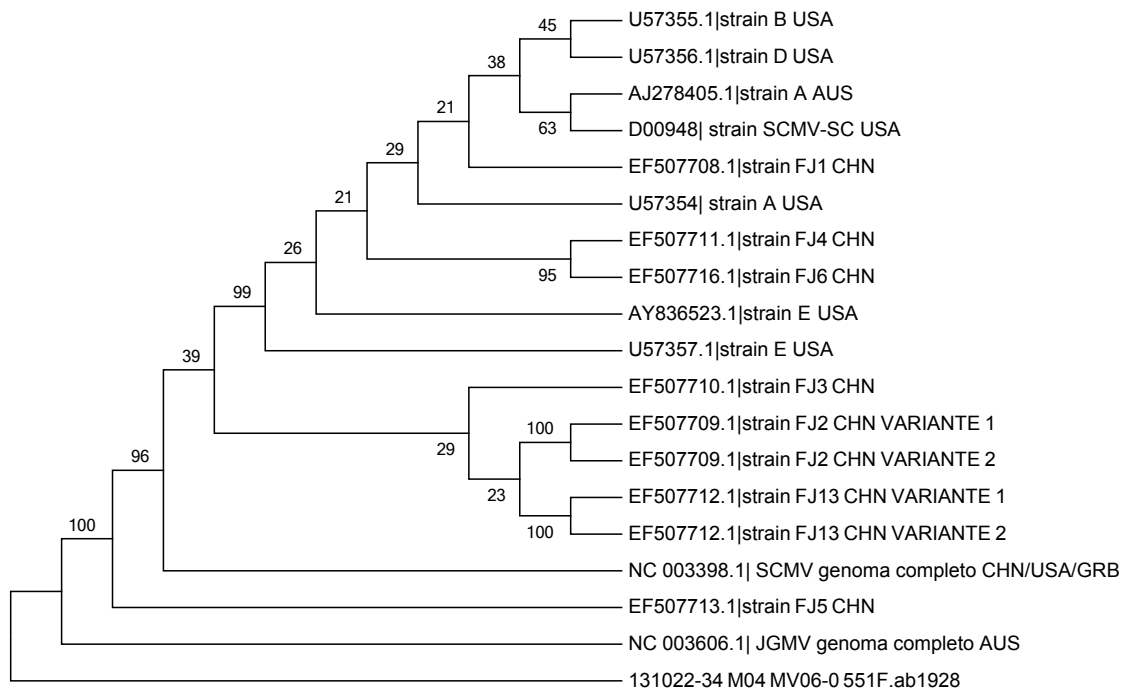


Figura 32. Árbol filogenético de la secuencia de ADNc de la muestra T6 fragmento S400 551F.



Protocolo utilizado para RT-PCR

a. Procedimiento para obtención de muestras

- i. Antes de tomar la muestra identificar el lote, calle y número de la caña de azúcar para identificarla en el croquis con la variedad.
- ii. Observar las características del mosaico en la hoja.
- iii. Las características deben ser: decoloración de la hoja, con patrones verticales. Generalmente se observan mejor contra luz.
- iv. Antes de tomar la muestra flamear las tijeras con alcohol al 95%
- v. Esperar unos segundos para que las tijeras se enfríen y evitar quemar con el metal caliente.
- vi. Cortar una sección grande de la hoja y cortarlo en tres o cuatro pedazos mas pequeños, lo suficientemente pequeños para guardarlos dentro de una bolsa ziploc.
- vii. Rotular la bolsa con fecha de colecta, nombre de finca, lote y variedad de caña.
- viii. Guardar en hielera con icepacks las bolsas y llevarlas al laboratorio.
- ix. En el laboratorio tomar fotos de las hojas.
- x. Refrigerar las muestras a 4°C hasta su uso.

b. Protocolo de extracción para ARN del virus, adaptado del protocolo Dardón 2006.

- i. Tomar la hoja de caña de azúcar y separarla de la nervadura central, haciendo un movimiento vertical.

- ii. De la misma manera rasgar la hoja en tiras mas pequeñas.
- iii. Cortar en fragmentos mas pequeños las hojas con una tijera previamente flameada.
Cortar sobre una caja de petrí esterilizada.
- iv. Recolectar 0.1g de material vegetal en tubo Eppendorf de 2mL.
- v. Utilizar inmediatamente o almacenar a 4°C máximo 1 día.
- vi. Llenar el tubo con nitrógeno liquido y con un palillo estéril macerar hasta formar polvo.
- vii. Agregar 500µL de solución de lavado y homogenizar en vortex.
- viii. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
- ix. Eliminar con una micro pipeta el sobrenadante.
- x. Agregar 600µL de la solución de extracción.
- xi. Incubar en baño maría a 55°C durante 30 min. Invertir el tubo cada 5 min.
- xii. Agregar 400µL de la solución de Fenol:Cloroformo:Isopentanol.
- xiii. Mezclar vigorosamente y repetir paso viii.
- xiv. Transferir la fase acuosa a un micro tubo nuevo.
- xv. Agregar 500µL de isopropanol frio.
- xvi. Agregar 50µL de acetato de amonio 7.5M.
- xvii. Mezclar por inversión y almacenar a -20°C durante 20min.
- xviii. Repetir paso viii.
- xix. Eliminar sobrenadante y agregar 100µL de etanol 70%
- xx. Repetir pasos xvii y xviii.
- xxi. Eliminar sobrenadante y secar al aire libre durante unos minutos.
- xxii. Re suspender en 50µL de agua ultra pura.
- xxiii. Almacenar a 4°C

