

Acercamiento a la detección de virus *Sugarcane yellow leaf virus* y sus variantes genómicas utilizando diferentes cebadores en prueba molecular RT-PCR en cultivos de *Saccharum officinarum* en el valle del río Cauca.

Jenifer Daniela Botina Montealegre

Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD

Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y Medio Ambiente – ECAPMA

Programa de Agronomía

Palmira

2021

Acercamiento a la detección de virus *Sugarcane yellow leaf virus* y sus variantes genómicas utilizando diferentes cebadores en prueba molecular RT-PCR en cultivos de *Saccharum officinarum* en el valle del río Cauca.

Jenifer Daniela Botina Montealegre

Trabajo para optar al título de Agronomía

Director:

María del Carmen Garcés

Ingeniera agrónoma MSc (C)

Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD

Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y Medio Ambiente – ECAPMA

Programa de Agronomía

Palmira

2021

Página de Aceptación

María del Carmen Garcés

Director Trabajo de Grado

Jurado

Jurado

Palmira -2021

Dedicatoria

A Dios por su gran bondad y amor, por darme salud, por iluminar mi mente y haber puesto en mi camino a las personas que me han apoyado y acompañado durante todo mi proceso formativo permitiéndome llegar así a este punto de mi vida.

A mis padres y hermano por llenar mi vida de amor, felicidad y apoyo incondicional para salir adelante y animarme a ser cada día mejor.

A todas aquellas personas que me ayudaron, me guiaron, me enseñaron; por su amistad y por darme la oportunidad de conocerlo.

El desarrollo de este proceso no fue fácil, pero estoy satisfecha de haber disfrutado todos los momentos llenos de aprendizaje y compartido con quienes me rodeaban ayudándome en mi proceso de formación profesional.

Resumen

La hoja amarilla en el cultivo de caña de azúcar es una enfermedad sistémica causada por el virus *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) perteneciente al género *Polerovirus* de la familia *Luteoviridae*; considerada como una enfermedad de gran importancia en zonas productoras de caña de azúcar debido a la afectación en el desarrollo y productividad de biomasa y sacarosa. Por tal motivo es importante la detección de este patógeno en cultivos destinados para multiplicación (semilleros) con el objetivo de implementar estrategias para evitar la propagación de este virus al momento de establecer cultivares comerciales. Sin embargo, al haber variedades de caña de azúcar asintomáticas a esta enfermedad y la presencia de diferentes variantes de este patógeno, es necesario contar con una técnica como la RT-PCR con cebadores altamente sensibles. El siguiente trabajo tuvo como propósito evaluar la sensibilidad de cinco pares de cebadores que abarcan diferentes regiones del genoma de virus *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) por medio de la técnica Reacción en cadenas de polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), para ello se seleccionaron 130 muestras (cada muestra compuesta por 20 hojas) provenientes de diferentes cultivares comerciales y semilleros ubicados a lo largo del valle del río Cauca. La detección del virus se realizó primeramente por medio de la técnica inmunoensayo tisular (TBIA) para asegurarnos que eran positivas y luego por Reacción en cadenas de polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR) con cada par de cebadores a las 130 muestras. Luego se seleccionaron 12 muestras para enviar a secuencias y conocer el porcentaje de identidad de nuestras secuencias comparadas con 10 accesiones correspondientes a las secuencias genómicas completas de las variantes del virus, publicados en GenBank. Los cebadores con mayor sensibilidad fueron los FM 323/FM 359 con el 99,2% de detección, seguido de los cebadores YLS 111/YLS 462 con el 87,6% de detección; no

se logró la detección del patógeno con los cebadores B-FOR/B-REV con los diferentes perfiles de amplificación que se programaron.

Palabras claves: *Caña de azúcar, SCYLV, variantes, pruebas moleculares, cebadores*

Abstract

The yellow leaf in sugarcane crops is a systemic disease caused by the Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) belonging to the genus Polerovirus of the Luteoviridae family; considered as a disease of great importance in sugarcane producing areas due to the effect on the development and productivity of biomass and sucrose. For this reason, it is important to detect this pathogen in crops intended for multiplication (seedbeds) in order to implement strategies to prevent the spread of this virus when establishing commercial cultivars. However, as there are varieties of sugarcane asymptomatic to this disease and the presence of different variants of this pathogen, it is necessary to have a technique such as RT-PCR with highly sensitive primers. The purpose of the present work was to evaluate the sensitivity of five pairs of primers that cover different regions of the Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) genome by means of the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique. 130 samples were selected (each sample composed of 20 leaves) from different commercial cultivars and seedbeds located along the Cauca river valley. The detection of the virus was carried out first by means of the tissue immunoassay technique (TBIA) to ensure that they were positive and then by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) with each pair of primers to the 130 samples. Then 12 samples were selected to send to sequences and to know the percentage of identity of our sequences compared with 10 accessions corresponding to the complete genomic sequences of the virus variants published in GenBank. The primers with the highest sensitivity were the FM 323 / FM 359 with 99.2% detection, followed by the YLS 111 / YLS 462 primers with 87.6% detection; The detection of the pathogen was not achieved with the primers B-FOR / B-REV with the different amplification profiles that were programmed.

Keywords: *Sugarcane, SCYLV, variants, molecular tests, primers.*

Tabla de contenido

1.	Introducción	12
2.	Justificación.....	14
3.	Objetivos	16
3.1	<i>Objetivo General</i>	16
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	16
4.	Marco Teórico	17
4.1	<i>Caña de azúcar (Saccharum officinarum)</i>	17
4.2	<i>Colombia y la producción de la caña de azúcar en el mundo</i>	17
4.3	<i>Enfermedades de la caña de azúcar</i>	19
4.4	<i>Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV)</i>	20
4.4.1	<i>Sintomatología</i>	21
4.4.2	<i>Transmisión</i>	22
4.4.3	<i>Métodos de detección</i>	22
4.4.3.1	<i>ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</i>	23
4.4.3.2	<i>TBIA (Tissue Blot Immunoassay)</i>	24
4.4.3.3	<i>DBIA (Dot Blot Immunoassay)</i>	25
4.4.3.4	<i>RT-PCR (Transcripción Reversa de Reacción en Cadena de Polimerasa)</i>	25
4.4.3.5	<i>PCR tiempo real</i>	26
4.5	<i>Impacto de la enfermedad del virus de la hoja amarilla</i>	27
5.	Metodología	27
5.1	<i>Localización</i>	27
5.2	<i>Selección de Variedades</i>	28
5.2.1	<i>Toma de la muestra en campo</i>	28
5.2.2	<i>Adecuación de la muestra</i>	29
5.3	<i>Extracción de ARN</i>	29
5.4	<i>Selección de muestras</i>	30
5.5	<i>Selección de cebadores</i>	31
5.6	<i>Detección del patógeno por TBIA</i>	32
5.7	<i>Detección del patógeno por RT-PCR</i>	33
6.	Resultados y análisis	36
6.1	<i>Resultados de los Análisis Por Cebadores</i>	36
6.2	<i>Grupos De Resultados</i>	37
6.3	<i>Análisis de componentes principales</i>	38
6.4	<i>Análisis de Cluser</i>	41

6.5	<i>Análisis discriminante</i>	42
6.6	<i>Secuenciación</i>	43
7.	Conclusiones	46
8.	Recomendaciones.....	47
9.	Referencias	48

Lista de Tabla

<i>Tabla 1. Variedades para cada mega ambiente</i>	28
<i>Tabla 2. Lista de Cebadores</i>	31
<i>Tabla 3. Perfil de amplificación para los cebadores seleccionados</i>	34
<i>Tabla 4. Grupos de resultados</i>	37
<i>Tabla 5. Análisis de componentes principales</i>	39
<i>Tabla 6. Peso de las variables dentro de los componentes</i>	40
<i>Tabla 7. Muestras seccionadas para secuenciar</i>	43
<i>Tabla 8. Porcentaje de identidad</i>	44

Tabla de Figuras

<i>Figura 1. Indicador de productividad mundial.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2. Ubicación geográfica de las muestras seleccionadas.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 3. Genoma completo del virus Sugarcane Yellow leaf virus según Moonan, et al (2000) y la ubicación de los fragmentos de cada par de cebadores.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 4. Resultados de amplificación de RT-PCR para cada par de cebadores.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 5. Resultados de los análisis por par de cebadores.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6. Resultado de los análisis de componentes principales</i>	<i>40</i>
<i>Figura 7. Análisis de clusterización.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 8. Análisis discriminante en 2 funciones.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9. Análisis Filogenético</i>	<i>45</i>

1. Introducción

El amarillamiento de las hojas en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una enfermedad ocasionada por el Polerovirus *Sugarcane yellow leaf virus*, el cual se caracteriza por presentar síntomas de clorosis o amarillamiento de las hojas, que se acentúan desde el ápice de la hoja y se extienden a lo largo de la zona de la nervadura central, tomando a veces coloraciones rojizas, seguido por la necrosis del tejido desde la punta de la hoja hasta la base con debilitamiento de la planta, con reducción del desarrollo de la planta, acortamiento de entrenudos terminales y hasta marchitamiento en casos severos (Moonan et al., 2000). esta enfermedad se propaga principalmente por la siembra de semilla infectada y transmitida por el áfido *Melanaphis sacchari* (Zehntner), orden Hemiptera, familia *Aphididae*, o llamado comúnmente como Pulgón gris.

Esta enfermedad se conoció primeramente como síndrome de la hoja amarilla o *yellow leaf Syndrome* en el oriente de África (Ricaud, C. 1968), en 1989 se asoció por primera vez a un virus en Hawaii (USA) (Schenck et al., 1991). Luego fue detectada en Florida (USA) en el año 1994 (Comstock et al., 1994) y en Brasil afectando cerca del 25% del área cultivada en el estado de Sao Paulo sembrada con la variedad SP 71-6163 (Vega et al., 1997) donde se empezaron a desarrollar estudios más detallados.

El virus de la hoja amarilla se puede detectar por diferentes técnicas de laboratorio como son ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), TBIA (Tissue Blot Immunoassay), DBIA (Dot Blot Immunoassay), RT-PCR (Transcripción Reversa de Reacción en Cadena de Polimerasa), qPCR (PCR en tiempo real) y por purificación de su agente causal (Victoria et al., 1998; Acosta et al., 2014; Acosta et al. 2015; Cardozo et al., 2015); siendo la RT-PCR y PCR las más sensibles y usadas actualmente.

En Colombia, el virus de la hoja amarilla (SCYLV) fue detectado por primera vez en mayo de 1998 por Victoria, en la variedad SP 71-6163 importada desde Brasil en 1987, y a partir de allí en casi todas las variedades sembradas. En el año 2017, Cardozo encontró que en el valle del río Cauca están presente al menos 4 variantes de este virus de la hoja amarilla (SCYLV), los cuales tienen un comportamiento diferente con cada variedad, afectándolas más a unas que a otras. Si en el valle del río Cauca hay tanta diversidad genética de este patógeno y no se realiza la detección de las variantes presentes, existe la posibilidad de que unas variantes sea más agresiva con algunas variedades que se encuentra sembrada en mayor proporción en estos departamentos y que haya un efecto devastador en nuestras regiones cultivadoras dando paso a pérdidas incalculables en toneladas caña por hectárea (TCH) y toneladas de azúcar por hectáreas (TSH). De allí la importancia de evaluar diferentes juegos de cebadores que abarcan diferentes regiones del genoma del virus SCYLV por medio de la técnica RT-PCR y establecer cuáles son los más sensibles para detectar diferentes variantes de este patógeno con el fin de realizar una detección a tiempo y así evitar la posibilidad de que una de estas variantes pueda ser más agresiva con alguna de las variedades que se encuentra sembrada en mayor que haya un efecto negativo en nuestras regiones cultivadoras y pérdidas en el sector azucarero y panelero.

La investigación se desarrollará, primero realizando una revisión documental acerca del virus de hoja amarilla, seguidamente los estudios realizados en Colombia y finalmente la detección del virus SCYLV y sus posibles variantes genómicas que se encuentran en las regiones productoras de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el valle del río Cauca desde pruebas RT-PCR.

2. Justificación

El virus de la hoja amarilla es una enfermedad limitante en cultivos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) debido a que se han reportado pérdidas de 1,2 toneladas de caña por hectárea (TCH) y 0.21 toneladas de azúcar por hectárea (TSH) por cada 1% de tallos afectados en el valle del río Cauca (Victoria et al., 2000). Esta enfermedad ha presentado incrementos en la incidencia a través del tiempo en lotes comerciales y semilleros del valle del río Cauca, el servicio de diagnóstico de enfermedades de Cenicaña indicó que para el año 2018 la incidencia fue de 13.2% comparada con la incidencia del año 2017 que fue de 8%. Sin embargo, para el año 2019 la incidencia mostro una disminución considerable llegando al 10.4%, debido a que cultivadores de caña de azúcar decidieron implementar la siembra de diferentes variedades con el fin de generar una resistencia varietal "Servicio de diagnóstico de enfermedades", 2018.

Es importante anotar que se encuentran reportes de diferentes genotipos de este virus, de acuerdo a su origen geográfico: BRA (Brasil), CHN1, CHN2, CHN3 (China), COL (Colombia), CUB (Cuba), HAW (Hawái), IND (India), PER (Perú) y REU (reunión) basados en el análisis de la diversidad genética de su genoma utilizando secuencias parciales y genomas completos (Moonan y Mirkov, 2002; Abu Ahmad et al., 2006; Wang et al., 2010; ElSayed et al., 2010; Gao et al., 2012; Chinnaraja et al., 2012; Lin et al., 2014).

En un estudio realizado por Abu Ahmad et al., 2006, se identificó la presencia de los genotipos o variantes del virus de la hoja amarilla (SCYLV): CUB de Cuba e infección mixta de BRA-PER de Brasil y Perú, los cuales se cree que entraron a nuestro país por medio de material infectado, previo al desarrollo de los métodos de detección. Cardozo (2017) indica que: Existe diversidad genética del patógeno en Colombia la cual difiere

con los aislamientos registrados y secuenciados de otros países tanto en genomas completos como parciales, incluyendo secuencias parciales previas de aislamientos obtenidos de Colombia. Esta diversidad es la que posiblemente pueda causar los impactos en términos de producción en el cultivo de caña de azúcar.

Conociendo la variabilidad de los virus, su eficacia en la infección y los efectos que tiene en las plantas y en la producción, es importante reconocer que pueden convertirse en un problema donde las pérdidas en toneladas caña por hectárea (TCH) y toneladas de azúcar por hectáreas (TSH) puedan ser considerables para la industria. Con los avances de investigación desarrollados por Ángel et al. (2001) y Cardozo (2017), se requiere de la selección de un par de cebadores altamente sensibles para la detección de este patógeno en las zonas productoras de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) del valle del río Cauca, con el fin de brindar un resultado más exacto y oportuno a los cultivadores de caña de azúcar, para que tomen y apliquen medidas de prevención necesarias para disminuir la incidencia y distribución de esta enfermedad.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Seleccionar cebadores que permitan la detección del virus *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) y sus variantes genómicas en cultivos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) ubicados en el valle geográfico del río Cauca

3.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar muestras de ARN de caña de azúcar provenientes de cultivares en el valle del río Cauca
- Evaluar diferentes juegos de cebadores que permitan la detección del virus de la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*) y sus variantes genómicas por medio de la técnica RT-PCR

4. Marco Teórico

4.1 Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas, presenta un tallo leñoso y por dentro un tejido esponjoso donde se presenta acumulación de sacarosa, con una altura de más de dos metros, sus hojas alternas formadas por la lámina foliar, la yagua y la vaina, e inflorescencia lisa alargada y en espiga. Esta planta tiene buena capacidad de adaptación, un eminente potencial de producción y conversión de energía solar. Este cultivo se ubica en el primer lugar a nivel mundial gracias a sus casi 70 toneladas por hectárea, por su buena productividad, por su gran volumen producido y también porque es un alimento de consumo diario en gran variedad de bebidas y alimentos en todo el mundo con aportes calóricos y energéticos importantes para los consumidores.

(Rodríguez, 2020)

Esta gramínea se ha venido cultivando desde muchos años en zonas tropicales y subtropicales, considerándose, así como uno de los cultivos más antiguos. En varias investigaciones se dice que es originaria de Nueva Guinea y de allí emigro a diferentes zonas del continente asiático y en siglos recientes al continente americano por españoles y portugueses. Luego entro a Colombia por el caribe en el año 1533 por Pedro de Heredia y en el año 1541 por Sebastián de Belalcázar en Yumbo (Valle del Cauca). La caña de azúcar que se siembra actualmente son híbridos provenientes de los géneros *S. spontaneum* y *S. officinarum*.

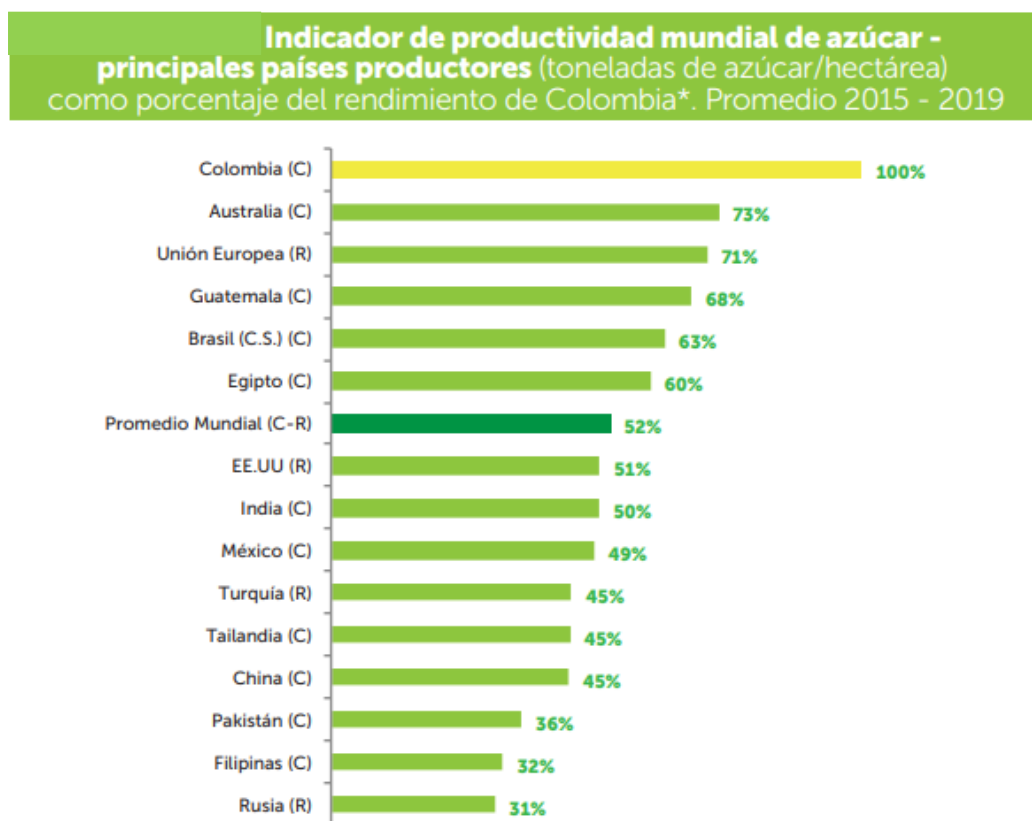
4.2 Colombia y la producción de la caña de azúcar en el mundo

Asocaña (La Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia) en el informe de 2019, resalta a Colombia como el mayor productor internacional de caña de

azúcar, siendo un elemento de gran importancia en términos económicos de reconocimiento del sector agropecuario a nivel mundial.

El mundo conoce y disfruta de la gran calidad de los cuatro tipos de azúcares principales que se fabrican en Colombia: crudo, blanco, blanco especial y refinado. Según LMC International, la consultoría de negocios líder en el mundo de la agroindustria, Colombia es el país con mayor productividad en el mundo, con un promedio de 16,8 toneladas de azúcar por hectárea entre los años 2015 y 2019. (Asocaña, 2019).

Figura 1. Indicador de productividad mundial



Nota: Cantidad de azúcares totales ajustado por edad de corte (C): Caña (R): Remolacha Fuente: LMC International. Tomado de ASOCAÑA (2019).

La caña de azúcar en Colombia se encuentra cultivada intensivamente en el valle del río Cauca el cual abarca tres departamentos (norte del Cauca, franja central de Valle del Cauca y sur de Risaralda), con una extensión de 241,205 hectáreas sembradas, correspondiente a tierras propias de los ingenios y a pequeños cañicultores, con una producción de 12.5 toneladas de azúcar por hectárea, 444,433 litros de etanol y 1,571,406 MWh de energía eléctrica generada (Cenicaña, 2019), considerado así como el cultivo predominante y el más importante gracias a su gran aporte económico en la región.