c. Protocolo de cuantificación de ARN

- i. Según se observe el tamaño del precipitado de ARN diluir una parte de la muestra en los siguientes factores de dilución: 1:100 o 1:200
- ii. Utilizar celdas de cuarzo y agregar el volumen sugerido por el fabricante.
- iii. Utilizar la misma alícuota de agua que se uso para diluir las muestras como blanco.
- iv. Medir a 260nm, 280nm y 320nm.

d. Protocolo de RT-PCR

- i. Se utilizará el KIT One Step RT-PCR Master Mix de Novagen, protocolo TB508 Rev.A0408.
- ii. Procedimiento: Mezclar los reactivos de PCR que se detallan en el siguiente Cuadro en micro tubos de 1mL o 0.6mL. Después de mezclar los reactivos colocar los tubos en el termociclador y colocar el programa que se muestra en el cuadro 9. Se utilizarán los cebadores s400 910 y s400 551 y los cebadores R860 y F860. El kit permite que en el

mismo buffer de reacción se realice la transcripción reversa y luego la amplificación del fragmento de la cápside. Luego de la reacción de PCR los productos se corren en electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la preparación del gel de agarosa se utiliza agarosa pura y buffer TAE 1X. Se utilizará una corriente de 90Voltios durante 45 min, buffer de corrida buffer TAE 1X

Cuadro 8. Volumen calculado para reacciones de 25 μ L y 12.5 μ L a partir del volumen recomendado para la reacción de 50 μ L.

	RT-PCR 25 μ L										
Número de reacciones	n=1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
2x One Step	12.5	15.6	28.1	40.6	53.1	65.6	78.1	90.6	103	116	128.1
Mn(OAc)	1.25	1.56	2.81	4.06	5.31	6.56	7.81	9.06	10.3	11.6	12.81
H2O	7.25	9.06	16.3	23.6	30.8	38.1	45.3	52.6	59.8	67.1	74.31
Primer F	1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
Primer R	1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
RNA	2										
Vol. Final	25	28.8	51.8	74.8	97.8	121	144	167	190	213	235.8

	RT-PCR 12.5 μ L										
Número de reacciones	1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
2x One Step	6.25	7.81	14.1	20.3	26.6	32.8	39.1	45.3	51.6	57.8	64.06
Mn(OAc)	0.63	0.78	1.41	2.03	2.66	3.28	3.91	4.53	5.16	5.78	6.406
H2O	2.63	3.28	5.91	8.53	11.2	13.8	16.4	19	21.7	24.3	26.91
Primer F	0.5	0.63	1.13	1.63	2.13	2.63	3.13	3.63	4.13	4.63	5.125
Primer R	0.5	0.63	1.13	1.63	2.13	2.63	3.13	3.63	4.13	4.63	5.125
RNA	2										
Vol. Final	12.5	13.1	23.6	34.1	44.6	55.1	65.6	76.1	86.6	97.1	107.6

- iii. Las modificaciones al PCR son utilizar $\frac{1}{4}$ del volumen sugerido en el cuadro 7. El programa para la retro transcripción y PCR en un solo paso es: 30 segundos 90°C, 30min 60°C, 1min 94°C, 40 ciclos de 30seg 94°C para desnaturalización, 30 seg a 65°C para la temperatura de anillamiento y 1 min a 72°C para la extensión. Por ultimo 7 min 60°C.

Cuadro. 9. Secuencia de cebadores específicos S400 910/551. Marcador molecular diseñados para amplificar la región central de la cápside viral de SCMV, el tamaño del producto de PCR es de 359pb (Smith 1994).

Cebador	Secuencia
s400 910	5' AGT CAA AGG CAT ACC GCG CTA 3'
s400 551	5' ACA CAA GAG CAA CCA GAG AGG 3'

Cuadro. 10. Secuencia de cebadores de cebadores específicos SCMVF860/SCMVR860. Marcador molecular diseñados específicamente para SCMV, el tamaño del producto de PCR es de 860pb (Viswanathana 2010).

Cebador	Secuencia
R860	5' AGA TCT TCC TGR GTC TCG CCG ACA TTT CC 3'
F860	5' GAA TCC GCT GGA ACA GTC GAT GCA GG 3'

Cuadro. 11. Reactivos para el PCR y el volumen sugerido por el Kit para 1 reacción