4.3 Enfermedades de la caña de azúcar

Los cultivos de caña de azúcar son atacados en todas las etapas del cultivo (desde la siembra hasta el momento de la cosecha) por diversas enfermedades causadas por hongos como roya café (*Puccinia melanocephala*), roya naranja (*Puccinia kuehni*), muermo rojo (*Colletotrichum falcatum*), entre otros; causadas por bacterias como escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli subsp. xyli*), etc.; y causadas por virus como el virus del baciliforme (SCBV), virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV), entre otros. Estas enfermedades afectan de tal manera que, si no se realizan medidas preventivas o se les da un manejo adecuado y oportuno, pueden reducir significativamente el rendimiento de los cultivos y aumentar los costos de producción. Por tal motivo, el centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia (Cenicaña) como corporación, desarrolla diferentes proyectos investigativos que favorecen el progreso del sector azucarero y a la vez se ofrecen diferentes servicios como el servicio de diagnóstico de enfermedades el cual se encarga de diagnosticar las principales enfermedades de la caña de azúcar entre esas el virus de la hoja amarilla (SCYLV) en

zonas productoras en el valle del río Cauca para así poder establecer estrategias de control y prevención.

4.4 *Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV)*

Esta enfermedad se conoció primeramente como YLS (*Yellow Leaf Syndrome*) o síndrome de la hoja amarilla, registrada por Ricaud (1968) en el oriente de África. Es un virus emergente que ha evolucionado por la recombinación de tres géneros: *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus* (Maia et al. 2000); el cual consiste en un ARN monocatenario de sentido positivo de 5899 nucleótidos con 6 marcos de lectura que van desde el ORF0 hasta el ORF5 y 3 regiones no traducidas (UTRs) (Moonan y Mirkov, 1999). A nivel mundial se han reportado 9 variantes genéticas (BRA, PER, CUB, REU, HAW, IND, CHN1, CHN2, CHN3), las cuales han sido descritas y nombradas de acuerdo al origen geográfico donde fueron determinados por primera vez en diferentes ubicaciones geográficas de África, América y Asia (Moonan y Mirkov 2002; Abu Ahmad et al. 2006; Wang y Zhou. 2010; ElSayed et al. 2010; Gao et al. 2012; Chinnaraja et al. 2012; Lin et al. 2014).

Esta enfermedad fue asociada a un virus por primera vez en Hawaii (USA) en el año 1989 (Schenck y Hu, 1991); En 1994 fue detectado en Florida (USA) (Comstock et al., 1994) y en Brasil en el año 1997 fue detectado por medio de microscopía electrónica, después de afectar cerca del 25% del área cultivada en el estado de Sao Paulo sembrada con la variedad SP 71-6163 (Vega et al., 1997; Lockhart y Cronjé, 2000). Una vez se desarrollaron métodos de detección como ISEM, ELISA, TBIA, DBIA y RT-PCR (Schenck et al., 1997; Moonan y Mirkov, 1999; Scagliusi y Lockhart, 2000) fue registrada en casi todos los países cultivadores (Comstock et al., 1998; Lockhart et al., 2000). En África y algunos países de Asia el SCYLV se encuentra asociado a un

fitoplasma (SCYP) como causantes de la enfermedad de la hoja amarilla (Aljanabi et al., 2001).

En Colombia fue detectado en la variedad SP 71-6163 proveniente del Brasil (Victoria et al., 1998), desde entonces se ha logrado detectar y monitorear la presencia del virus en las diferentes variedades cultivadas en lotes semilleros y comerciales en Colombia por medio del Servicio de Diagnóstico de enfermedades de Cenicaja

4.4.1 *Sintomatología*

El síntoma más destacado de la enfermedad es la coloración amarillenta de la nervadura central de la superficie abaxial de la hoja, sin embargo este síntoma puede asimilarse con otros factores bióticos o abióticos como condiciones de estrés, acumulación de agua, daños por insectos o inviernos muy frío (Comstock et al. 1994; Lockhart y Cronje 2000; Izaquirre-Mayoral et al. 2002); otros síntomas de esta enfermedad es la diseminación lateral de la decoloración amarillenta de la nervadura asía la lámina foliar seguida de necrosis tisual desde la punta de la hoja hacia abajo a lo largo de la nervadura central y el acortamiento de los entrenudos terminales (Grisham et al. 2002); las hojas que presenta síntomas generalmente se caracterizan por un aumento de la respiración, una reducción de la fotosíntesis, un cambio en la proporción de hexosa a sacarosa y un aumento en el contenido de almidón (ElSayed et al. 2010), causando una reducción en el contenido de sacarosa en el tallo, el crecimiento y en el rendimiento del cultivo. En plantas asintomáticas se aprecia achaparramiento, pérdida de vigor y muerte de las plantas.

También es posible observar un enrojecimiento de los bordes de la nervadura central en el haz de la hoja. Seguido por la necrosis del tejido desde la punta de la hoja hasta la base, con reducción del crecimiento de la planta (Moonan et al., 2000). Se presenta,

además, disminución en el tamaño de los entrenudos y reducción en el vigor de la planta, generando la disminución de biomasa en variedades susceptibles (Grisham et al., 2002). En términos generales se plantea que la mayoría de variedades de caña cultivadas comercialmente pueden ser infectadas por el virus.

4.4.2 *Transmisión*

Las principales causas de transmisión del virus SCYLV son por medio del uso de semilla vegetativa infectada, y por la acción de insectos vectores como *Melanaphis sacchari* (Zehntner) y *Rhopalosiphum maidis* de orden *Hemiptera*, familia *Aphididae*. En el caso de *Melanaphis sacchari* tienen como nombre común Pulgón gris, ya que su coloración va desde amarillo grisáceo, a coloración como amarillo crema o marrón, la forma en que se transmite el virus primeramente con la ingesta de las partículas virales que se van transportando por el canal alimenticio y se libera al interior del hemocele donde el virus puede permanecer por varios días, luego es transportado a las glandulas accesorias, sin asociarse a la glándula salivar principal; y por último es inyectado cuando el áfido se alimenta de la planta por medio de los ductos salivales localizados lateralmente en el estilete del insecto, liberando las enzimas de la saliva y otras secreciones. En el trópico, la reproducción es partenogénica, por lo cual las colonias son muy numerosas y convirtiéndose a través del tiempo en un insecto clave, para determinar la resistencia al SCYLV en nuevas variedades de caña de azúcar (Victoria et al., 2005).

4.4.3 *Métodos de detección*

Esta enfermedad ha estado presente en Colombia desde antes del año 1998, sólo fue hasta esta época que se pudo detectar mediante las técnicas de diagnóstico disponibles como Tissue blot immunoassay. Según Victoria et al., 1999 este patógeno ingresó al país a través de la variedad SP 71-6163 proveniente de Brasil en 1987, y desde entonces

ha afectado a la mayoría de variedades presentes en el país. En el valle del río Cauca se ha registrado un aumento de incidencia de esta enfermedad en diferentes variedades de caña de azúcar; para el año 2018 se reportó un incremento de 13.2% comparado con el año 2017 que fue de 8%, aunque para el año 2019 se reportó una incidencia de 10.4%. A pesar de que no se han visto grandes efectos en la producción, los cañicultores son conscientes de que el virus se ha diseminado notablemente y que se tiene que evitar un posible efecto devastador tal como ocurrió en Brasil donde la producción de la variedad SP 71-6163 disminuyó entre 60 a 80%, causando pérdidas económicas muy grandes (Victoria et al. 1998).

4.4.3.1 *ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*

ELISA o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas es una técnica inmunológica diseñada por los científicos suecos Eva Engvall y Peter Perlman y holandeses Bauke Klaas Van Weemen y Antonius HWM Schuurs en 1971. Esta técnica se fundamenta en el uso de enzimas que permiten la detección de uniones antígeno-anticuerpo mediante la catalización de una reacción colorimétrica. Consiste en detectar pequeños fragmentos de proteínas llamados antígenos en una muestra de interés, usando moléculas que poseen un anticuerpo que se une al antígeno de forma específica y una enzima que se activa señalando la unión del antígeno. Esta identificación específica muestra pequeños segmentos de proteínas de interés. Como resultado final por medio de la lectura colorimétrica tendremos valores de absorbencia o densidad óptica obtenidos de la longitud de onda óptima para la coloración final alcanzada.

El procedimiento que se debe seguir en esta técnica, consiste en la preparación del plato de poliestireno donde se adiciona los anticuerpos específicos de acuerdo al patógeno a evaluar; luego se incuba el plato para inmovilizar los anticuerpos y se procede a lavar para eliminar el exceso de estos; seguidamente, se cubre el plato con

una proteína como la albumina del suero bovino, que ayuda a bloquear los anticuerpos y protegerlos de reacciones inespecíficas; se incuba el plato con la muestra de extracto de la planta para llevar a cabo la reacción inmune y se la realiza un lavado para eliminar los componentes inespecíficos de la muestra. Luego se adicionan los anticuerpos (marcados o sin marcar), con la enzima ya sea fosfatasa alcalina o peroxidasa y se incuba para que el anticuerpo se conjugue al anticuerpo, y se lava para eliminar el conjugado que no fue adsorbido. Si se usa un antígeno específico sin marcación, se adiciona la enzima conjugada de los anticuerpos anti-especies. Luego, independiente de los anticuerpos usados, se adiciona el sustrato que es degradado por la enzima y se incuba para obtener la coloración. Finalmente, se hace el análisis de los resultados por observación o midiendo la absorbancia a 405nm (fosfatasa alcalina) o 450nm (peroxidasa) (Shcherbakova, 2007).

4.4.3.2 *TBIA (Tissue Blot Immunoassay)*

Esta técnica fue desarrollada para detectar el virus de la hoja amarilla (SCYLV) por Schenck S., Hu J.S. y Lockhart B.E.L., en el año 1997; consiste en realizar impresiones de la nervadura central de la hoja sobre una membrana de nitrocelulosa donde quedan bien plasmado y definidos los paquetes de haces vasculares, esta membrana impresa es tratada primeramente con una solución a base de albumina para bloquearla y protegerla, luego se expone al anticuerpo específico para el patógeno; posteriormente se adiciona el conjugado enzimático según el tipo de inmunoglobulina usada para el anticuerpo, y se revela mediante un sustrato que es degradado por la enzima respectiva, usualmente fosfatasa alcalina. Por último y con ayuda de un estereoscopio de revisan las impresiones observando si se presenta coloración violeta dentro de los vasos del floema de la hoja indicándonos la presencia del virus (Aday et al., 2011).