	Control Positivo	Control Negativo	Muestra
2X one Step RT-PCR Master Mix	25µL	25µL	25µL
50mM Mn(OAc) ₂	2.5µL	2.5µL	2.5µL
Primer s400 910	2µL	2µL	1-3µL
Primer s400 551	2µL	2µL	1-3µL
RNA	2µL	N/AµL	XµL (Muestra de RNA)
H ₂ O libre de RNAasa	16.5µL	AµL	YµL
Total	50µL	50µL	50µL

e. Protocolo de electroforesis

- i. Para preparar un gel de agarosa al 1.5% diluir 0.6g de agarosa en 40mL de buffer TAE1X.
- ii. Luego calentar en microondas hasta disolver completamente la agarosa.
- iii. Agregar 1µL de GelRed cuando este tenga una temperatura menor a 45°C.
- iv. Verter sobre la cámara de electroforesis
- v. Eliminar burbujas
- vi. Esperar 15 a 30 min para su polimerización.
- vii. Llenar la cámara de electroforesis con suficiente buffer TAE1X.
- viii. Cargar 3µL de ADNc mezclado con 2µL de LoadingDye.
- ix. Realizar la electroforesis con los siguientes parámetros: 90V,500Ma,60-90Min

f. Protocolo de PCR convencional

- i. Diluir el producto del RT-PCR 1:20

- ii. Para una reacción de PCR convencional (vol=12.5µL) agregar: 6.05µL de H₂O, 1.25µL de buffer de PCR con 2.5mM de MgCl₂, 1µL de dNTPs, 1µL de cada primer (F y R), 0.2µL de Taq. Polimerasa y 2µL de la dilución de ADNc.
 - iii. El programa es 3min 94°C, 35 ciclos de 30seg 94°C para desnaturalización, 30 seg a 65°C para la temperatura de anillamiento y 1 min a 72°C para la extensión. Por ultimo 7 min 60°C.
- g. Protocolo de re suspensión de cebadores
- i. Realizar un centrifugar por 30 segundos del polvo en los tubos.
 - ii. Agregar el volumen calculado para cada uno de los cebadores.
 - iii. Vortex vigoroso por 10 segundos.
 - iv. Incubar a 37°C por 15min.
 - v. Centrifugar por 30 segundos.
 - vi. Agregar el volumen necesario para generar alícuotas de stock.
 - vii. Diluir algunas de las alícuotas de stock para las alícuotas de trabajo.

B. Preparación de soluciones

- a. Preparación de soluciones stock
- i. NaCl 5M: diluir 292.2 gramos de NaCl en 500mL de agua destilada. Luego aforar a 1 L.
 - ii. Tris-HCl: Diluir 157.6 gramos de Tris-HCl en 500mL de agua destilada. Si es necesario ajustar pH. Luego aforar a 1L.
 - iii. EDTA 500mM: Disolver 147.12 gramos de EDTA en 500mL de agua destilada. Ajustar a pH 8 utilizando NaOH. Y luego aforar a 1L.
 - iv. CTAB 10%(p/v): Disolver 50g de CTAB en 500mL de agua destilada.
 - v. Acetato de amonio 7.5M: Agregar 5.84g de acetato de amonio y disolver en 10mL de agua destilada.
 - vi. Etanol 70%. Agregar 368.42mL de Etanol al 95% y agregar 131.57mL de agua destilada. Mezclar vigorosamente.
 - vii. Buffer TAE 50X: Agregar 242g de Tris Base, 57.1mL de ácido acético glacial y 100mL de la solución de 500mM de EDTA. Luego aforar a 1L.
- b. Extracción de ARN
- i. Solución de lavado: Para preparar la solución agregar 0.1mL de EDTA la solución stock, 20mL de NaCl de la solución stock y 0.5mL de Tris HCl de la solución stock. Mezclar y aforar a 50mL. Luego autoclavar. Después de enfriar la solución agregar 0.025g de BSA.

- ii. Solución de extracción: Agregar 1mL de solución stock de CTAB 10%, 5mL de TrisHCl 1M, 14mL de NaCl 5M. Mezclar y diluir a 50mL. Autoclavear y después agregar 220 μ L de 2-Mercaptoetanol.

Fenol:Cloroformo:Isopentanol (25:24:1): Agregar 25mL de fenol, 24mL de cloroformo y 1mL de isopentanol.