4.4.3.3 DBIA (*Dot Blot Immunoassay*)

El Dot Blot es una técnica sencilla donde se puede identificar una proteína conocida o de interés en una muestra biológica de forma fácil y simple; Esta técnica se basa en la fijación de ácidos nucleicos totales en membranas de nitrocelulosa que son reconocidos por sondas con marcación radioactiva o sondas isotópicas; los resultados se visualizan por medio del cambio de color de la membrana o por medio de una película de detección (Astier et al., 2007)

4.4.3.4 RT-PCR (*Transcripción Reversa de Reacción en Cadena de Polimerasa*)

La RT-PCR es una técnica de laboratorio muy usada en biología molecular, trabaja usando como molde inicial una cadena de ARN y una enzima llamada transcriptasa inversa o transcriptasa reversa que se encarga de convertir esa hebra de ARN a ADN complementario; este método se basa en los retrovirus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN a ADN y duplicarse así en millones de partículas virales (Hershhorn et al. 2010).

El desarrollo inicial de esta técnica consta de los siguientes pasos

- Retrotranscripción del ARN: en este primer punto se usan cebadores hexámeros, oligonucleótidos de seis nucleótidos de secuencia aleatoria que se van uniendo al azar en el ARN molde convirtiéndolo así en ADN complementario (ADNc).
- Amplificación a partir del ADN complementario: Este ADNc se hibrida con uno de los cebadores que conducen a la síntesis de la primera hebra.
- PCR estándar: el ADN complementario (ADNc) se desnaturaliza y sus hebras se separan por medio del aumento de temperatura a 94°C generalmente durante 20-30 segundos, luego la temperatura de la reacción disminuye a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según la temperatura de hibridación o temperatura melting para

los cebadores) para permitir que los cebadores específicos se alinean al extremo 3' y 5' permitiendo así la unión a la secuencia complementaria del ADN molde, posteriormente actúa la Taq polimerasa comúnmente a una temperatura de 72°C sintetizando la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial para la síntesis del nuevo ADN (Tamay de Dios et al. 2013).

Los equipos utilizados para realizar esta técnica son los termocicladores, ya que están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperaturas y tiempos establecidos no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la RT-PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa por medio de electroforesis para confirmar si la reacción fue exitosa.

4.4.3.5 *PCR tiempo real*

Higuchi y colaboradores fueron los primeros que desarrollaron la PCR en tiempo real por medio de la videograbación de la incorporación del bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz ultravioleta (Higuchi et al. 1992); por tal motivo, la PCR en tiempo real tiene como objetivo detectar las secuencias específicas o de interés de ácidos nucleicos mediante la emisión de fluorescencia en cada ciclo de la reacción y cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR convencional. El equipo utilizado es un termociclador especial con un dispositivo para excitar al reportero, capturar la señal de emisión del mismo y realizar el análisis cuantitativo mediante la fluorescencia generada por una sonda incorporada o agente intercalante (SyberGreen®) en el nuevo amplicón o por sondas liberadas en una solución buffer durante el proceso de amplificación. Esta

técnica es altamente sensible y específica, dado que logra detectar bajas cantidades de ADN o en este contexto cADN transcrito inversamente a partir de un ARN viral, comparado con otras técnicas basadas en ácidos nucleicos como la PCR convencional, la hibridación molecular y las de inmunodiagnóstico

Actualmente, la RT-PCR convencional y en menor escala la PCR cuantitativa o en tiempo real, son las técnicas moleculares más utilizadas para el diagnóstico de esta enfermedad, ya que en comparación con las técnicas de inmunopresión como TBIA, éstas permiten realizar la identificación rápida y confiable del virus en diferentes variedades de caña de azúcar, pero sobretodo con mayor sensibilidad.

4.5 Impacto de la enfermedad del virus de la hoja amarilla

Asocaña resalta que el manejo del cultivo incide en la reacción que puede tomar las platas ante una afectación:

Debemos tener en cuenta que factores ambientales, fisiológicos y de manejo del cultivo pueden generar un cambio en el desempeño de cualquier variedad ante una infección alta por el virus, con posibles efectos en la producción como ha sido ampliamente documentado en investigaciones realizadas en Colombia y en otros países cultivadores. Por otro lado, incrementar las fuentes de inóculo puede afectar futuras variedades que tengan mayor impacto en producción, como sucedió en el pasado con CC 84-75. (Asocaña, 2017).

5. Metodología

5.1 Localización

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de servicio de diagnóstico de enfermedades de la Estación Experimental San Antonio de los Caballeros (EESA) de CENICAÑA, ubicadas en corregimiento San Antonio de los Caballeros perteneciente al

municipio de Florida (Valle del Cauca), a 3° 21' de latitud Norte, 76° 18' de longitud Oeste y 1024 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de 23.3 °C, precipitación media anual de 1141 mm y humedad relativa de 80%

5.2 Selección de Variedades

Para realizar este trabajo se seleccionaron 13 variedades de caña de azúcar para las 3 mega ambiente (Zona húmeda, semiseca y piedemonte) que se muestran en la Tabla 1, teniendo en cuenta que fueron las más solicitadas en el servicio de multiplicación y propagación de variedades para su siembra en lotes comerciales y semilleros en el valle del río Cauca y a su vez las más procesadas en el laboratorio de servicio de diagnóstico de enfermedades de Cenicaña en el año 2019.

Tabla 1. Variedades para cada mega ambiente

Zona Húmeda	Zona Semiseca	Pie de monte
CC 01-1940	CC 01-678	CC 00-3257
CC 10-450	CC 01-746	CC 00-3771
CC 11-595	CC 05-430	SP 71-6949
CC 11-600	CC 09-066	
	CC 09-535	
	CC 85-92	

Fuente: Autoría propia (2020).

5.2.1 Toma de la muestra en campo

La toma de muestra se realizó en cultivos con edades entre 7 y 9 meses de edad, para lotes comerciales se tomó una muestra por cada cinco hectáreas y en lotes semilleros se tomó una muestra por cada tres hectáreas; se hizo un recorrido en zigzag para tomar al azar la hoja TVD (primera hoja con cuello visible) recolectando así 20

hojas en total las cuales componen una muestra y cubriendo todo el lote. La hoja se debe desprender del tallo delicadamente evitando desgarre o daño en la nervadura, luego con una tijera se cortan los primeros 30cm desde la parte basal (esa es la parte que usamos para realizar la extracción de ARN); al tener las 20 porciones basales de la hoja TVD se juntan y se rotula con la siguiente información: nombre del ingenio, nombre de la hacienda, código de la suerte, área del lote, variedad y la edad del lote. Luego se conservo la muestra en una nevera de icopor con pilas refrigerantes hasta llevarla al laboratorio del servicio de diagnostico de enfermedades.

5.2.2 Adecuación de la muestra

En el laboratorio de diagnostico de enfermedades se procedió a limpiar cada muestra con un paño húmedo, luego se extrajo un parte de la lamina foliar la cual fue utilizada para realizar la extracción de ARN y de adecuo la nervadura central dejándola totalmente libre de la lamina foliar para después hacer las impresiones en la membrana de nitrocelulosa.

5.3 Extracción de ARN

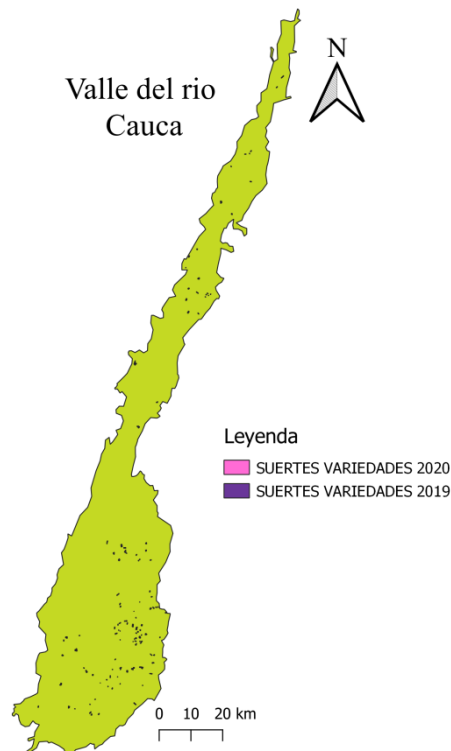
Con un sacabocado se realizo una perforación a cada hoja que compone una muestra para tener un total de 20 discos dejándolos caer en nitrógeno liquido y luego depositándolos en un tubo de eppendorf de 1.5ml el cual tenía en su interior perlas de vidrio de 1mm de diámetro y se dejo en una nevera de icopor con nitrógeno liquido mientras se terminaban de cortar todas las muestras. Luego se procedió a macerar mecánicamente con un amalgamador Mixer MSD/21540 y se volvió a poner en nitrógeno liquido para evitar la degradación de la muestra mientras se trituraban todas las muestras. Luego se inicio la extracción del ARN siguiendo el protocolo de Trizol Reagent® de invitrogen. Luego el ARN extraído fue resuspendido en 100µl de agua DEPC. La concentración del ARN de cada muestra se midió con espectrofotómetro

Nanodrop (Thermo Scientific) y luego se diluyo cada muestra con agua DEPC llevando al concentración a 50ng/ μ l y por último se almaceno el ARN en el congelador de -20°C.

5.4 Selección de muestras

En el laboratorio de servicio de diagnóstico de enfermedades del Centro de investigación de la caña de azúcar (Cenicaña) se guardó ARN extraído de muestras foliares de las variedades de caña de azúcar seleccionadas, provenientes de ingenios azucareros ubicados a lo largo del valle del rio Cauca durante el año 2019 y el primer semestre del 2020, recolectando un total de 627 muestras diagnosticadas como positivas para SCYLV por la técnica de TBIA. Luego se realizó un muestreo aleatorio por medio del software estadístico SAS stat versión 9.3, donde quedaron 130 muestras para iniciar el trabajo.

Figura 2. Ubicación geográfica de las muestras seleccionadas



Fuente: Autoría propia (2020).