Figura 23. Tendencia de la concentración de las extracciones de ARN de SCVM

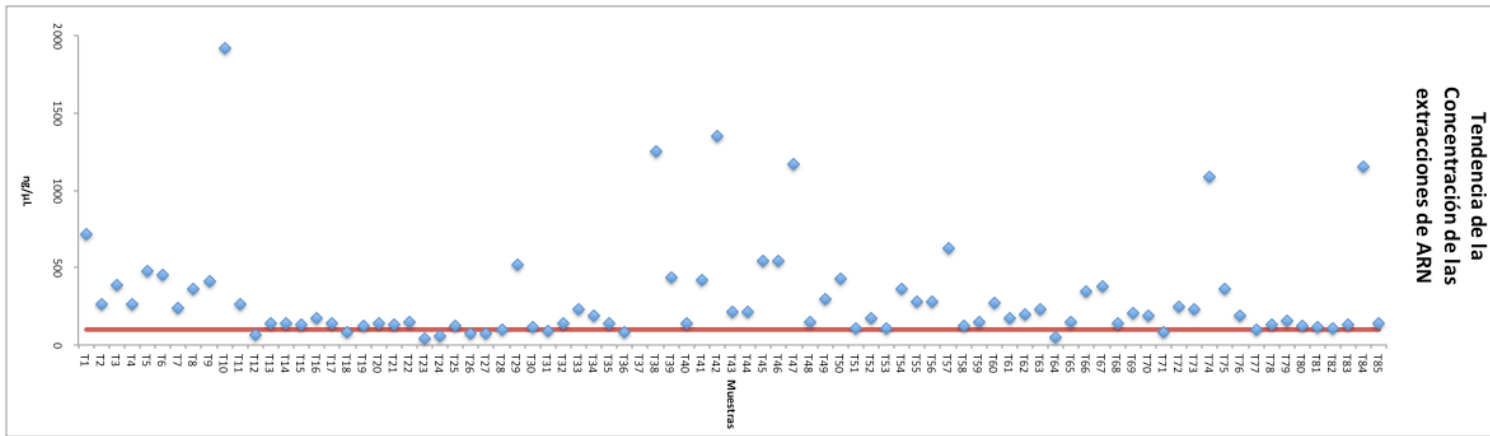


Figura 24. Tendencia de la pureza de las extracciones de ARN de SCVM

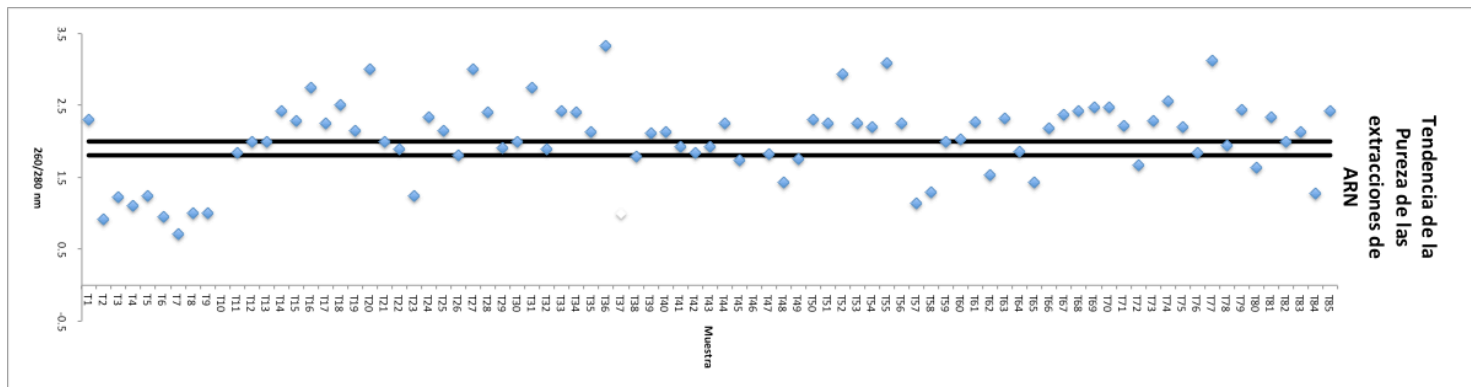


Figura 25. Amplificación en duplicado del control positivo del kit utilizado para asegurar el funcionamiento de la enzima Taq Polimerasa en el RT-PCR. Se amplificó el fragmento G3PDH 450pb, $T_m=60^{\circ}\text{C}$.

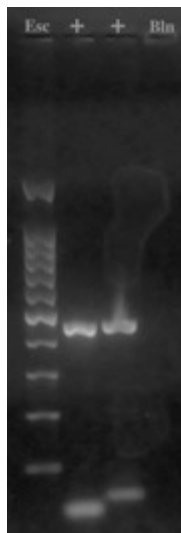


Figura 26. Ejemplo del resultado de un PCR *in silico* en la detección de ambos cebadores para una secuencia. Primero se muestra el nombre de la secuencia analizada, el nombre del cebador y la secuencia del mismo. Además se muestra la posición donde se unen los cebadores, el porcentaje de unión a la secuencia objetivo y la T_m teórica. Las líneas representan la interacción por puentes de hidrógeno de los nucleótidos complementarios. Los puntos entre los nucleótidos representa una posición donde los nucleótidos no son complementarios.

In silico Primer(s) search for: gb|hq439440.1| sugarcane mosaic virus isolate rv polyprotein gene, partial cds
especifico860 f 5'-ggatccgctggaacagtcatgcagg

Position: 235->260 70% $T_m = 38.1^{\circ}\text{C}$

```
5-ggatccgctggaacagtcatgcagg->
|:: :| ||||| || |||||
tccatcagtcgggaactgtgatgcaggca
```

especifico860 r 5'-agatcttctgrgtctgccgacatttcc

Position: 1129<-1157 89% $T_m = 58.4^{\circ}\text{C}$

```
<-cctttacagccgctctgrgtccttctaga-5
|||||:|||||:|||||:|:|:|
acggaaatgtcggcgagactcaggagaatacagag
```

```
>especifico860 f 235->260
5'-ggatccgctggaacagtcatgcagg
>especifico860 r 1129<-1157
5'-agatcttctgrgtctgccgacatttcc
PCR product size: 923bp  $T_a=71^{\circ}\text{C}$ 
```

Cuadro 7. Matriz de distancia genética calculada por el modelo de Tajima Nei de la secuencia consenso.

Distancia genética					
	MDMV	JGMV	SCMV	WSMV	Consenso_SCMV
MDMV	-				
JGMV	0.590	-			
SCMV	0.355	0.566	-		
WSMV	1.101	1.027	1.035	-	
Consenso_SCMV	0.335	0.581	0.215	1.026	-

Figura 27. Secuencia de la muestra T6. Se muestran las secuencias no alineadas del fragmento positivo y negativo del fragmento de s400 551 y el fragmento positivo de S400 910

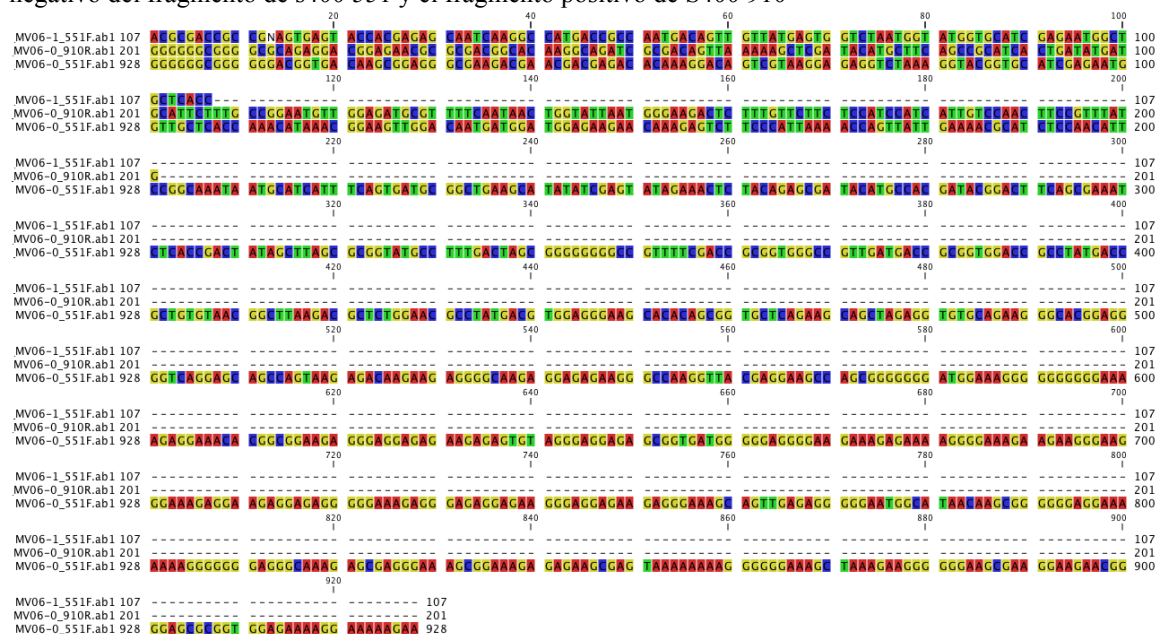


Figura 30. Cromatograma del fragmento positivo del cebador S400-910, muestra T6.