5.5 Selección de cebadores

También se seleccionaron diferentes pares de cebadores los cuales se ubican en diferentes regiones del genoma como se muestra en la figura 3 y que han sido asociados a las diferentes variantes genómicas reportadas. En la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) se buscó el genoma completo del virus SCYLV y sus variantes genómicas por medio del número de acceso: SCYLV (NC_000874.1), REU-YL1a (AM072754.1), IND1 (JF925152.1), Haw73-6110 (GU570008.1), PER-YL1a (AM072752.1), CHN-YL1 (AM072751.1), BRA-YL1 (AM072750.1), CUB-YL1 (AM083988.1), COL (AF369927); y se buscó que pares de cebadores amplificaban alguna parte del genoma de cada variante como se muestra en la tabla 2.

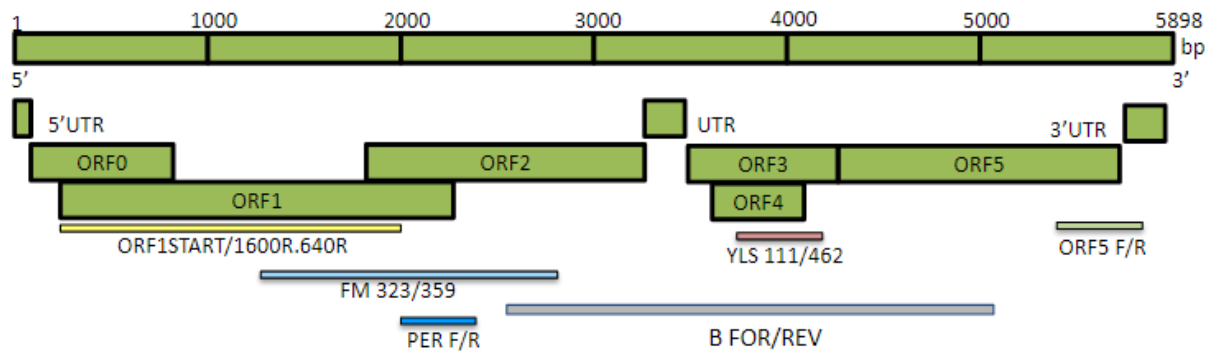
Tabla 2. Lista de Cebadores

Cebadores	Secuencia 5' – 3'	Producto de amplificación	Fragmento amplificado y ubicación en el genoma	Referencia
ORF1START	ATGGCCCCAACA CTCCCGTTTACA	1621 pb	Parcial ORF0 y ORF1	<i>Borg Z et al (2001)</i>
160R.640R	GAATCAACTGCG AGACGATG			
FM323	CAGACATTGCTG ATTAC	1212 pb	Parcial ORF 1 y ORF 2	<i>Moonan y Mirkov (2002)</i>
FM359	GCTCTCCACAAA GCTATCT			
PER-F	AACTGCTGCGTC AGGCCCA	364 pb	Parcial ORF 2	<i>Abu Ahmad et al. (2006)</i>
PER-R	GACGAGCTTGCG TTGTTTTTCT			
YLS111	TCTCACTTTCAC GGTTGACG	352 pb	Parcial ORF3 y ORF4	<i>Abu Ahmad et al. (2006)</i>
YLS462	GTCTCCATTCCCT T			

ORF5 FOR	CTAACGCTTCAC GTTCAGCC	588 pb	3'UTR y parcial ORF5	<i>Abu Ahmad et al. (2006)</i>
ORF5 REV	GCAGTGCCTCCC TGTATTCC			
B FOR	GGATTGTGCGAT CCGATTCG	1880 pb	ORF 3 y 4 completos y parcial ORF 2 y 5	<i>Abu Ahmad et al. (2006)</i>
B REV	CAGTTGCTCAAT GCTCCACG			

Fuente: Autoría propia (2020).

Figura 3. Genoma completo del virus Sugarcane Yellow leaf virus según Moonan, et al (2000) y la ubicación de los fragmentos de cada par de cebadores.



Fuente: Autoría propia (2020).

5.6 Detección del patógeno por TBIA

Luego de realizar la limpieza y adecuación de la nervadura para llevar a cabo la impresión de esta en la membrana de nitrocelulosa, se realizó el proceso de TBIA siguiendo el protocolo establecido por Guzmán y Victoria, 2001; el cual consistía en incubar las membranas a temperatura ambiente en una solución de bloque que está compuesta por TBS, leche descremada y albúmina suero bovino (0.5%) y dejarlas en agitación circular por 1 hora; luego se realizaron dos lavados rápidos con TBS para eliminar la solución de bloque; después se aplicó a cada membrana la solución de antisuero primario en la dilución 1:10000 en una solución de trabajo (leche descremada

al 1% en TBS), se deja en agitación circular durante la noche (overnight), al siguiente día se descarto la solución del antisuero primario y se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con TBS; después se adiciono la solución del conjugado con el antisuero secundario que consiste en inmunoglobulina *Anti-rabbit* conjugada con fosfatasa alcalina, a una titulación de 1:5000 en la solución de trabajo (leche descremada al 1% en TBS) y se dejo en agitación circular una hora, pasado el tiempo se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con TBS y por último se realizo la fase de revelado donde se adiciono el sustrato para la fosfatasa alcalina que consiste en una solución de 6 µl de *Bromo Cloro-Indolifosfato* (BCIP) 25mg/µl y 6 µl de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) 50mg/µl por cada 1ml de buffer sustrato y dejar en agitación circular por 25 minutos, culminado el tiempo, se descarta la solución de revelado y se lavan las membranas con abundante agua y se dejan secando a temperatura ambiente.

Una vez las membranas estuvieron secas, se pudo observar por medio del estereomicroscopio la reacción colorimétrica donde las reacciones positivas evidenciaron una coloración violeta oscura en los vasos vasculares de las impresiones de la nervadura central de la muestra sobre la membrana nitrocelulosa y las reacciones negativas no ocurrió tensión.

5.7 Detección del patógeno por RT-PCR

Se realizó la detección molecular a las 130 muestras se ARN seleccionadas mediante Reacción de Cadena de Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR) en el termociclador Bio-Rad T100TM; utilizando el kit Verso 1-Step qRT-PCR kit Plus ROX Vial que incluye una transcriptasa reversa Verso®, que se activa a altas temperaturas y genera largas cadenas de cDNA en una misma reacción, permitiendo realizar la reacción de retro transcripción y PCR en un solo paso; utilizando el protocolo sugerido por la casa comercial Thermo Scientific de la siguiente manera: 0.25 µl de

verso enzyme mix, 12.5 µl de 2X 1-Step qPCR Mix, 1.25 µl RT Enhancer, 1 µl de los cebadores forward y reverse (10 µM), 4 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl de ARN para un total de 25 µl por muestra. Y se programaron para cada par de cebadores los siguientes perfiles de amplificación que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Perfil de amplificación para los cebadores seleccionados.

Cebadores	Perfil de amplificación
ORF1START 160R.640R	50°C por 30 minutos, 95°C por 15 minutos, 14 ciclos de 94°C por 30 segundos, 74°C por 45 segundos (-1°C por ciclo), 72°C por 2 minutos, y 16 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minutos y una extensión final de 72°C por 10 minutos
FM323 FM359	42°C por 60 minutos, 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.
PER-F PER-R YLS111 YLS462	42°C por 15 minutos, 95°C por 15 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 2 minutos y 72°C por 2 minutos con una extensión final de 72°C por 2 minutos.
ORF5 FOR ORF5 REV	50°C por 15 minutos, 95°C por 15 minutos, 14 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos (-1°C por ciclo), 72°C por 2 minutos, y 16 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minutos y una

extensión final de 72°C por 10 minutos.

42°C por 30 minutos, 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 45 segundos, 72°C por 4 minutos y una extensión final de 72°C por 15 minutos.

***B FOR B REV**

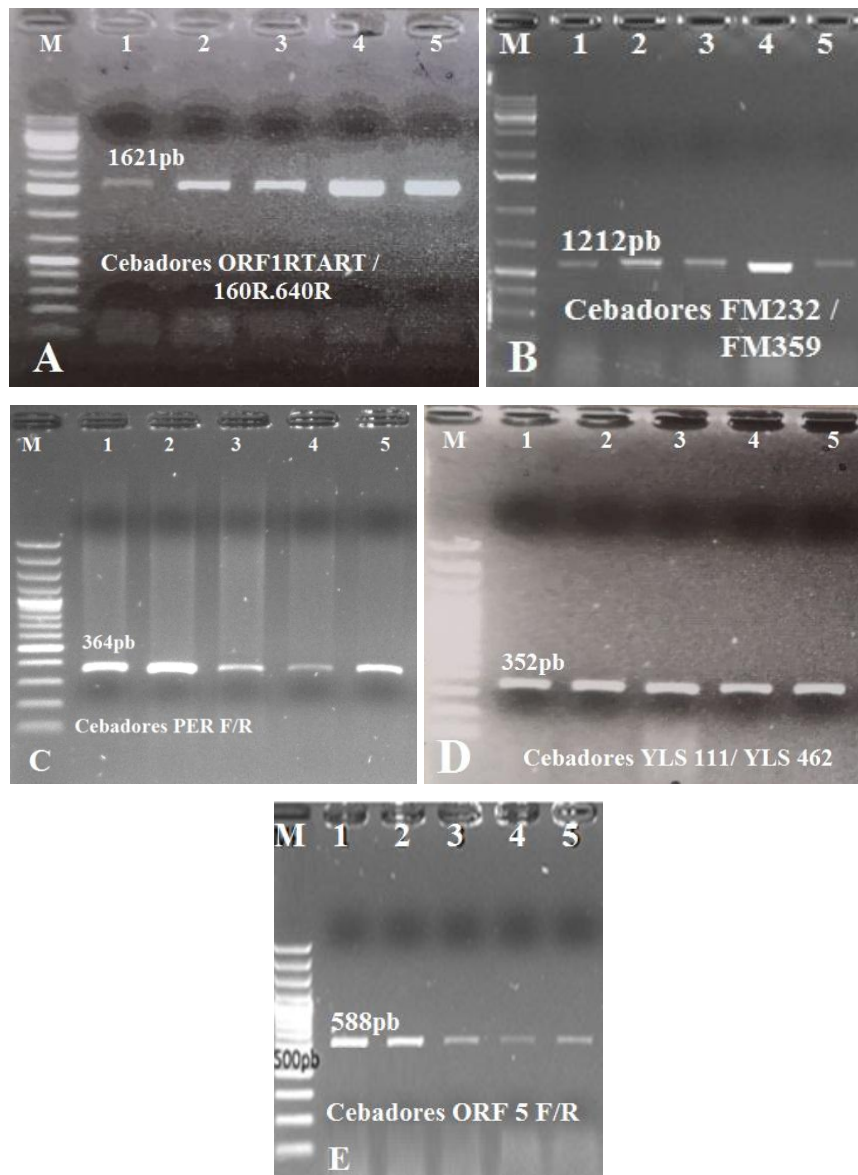
42°C por 45 minutos, 95°C por 10 minutos, 33 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 2 minutos, 72°C por 4 minutos y una extensión final de 72°C por 15 minutos

50°C por 15 minutos, 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 45 segundos, 72°C por 1 minutos y una extensión final de 72°C por 15 minutos

Nota: Se establecieron estos tres perfiles de amplificación para estos cebadores y no se mostraron resultados positivos por tal motivo no se siguieron analizando las 130 muestras.