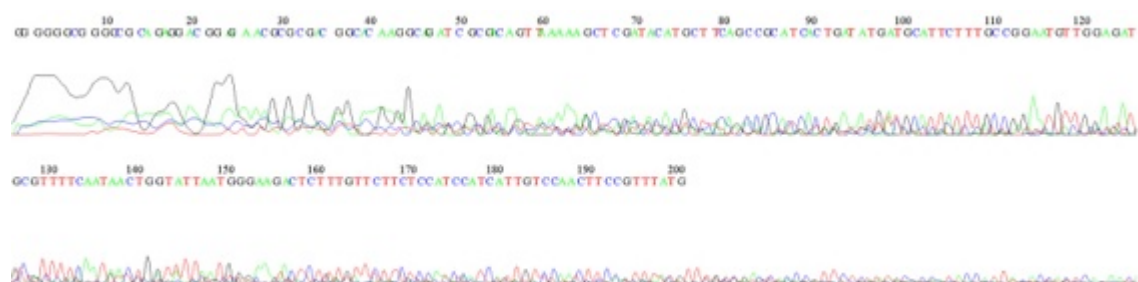


Figura 31. Síntomas de una hoja de caña de azúcar con mosaico

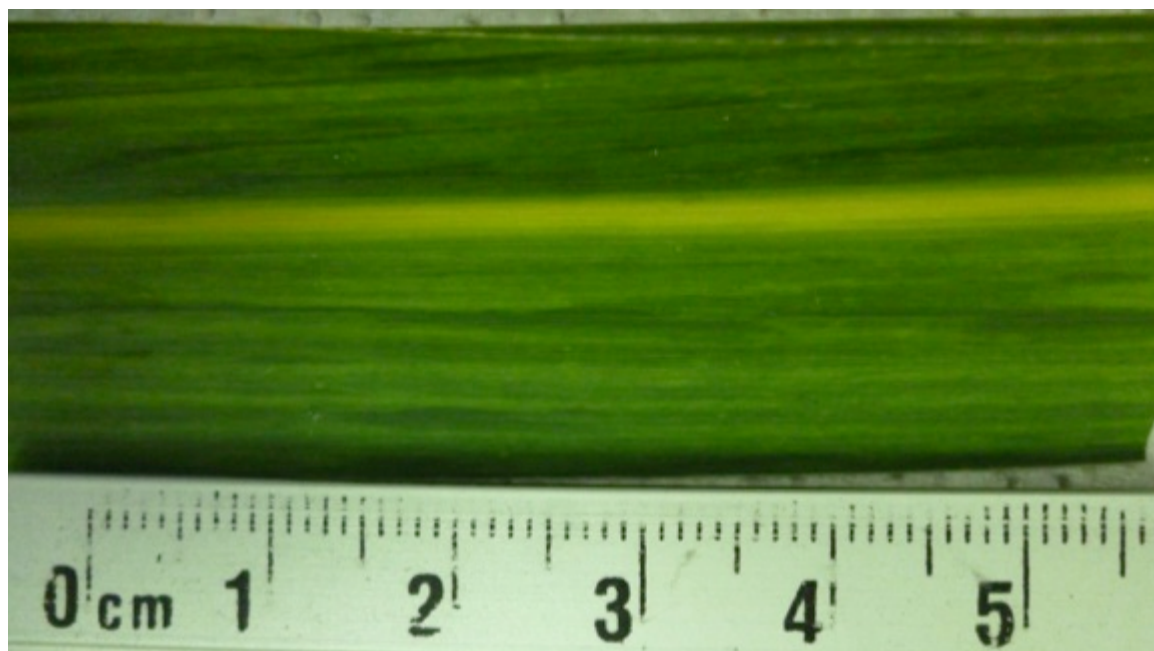
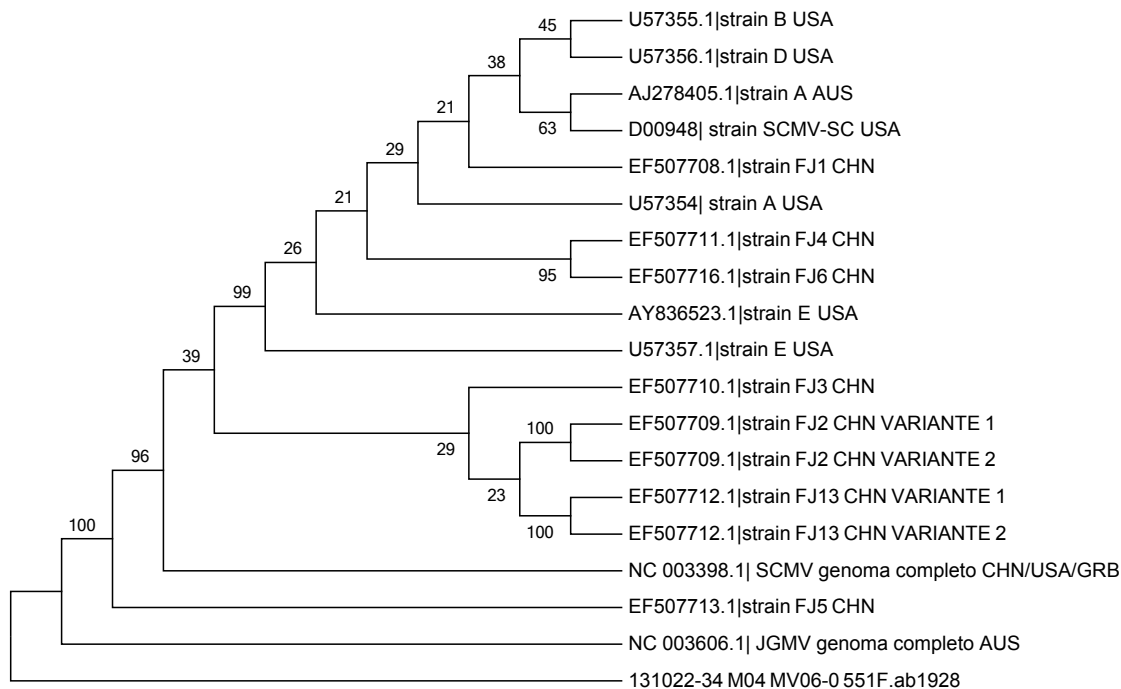


Figura 32. Árbol filogenético de la secuencia de ADNc de la muestra T6 fragmento S400 551F.



Protocolo utilizado para RT-PCR

a. Procedimiento para obtención de muestras

- i. Antes de tomar la muestra identificar el lote, calle y número de la caña de azúcar para identificarla en el croquis con la variedad.
- ii. Observar las características del mosaico en la hoja.
- iii. Las características deben ser: decoloración de la hoja, con patrones verticales. Generalmente se observan mejor contra luz.
- iv. Antes de tomar la muestra flamear las tijeras con alcohol al 95%
- v. Esperar unos segundos para que las tijeras se enfríen y evitar quemar con el metal caliente.
- vi. Cortar una sección grande de la hoja y cortarlo en tres o cuatro pedazos mas pequeños, lo suficientemente pequeños para guardarlos dentro de una bolsa ziploc.
- vii. Rotular la bolsa con fecha de colecta, nombre de finca, lote y variedad de caña.
- viii. Guardar en hielera con icepacks las bolsas y llevarlas al laboratorio.
- ix. En el laboratorio tomar fotos de las hojas.
- x. Refrigerar las muestras a 4°C hasta su uso.

b. Protocolo de extracción para ARN del virus, adaptado del protocolo Dardón 2006.

- i. Tomar la hoja de caña de azúcar y separarla de la nervadura central, haciendo un movimiento vertical.

- ii. De la misma manera rasgar la hoja en tiras mas pequeñas.
- iii. Cortar en fragmentos mas pequeños las hojas con una tijera previamente flameada.
Cortar sobre una caja de petrí esterilizada.
- iv. Recolectar 0.1g de material vegetal en tubo Eppendorf de 2mL.
- v. Utilizar inmediatamente o almacenar a 4°C máximo 1 día.
- vi. Llenar el tubo con nitrógeno liquido y con un palillo estéril macerar hasta formar polvo.
- vii. Agregar 500µL de solución de lavado y homogenizar en vortex.
- viii. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
- ix. Eliminar con una micro pipeta el sobrenadante.
- x. Agregar 600µL de la solución de extracción.
- xi. Incubar en baño maría a 55°C durante 30 min. Invertir el tubo cada 5 min.
- xii. Agregar 400µL de la solución de Fenol:Cloroformo:Isopentanol.
- xiii. Mezclar vigorosamente y repetir paso viii.
- xiv. Transferir la fase acuosa a un micro tubo nuevo.
- xv. Agregar 500µL de isopropanol frio.
- xvi. Agregar 50µL de acetato de amonio 7.5M.
- xvii. Mezclar por inversión y almacenar a -20°C durante 20min.
- xviii. Repetir paso viii.
- xix. Eliminar sobrenadante y agregar 100µL de etanol 70%
- xx. Repetir pasos xvii y xviii.
- xxi. Eliminar sobrenadante y secar al aire libre durante unos minutos.
- xxii. Re suspender en 50µL de agua ultra pura.
- xxiii. Almacenar a 4°C

c. Protocolo de cuantificación de ARN

- i. Según se observe el tamaño del precipitado de ARN diluir una parte de la muestra en los siguientes factores de dilución: 1:100 o 1:200
- ii. Utilizar celdas de cuarzo y agregar el volumen sugerido por el fabricante.
- iii. Utilizar la misma alícuota de agua que se uso para diluir las muestras como blanco.
- iv. Medir a 260nm, 280nm y 320nm.

d. Protocolo de RT-PCR

- i. Se utilizará el KIT One Step RT-PCR Master Mix de Novagen, protocolo TB508 Rev.A0408.
- ii. Procedimiento: Mezclar los reactivos de PCR que se detallan en el siguiente Cuadro en micro tubos de 1mL o 0.6mL. Después de mezclar los reactivos colocar los tubos en el termociclador y colocar el programa que se muestra en el cuadro 9. Se utilizarán los cebadores s400 910 y s400 551 y los cebadores R860 y F860. El kit permite que en el

mismo buffer de reacción se realice la transcripción reversa y luego la amplificación del fragmento de la cápside. Luego de la reacción de PCR los productos se corren en electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la preparación del gel de agarosa se utiliza agarosa pura y buffer TAE 1X. Se utilizará una corriente de 90Voltios durante 45 min, buffer de corrida buffer TAE 1X

Cuadro 8. Volumen calculado para reacciones de 25 μ L y 12.5 μ L a partir del volumen recomendado para la reacción de 50 μ L.

	RT-PCR 25 μ L										
Número de reacciones	n=1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
2x One Step	12.5	15.6	28.1	40.6	53.1	65.6	78.1	90.6	103	116	128.1
Mn(OAc)	1.25	1.56	2.81	4.06	5.31	6.56	7.81	9.06	10.3	11.6	12.81
H2O	7.25	9.06	16.3	23.6	30.8	38.1	45.3	52.6	59.8	67.1	74.31
Primer F	1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
Primer R	1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
RNA	2										
Vol. Final	25	28.8	51.8	74.8	97.8	121	144	167	190	213	235.8

	RT-PCR 12.5 μ L										
Número de reacciones	1	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25
2x One Step	6.25	7.81	14.1	20.3	26.6	32.8	39.1	45.3	51.6	57.8	64.06
Mn(OAc)	0.63	0.78	1.41	2.03	2.66	3.28	3.91	4.53	5.16	5.78	6.406
H2O	2.63	3.28	5.91	8.53	11.2	13.8	16.4	19	21.7	24.3	26.91
Primer F	0.5	0.63	1.13	1.63	2.13	2.63	3.13	3.63	4.13	4.63	5.125
Primer R	0.5	0.63	1.13	1.63	2.13	2.63	3.13	3.63	4.13	4.63	5.125
RNA	2										
Vol. Final	12.5	13.1	23.6	34.1	44.6	55.1	65.6	76.1	86.6	97.1	107.6

- iii. Las modificaciones al PCR son utilizar $\frac{1}{4}$ del volumen sugerido en el cuadro 7. El programa para la retro transcripción y PCR en un solo paso es: 30 segundos 90°C, 30min 60°C, 1min 94°C, 40 ciclos de 30seg 94°C para desnaturalización, 30 seg a 65°C para la temperatura de anillamiento y 1 min a 72°C para la extensión. Por ultimo 7 min 60°C.