Los producto de RT-PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% utilizando buffer TBE 0.5X; se combinó 3 µl de buffer de carga 1X (Gel-loading buffer type III) y 5 µl del producto de RT-PCR de cada muestra para darle peso a al producto amplificado y se sirvió un total de 8 µl de esta mezcla en cada pozo del gel de agarosa, luego se dejó en cámara de electroforesis horizontal (GIBCO BRL Life Technologies) a 100 voltios por 40 minutos. El gel de agarosa se visualizó bajo luz UV en el gel documentador system (GSD), los resultados se expresaron cualitativamente por medio de la presentica (positivo) o ausencia (negativo) del fragmento o banda a la altura específica para cada par de cebadores como se muestra en la figura 3.

Figura 4. Resultados de amplificación de RT-PCR para cada par de cebadores.



Nota: Se describen cada uno de los resultados de amplificación de RT-PCR para cada par de Cebadores. A) ORF1START/160R.640R; B) FM323/FM359; C) PER-F/PER-R; D) YLS111/YLS462; E) ORF5 FOR/ORF5 REV. Autoría propia (2020).

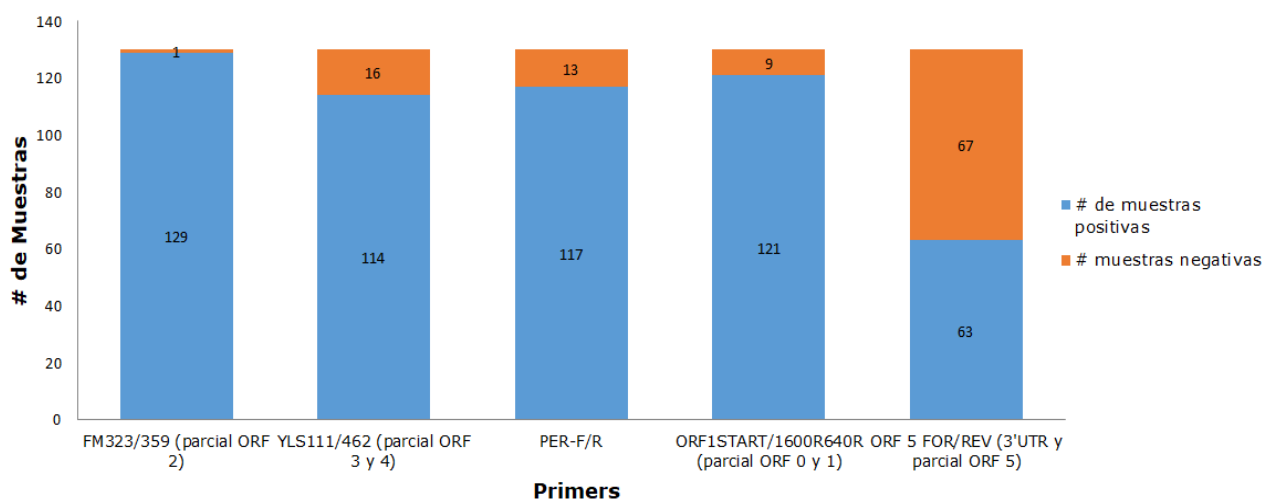
6. Resultados y análisis

6.1 Resultados de los Análisis Por Cebadores

Los cebadores FM323/FM359 que abarcan la región parcial ORF 2 correspondiente al final de la replicasa y parte de la proteína de la cápside del genoma

detectaron la presencia del virus SCYLV en 129 muestras; los cebadores YLS111 / YLS462 que amplifican la región parcial ORF 3 y ORF 4 detectaron presencia del virus SCYLV en 114 muestras; Los cebadores ORF1START/160R.640R que amplifican la región parcial ORF 0 y ORF 1 detectaron presencia del virus SCYLV en 121 muestras los cebadores PER F / PER R que amplifican la región parcial ORF 2, detectaron presencia del virus SCYLV en 117 muestras; y los cebadores ORF5 F/R que amplifican la región 3'UTR y parcial ORF 5, detectaron presencia del virus en 63 muestras que se encuentran ubicadas a lo largo del valle del río Cauca.

Figura 5. Resultados de los análisis por par de cebadores.



Fuente: Autoría propia (2020).

6.2 Grupos De Resultados

Teniendo los resultados de todas las pruebas moleculares a las 130 muestras, se agruparon los resultados de la siguiente manera, donde “1” es un resultado positivo y “0” es un resultado negativo.

Tabla 4. Grupos de resultados

Grupos de resultados	FM 323 FM 359	YLS111 YLS462	PER-F PER-R	ORF1START 1600R640R	ORF5 FOR ORF5 REV	# de muestras

A	1	1	1	1	1	55
B	1	1	1	1	0	50
C	1	1	1	0	0	2
D	1	0	1	1	1	2
E	1	0	0	0	1	1
F	1	1	1	0	1	3
G	1	1	0	1	0	2
H	1	0	0	0	0	1
I	0	0	0	0	0	1
J	1	1	0	0	1	1
K	1	1	0	1	1	1
L	1	0	1	1	0	5
M	1	0	0	1	0	4

Nota: En la siguiente tabla se consolidan los grupos de resultados. Autoría propia (2020).

6.3 Análisis de componentes principales

Como se contaba con gran información sobre las muestras seleccionadas, se realizó un análisis de componentes principales con las variables: variedad, lote comercial, lote semillero, edad, corte, precipitación anual, temperatura máxima, temperatura media, temperatura mínima, radiación, velocidad del viento y cluster

climático con el fin de determinar cuál de las variables son importantes dentro de los 13 grupos de resultados.

Tabla 5. Análisis de componentes principales

Número de componentes	Valor propio	% de diferencia	% acumulativo
1	3,39078	28,257	28,257
2	2,40016	20,001	48,258
3	1,83185	15,265	63,523
4	1,20391	10,033	73,556
5	0,982133	8,184	81,740
6	0,888669	7,406	89,146
7	0,823934	6,866	96,012
8	0,313807	2,615	98,627
9	0,13371	1,114	99,741
10	0,0302359	0,252	99,993
11	0,000805034	0,007	100,000
12	3,32771E-16	0,000	100,000

Fuente: Autoría propia (2020).

Solo 4 componentes lograron explicar el 73,556 de la variación total, lo que quiere decir que muy posiblemente los 13 grupos de resultados son extremadamente variables y no hay como relacionarlos directamente con una variable determinada.

También se realizó el análisis de los pesos de las variables dentro de los componentes para sacar las variables más importantes para realizar análisis posteriores, en donde encontramos que las variables temperatura máxima, precipitación anual y

velocidad del viento tenían mayor peso dentro de cada uno de los componentes dándonos a entender que las variables ambientales son de mayor peso dentro del estudio.

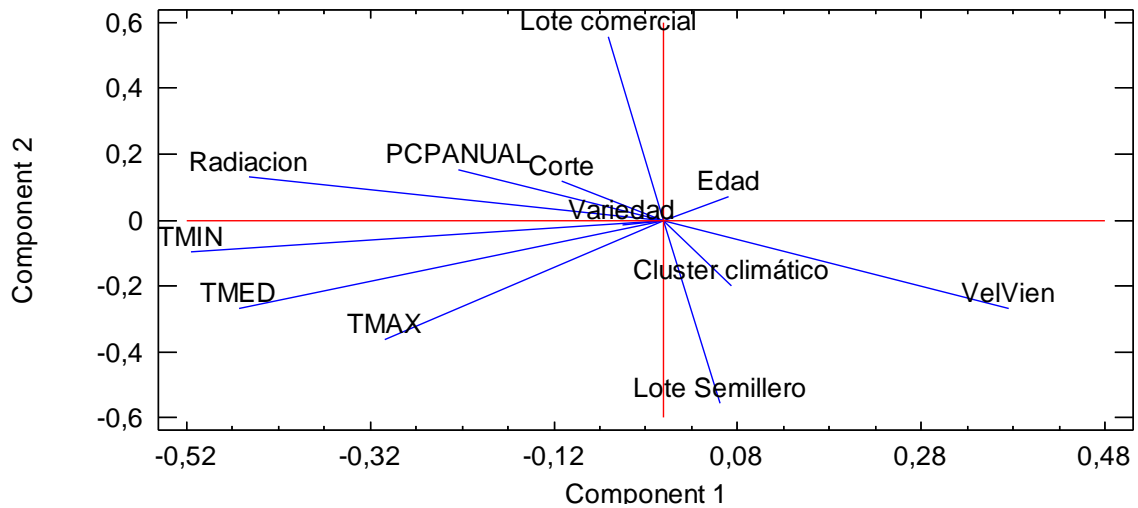
Tabla 6. Peso de las variables dentro de los componentes

VARIABLES	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
Cluster climático	0,0725362	-0,197949	0,622203	-0,179117
Corte	-0,112257	0,119934	0,0715978	0,409202
Edad	0,0704093	0,0701114	0,143357	-0,328662
PCPANUAL	-0,223715	0,15188	0,360644	-0,450792
Radiación	-0,451891	0,132284	-0,143323	-0,0721271
TMAX	-0,304764	-0,362875	0,362374	0,232261
TMED	-0,463338	-0,267297	0,145149	0,139618
TMIN	-0,515506	-0,0961906	-0,112703	0,0210945
Variedad	-0,044836	-0,0164742	0,00724897	-0,53413
Vel. Vien.	0,374539	-0,26958	0,328995	0,247314

Fuente: Autoría propia (2020).

En la figura 6 tenemos el resultado final de este análisis donde podemos corroborar la información anterior y también podemos observar auto correlaciones entre las variables como por ejemplo las variables temperatura máxima, temperatura media y temperatura mínima se auto correlación, sin embargo, al temperatura máxima es la variable con mayor peso. La edad, la variedad, el corte y el cluster climático prácticamente no tienen ningún peso.

Figura 6. Resultado de los análisis de componentes principales

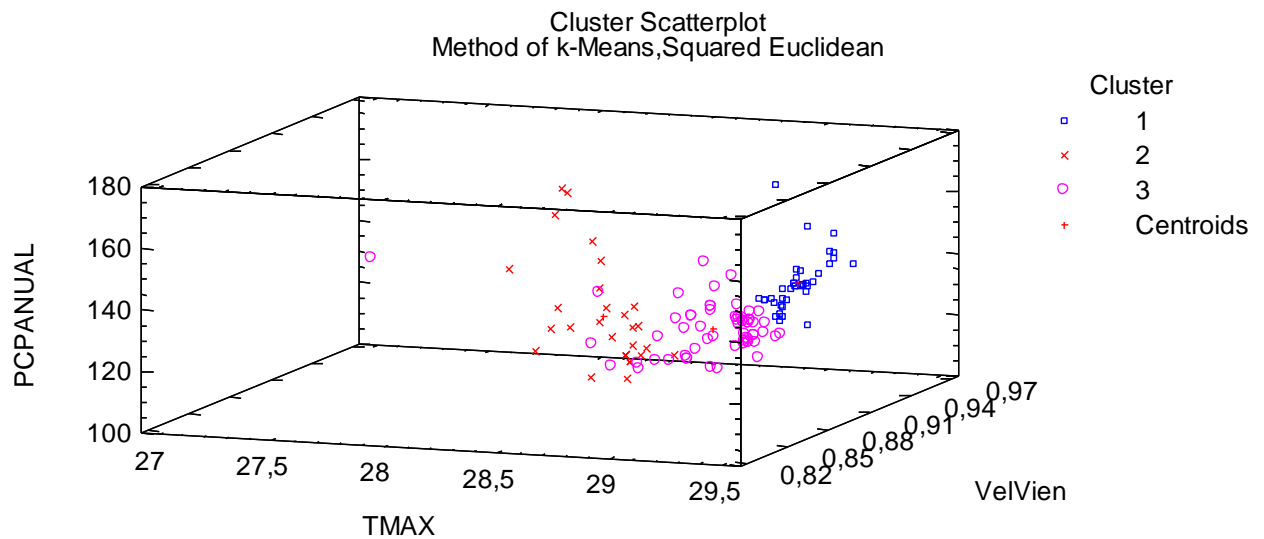


Fuente: Autoría propia (2020).

6.4 Análisis de Cluser

Se realizó el análisis de clusterización utilizando el método k-Means con las variables más importantes, dando como resultado que las muestras se agrupan en 3 clusters con características definidas como observamos en la siguiente figura 7. El cluster 1 se consideró específico ya que presenta temperaturas máximas altas, precipitación anual alta y velocidad del viento relativamente alta; En el cluster 2 se presenta mucha variación en la precipitación y velocidad del viento y una temperatura máxima entre 28°C y 29°C; y el cluster 3 presenta temperatura máxima no tan alta, precipitación anual media y velocidad del viento intermedia.

Figura 7. Análisis de clusterización

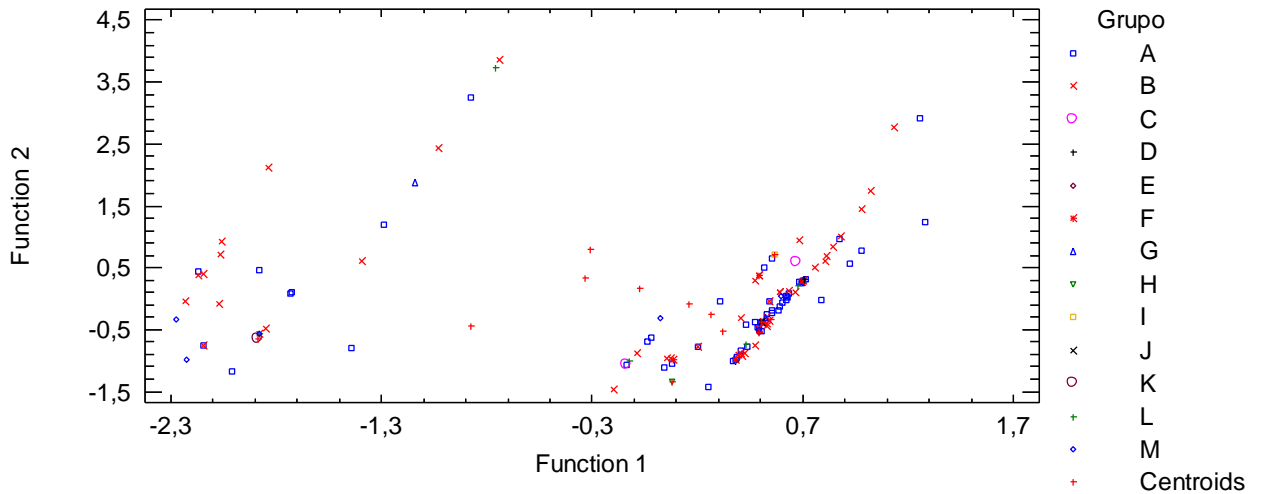


Fuente: Autoría propia (2020).

6.5 Análisis discriminante

Para este análisis se utilizaron una serie de variables como: cluster climático, corte, precipitación anual, radiación, variedad, velocidad del viento, temperatura máxima, temperatura media y temperatura mínima; para tratar de crear funciones adimensionales en función de la importancia. En este análisis solo dos funciones fueron significativas logrando explicar el 60 % de la variabilidad indicando así que es difícil explicar los 13 grupos de resultados en función de las variables que se tienen y mostrando un fenómeno muy aleatorio.

Figura 8. Análisis discriminante en 2 funciones



Fuente: Autoría propia (2020).

6.6 Secuenciación

Con los análisis anteriores se pudieron seleccionar 12 muestras (1 muestra por cada grupo de resultados) para enviar a secuenciar los productos de RT-PCR; al tener las secuenciaciones se procedió a ensamblar las secuencia correspondientes a cada par de cebadores en el programa Geneious 10.1.3 para tener un consenso final con el cual se realizó un Blast en el NCBI y así obtener los porcentajes de identidad de cada una de las secuencias de las accesiones AM072750 (BRA), AM072752 (PER), AM072754 (REU), JF925152 (IND), GU570008 (HAW), AM072751 (CHN1), GU327735 (CHN), KJ145181 (CHN3), AM083988 (CUB), AF369927 (COL).

Tabla 7. Muestras seccionadas para secuenciar

Muestras	Variedad	FM 323/	YLS111 /	PER F/R	ORF1START /	ORF5 FOR /
		FM 359	YLS462		1600R640R	ORF5 REV
128	CC 01-1940	1	0	0	0	0
108	CC 01-678	1	0	0	0	1
92	CC 05-430	1	0	0	1	1
80	CC 11-600	0	1	0	1	1

67	CC 85-92	1	1	0	0	0
65	CC 09-066	0	0	0	1	0
49	CC 10-450	1	1	0	1	0
38	SP 71-6949	1	1	1	1	1
35	CC 09-535	1	1	1	0	1
28	CC 00-3257	0	0	1	0	0
18	CC 01-746	0	0	0	1	0
9	CC 00-3771	0	0	1	0	1

Fuente: Autoría propia (2020).