Cuadro. 9. Secuencia de cebadores específicos S400 910/551. Marcador molecular diseñados para amplificar la región central de la cápside viral de SCMV, el tamaño del producto de PCR es de 359pb (Smith 1994).

Cebador	Secuencia
s400 910	5' AGT CAA AGG CAT ACC GCG CTA 3'
s400 551	5' ACA CAA GAG CAA CCA GAG AGG 3'

Cuadro. 10. Secuencia de cebadores de cebadores específicos SCMVF860/SCMVR860. Marcador molecular diseñados específicamente para SCMV, el tamaño del producto de PCR es de 860pb (Viswanathana 2010).

Cebador	Secuencia
R860	5' AGA TCT TCC TGR GTC TCG CCG ACA TTT CC 3'
F860	5' GAA TCC GCT GGA ACA GTC GAT GCA GG 3'

Cuadro. 11. Reactivos para el PCR y el volumen sugerido por el Kit para 1 reacción

	Control Positivo	Control Negativo	Muestra
2X one Step RT-PCR Master Mix	25µL	25µL	25µL
50mM Mn(OAc) ₂	2.5µL	2.5µL	2.5µL
Primer s400 910	2µL	2µL	1-3µL
Primer s400 551	2µL	2µL	1-3µL
RNA	2µL	N/AµL	XµL (Muestra de RNA)
H ₂ O libre de RNAasa	16.5µL	AµL	YµL
Total	50µL	50µL	50µL

e. Protocolo de electroforesis

- i. Para preparar un gel de agarosa al 1.5% diluir 0.6g de agarosa en 40mL de buffer TAE1X.
- ii. Luego calentar en microondas hasta disolver completamente la agarosa.
- iii. Agregar 1µL de GelRed cuando este tenga una temperatura menor a 45°C.
- iv. Verter sobre la cámara de electroforesis
- v. Eliminar burbujas
- vi. Esperar 15 a 30 min para su polimerización.
- vii. Llenar la cámara de electroforesis con suficiente buffer TAE1X.
- viii. Cargar 3µL de ADNc mezclado con 2µL de LoadingDye.
- ix. Realizar la electroforesis con los siguientes parámetros: 90V,500Ma,60-90Min

f. Protocolo de PCR convencional

- i. Diluir el producto del RT-PCR 1:20

- ii. Para una reacción de PCR convencional (vol=12.5µL) agregar: 6.05µL de H₂O, 1.25µL de buffer de PCR con 2.5mM de MgCl, 1µL de dNTPs, 1µL de cada primer (F y R), 0.2µL de Taq. Polimerasa y 2µL de la dilución de ADNc.
 - iii. El programa es 3min 94°C, 35 ciclos de 30seg 94°C para desnaturalización, 30 seg a 65°C para la temperatura de anillamiento y 1 min a 72°C para la extensión. Por ultimo 7 min 60°C.
- g. Protocolo de re suspensión de cebadores
- i. Realizar un centrifugar por 30 segundos del polvo en los tubos.
 - ii. Agregar el volumen calculado para cada uno de los cebadores.
 - iii. Vortex vigoroso por 10 segundos.
 - iv. Incubar a 37°C por 15min.
 - v. Centrifugar por 30 segundos.
 - vi. Agregar el volumen necesario para generar alícuotas de stock.
 - vii. Diluir algunas de las alícuotas de stock para las alícuotas de trabajo.

B. Preparación de soluciones

- a. Preparación de soluciones stock
- i. NaCl 5M: diluir 292.2 gramos de NaCl en 500mL de agua destilada. Luego aforar a 1 L.
 - ii. Tris-HCl: Diluir 157.6 gramos de Tris-HCl en 500mL de agua destilada. Si es necesario ajustar pH. Luego aforar a 1L.
 - iii. EDTA 500mM: Disolver 147.12 gramos de EDTA en 500mL de agua destilada. Ajustar a pH 8 utilizando NaOH. Y luego aforar a 1L.
 - iv. CTAB 10%(p/v): Disolver 50g de CTAB en 500mL de agua destilada.
 - v. Acetato de amonio 7.5M: Agregar 5.84g de acetato de amonio y disolver en 10mL de agua destilada.
 - vi. Etanol 70%. Agregar 368.42mL de Etanol al 95% y agregar 131.57mL de agua destilada. Mezclar vigorosamente.
 - vii. Buffer TAE 50X: Agregar 242g de Tris Base, 57.1mL de ácido acético glacial y 100mL de la solución de 500mM de EDTA. Luego aforar a 1L.
- b. Extracción de ARN
- i. Solución de lavado: Para preparar la solución agregar 0.1mL de EDTA la solución stock, 20mL de NaCl de la solución stock y 0.5mL de Tris HCl de la solución stock. Mezclar y aforar a 50mL. Luego autoclavar. Después de enfriar la solución agregar 0.025g de BSA.

- ii. Solución de extracción: Agregar 1mL de solución stock de CTAB 10%, 5mL de TrisHCl 1M, 14mL de NaCl 5M. Mezclar y diluir a 50mL. Autoclavear y después agregar 220 μ L de 2-Mercaptoetanol.

Fenol:Cloroformo:Isopentanol (25:24:1): Agregar 25mL de fenol, 24mL de cloroformo y 1mL de isopentanol.