Tabla 8. Porcentaje de identidad

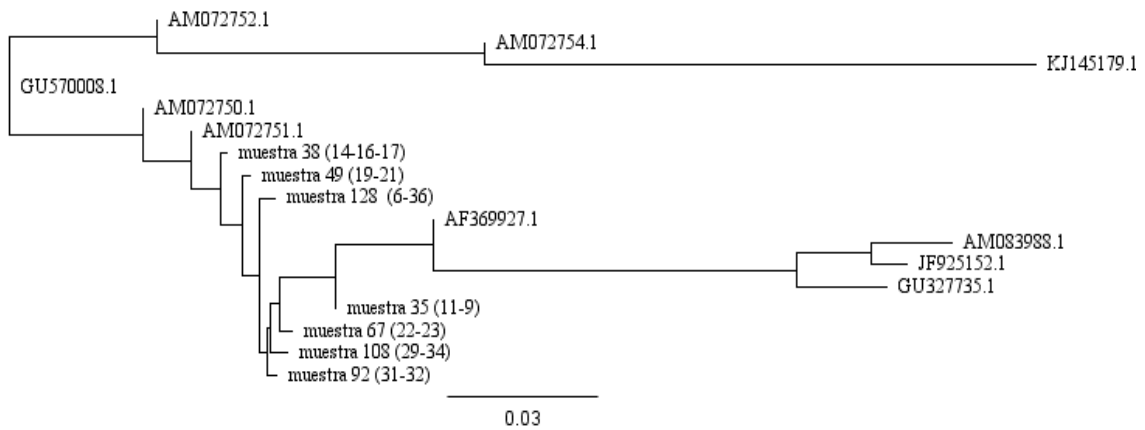
Muestras	VARIANTE GENOMICA																							
	BRA		PER		REU		IND		HAW		CHN		CUB		CHN3		CHN1		COL					
	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.	% Query coverage	% Iden.				
18 ORF1	100	96,72	100	94,89	100	91,01	99	84,36	94	94,45	100	97,24	99	83,25	0	0	99	84,22	35	97,69				
38 ORF1	95	98,2	95	96,34	95	93,32	93	81,15	90	96,37	95	98,49	93	80,57	0	0	93	80,89	15	98,28				
49 ORF1	100	97,65	100	96,13	100	93,4	99	81,88	96	95,98	100	98,03	99	81,34	0	0	99	81,73	22	98,27				
65 ORF1	99	96,84	99	94,52	98	91,31	98	83,49	92	94,3	99	97,39	98	82,85	0	0	98	83,06	40	97,63				
80 ORF1	100	97,17	100	95,08	100	91,39	100	83,52	93	94,67	100	97,66	100	82,43	0	0	100	83,03	36	98,33				
92 ORF1	100	97,43	100	95,02	99	91,19	95	83,6	90	94,97	100	97,89	95	82,99	0	0	95	83,54	34	96,94				
35 FM	100	98,98	100	97,44	100	95,29	100	91,84	100	97,54	100	99,18	98	92,39	11	94,02	100	92,94	100	99,18				
38 FM	100	98,1	100	96,38	99	94,04	99	89,77	85	97,08	100	98,28	98	90,13	44	97,68	99	90,78	100	98,53				
49 FM	99	98,28	99	96,65	99	94,17	99	89,82	95	97,2	99	98,28	98	90,16	45	96,92	99	91,01	99	98,37				
67 FM	100	98,43	99	96,84	99	94,31	99	90,03	94	97,3	99	98,69	97	90,22	0	0	99	90,99	100	98,52				
92 FM	100	98,77	100	97,25	100	94,7	100	89,81	94	98,13	99	99,05	100	90,27	0	0	100	91,12	100	98,96				
108 FM	100	97,99	100	96,24	100	93,88	100	89,38	95	96,62	100	98,08	98	89,72	0	0	100	90,5	100	98,16				
128 FM	100	98,52	100	96,85	100	94,25	100	89,65	94	97,36	100	98,61	100	90	0	0	100	90,93	100	98,61				
9 PER	100	99,73	100	98,08	100	94,79	99	91,67	100	97,81	100	99,18	99	93,1	0	0	99	92,53	99	99,73				
28 PER	99	99,72	99	98,07	99	94,75	99	90,93	99	97,79	99	99,17	99	92,29	0	0	99	91,74	99	99,72				
35 PER	100	99,72	100	98,06	100	94,74	96	91,76	100	97,78	100	99,17	96	93,16	0	0	96	92,59	100	99,72				
38 PER	99	99,18	99	97,53	99	94,25	99	90,71	99	97,26	99	98,63	99	92,08	0	0	99	91,53	99	99,18				
35 YLS	99	99,15	99	99,43	99	99,43	99	96,88	99	99,43	99	100	0	0	0	0	99	96,32	99	99,72				
38 YLS	100	99,15	100	99,43	100	99,43	100	96,88	100	99,43	100	100	0	0	0	0	100	96,32	100	99,72				
49 YLS	99	99,15	99	99,43	99	99,43	99	96,88	99	99,43	99	100	0	0	0	0	99	96,32	99	99,72				
67 YLS	99	98,87	99	99,15	99	99,15	99	96,6	99	99,15	99	99,72	0	0	0	0	99	96,03	99	99,43				
80 YLS	94	99,15	94	99,43	94	99,43	94	96,88	94	99,43	94	100	0	0	0	0	94	96,32	94	99,72				
9 ORF5	66	95,17	66	92,24	66	91,67	88	82,8	99	95,03	66	96,88	0	0	0	0	99	83,36	0	0				
35 ORF5	63	95,36	63	91,88	63	91,59	90	83,7	95	94,44	63	97,1	0	0	0	0	98	83,09	0	0				
38 ORF5	65	96,08	65	92,17	65	90,6	100	82,14	95	94,99	65	97,91	0	0	0	0	98	83,88	0	0				
80 ORF5	64	94,64	64	91,91	64	90,88	100	80,72	95	95,06	64	97,05	0	0	0	0	98	82,9	0	0				
92 ORF5	67	94,56	67	90,67	67	90,16	99	81,13	97	93,76	67	96,37	0	0	0	0	99	83,51	0	0				
108 ORF5	63	95,02	63	91,9	63	90,97	94	82,37	98	94,77	63	97,2	0	0	0	0	100	83,98	0	0				

Fuente: Autoría propia (2020).

En los porcentajes de identidad de cada una de nuestras secuencias para cada par de cebadores nos confirma que los cebadores FM 323 / FM 359 son altamente sensibles para detectar la presencia de cualquier variante genómica del virus. También se lograron alinear las muestras que amplificaron con los cebadores ORF1START / 1600R640R y FM 323 / FM 359 para tener un fragmento de secuencia más grande y poder realizar un

pequeño análisis filogenético con las aserciones de las variantes genómicas del virus seleccionadas anteriormente, dándonos como resultado que nuestras secuencias están estrechamente relacionadas con la variante de Brasil y las accesiones reportada para Colombia.

Figura 9. Análisis Filogenético



7. Conclusiones

La investigación desarrollada posee gran importancia en cuanto a la identificar los cebadores más adecuados para detectar el virus de la hoja amarilla y sus variables, esto permite generar acciones correctivas tempranas y adecuadas según las características del patógeno.

Los cebadores FM323/FM359 son los más sensibles para detectar el patógeno, gracias a que el marco de lectura o la región que abarca, permite detectar eficientemente la presencia del patógeno y al analizar el genoma completo con los diferentes cebadores seleccionados se pudo verificar que las regiones que abarca estos cebadores son menos variables permitiendo más fácil la detección del virus.

8. Recomendaciones

- Es importante que los cañicultores realicen análisis de detecciones del patógeno en sus semilleros con el fin de evitar la propagación de este patógeno usando semillas limpias y sanas ya que disminuyen las fuentes de inoculación del virus, por ende, es importante garantizar condiciones óptimas y de calidad de los semilleros.
- Aplicar la resistencia varietal para disminuir los niveles de incidencia del patógeno en campo
- Es fundamental el manejo agronómico de los cultivos afectados, manteniendo la hidratación del suelo y mantener la fertilidad, garantizando condiciones favorables de desarrollo de las plantas.

9. Referencias

- Abu Ahmad, Y., Royer, M., Daugrois, J. H., Costet, L., Lett, J. M., Victoria, J. I., Girard, J. C., y Rott, P. (2006) *Geographical distribution of four Sugarcane yellow leaf virus genotypes*. Plant Disease. 90, 1156-1160.
- Acosta Y. C., Cadavid M., Cardozo C., Angel J. C., Victoria J. I., Angel J. C. (2014) *A Development of a real-time pcr assay to detect sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) in sugarcane in colombia*. Poster en: Congreso de la Sociedad Americana de Fitopatología APS. USA.
- Acosta Y. C., Cadavid M., Angel J. C., Victoria J. I., Angel C. A. (2015). *Diagnóstico del virus de la hoja amarilla (SCYLV, Polerovirus) mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR)*. Presentación oral en: Congreso de Tecnicaña. Cali – Colombia.
- Aday O., China A., Mesa J. M., Hechavarría M., Zárdon M., Díaz F., Suarez H. J. Delgado I., Machado L. F., Reyes S., Barroso J. Y., Gallardo A. (2011). *Fitoplasmas y virus de la hoja amarilla en el germoplasma y colecciones de caña de azúcar en la región central de Cuba*. Fitosanidad. Vol. 15. No. 4. p: 195 - 204
- Aljanabi, S., Parmesser, Y., Moutia, Y., Saumtally, S. y Dookun, A. (2001) *Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane*. plant pathology 50:628-36
- Angel, J.C., Angel, F. Y Victoria, J.I. (2001a). *Razas del síndrome de la hoja amarilla en Colombia*. CENICAÑA, Carta Trimestral 23 (2): 9-11.

Angel, J.C., Angel, F. Y Victoria, J.I. (2001b). *Diagnóstico molecular de razas del virus del síndrome de la hoja amarilla caña de azúcar (ScYLV) en Colombia.*

Fitopatología Colombiana. 25(1): 19-22

Asocaña (2019). *Informe anual Asocaña, aspectos generales del sector agro industrial de la caña.* [https://www.asocana.org/documentos/2352019-D0CA1EED-](https://www.asocana.org/documentos/2352019-D0CA1EED-00FF00,000A000,878787,C3C3C3,0F0F0F,B4B4B4,FF00FF,2D2D2D,A3C4B5.pdf)

00FF00,000A000,878787,C3C3C3,0F0F0F,B4B4B4,FF00FF,2D2D2D,A3C4B5.pdf

Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C., Lecoq H. (2007). *Principles of plant virology Genome. Pathogenicity, Virus Ecology.* Science Publishers, Enfield, NH, USA. Vol. 57. p: 444.

Borg, Z., Moonan, F., Mirkov, T. E., Smith, G. (2001). *Characterising the genetic diversity of Sugarcane yellow leaf virus.* In: Proc, 24 International Society of Sugar Cane Technologists, 654-656

Cardozo C., Acosta Y. C., Cadavid M., Ángel J.C., Victoria J. I., y Ángel C.A. (2015). *Determinación de la infección por el virus de la hoja amarilla (SCYLV,*

Polerovirus) mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) en plantas adultas.

Congreso de Tecnicaña

Centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia-Cenicaña. 2019. *Informe anual 2019.* (24^a Ed.). Cali, Valle del Cauca, Colombia: Servicio de cooperación técnica y transferencia de tecnología.

Chinnaraja, C., Viswanathan, R., Karuppaiah, R., Bagyalakshmi, K., Malayhi, P., y Parameswari, B. (2012). *Complete genome characterization of Sugarcane*

- yellow leaf virus from India: Evidence for RNA recombination*. European Journal of Plant pathology, 135. 335-349
- Comstock, J.C., Irvine, J.E. y Miller, J.D. (1994). *Yellow leaf syndrome appears on the United States mainland*. Sugar Journal 56, 33-35
- Comstock, J.C., Irey B. E. L., Lockhart, B. E. L., Wang, Z. K. (1998). *Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques*. Sugar Cane 4: 21-24
- ElSayed, A. I., Weig, A. R. y Komo, E. (2010). *Molecular characterization of Hawaiian sugarcane yellow leaf virus genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries*. European Journal of Plant pathology. 129:399-412.
- Gao S. J., Lin, Y. H., Pan, Y. B., Damaj, M. B., Wang, Q. N., Mirkov, T. E. y Chen R. K. (2012). *Molecular characterization and phylogenetic analysis of sugarcane leaf virus isolates from China*. Virus Gene 45:340-349.
- Grisham, M. P., Pan, Y. B., White, W. H., Godshall, M. A., Legendre, B. L., y Comstock, J. C. (2002). *Potential effect of yellow leaf syndrome on the Louisiana sugarcane industry*. Journal American Society of Sugar Cane Technologists. Vol. 22. no. p. 125 - 126.
- Herschhorn A, Hizi A.(2010) *Retroviral reverse transcriptases*. Cell Mol Life Sc. 2010; 67: 2717-2747.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.(1992). *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology. 10: 413-417

Izaguirre-Mayoral, M. L., Carballo, O., Alceste, C., Romano, N. y Nass, H. A. (2002).

Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected sugarcacanes in Venezuela. Journal of Phytopathology. 150, 13-19.

Lin, Y. H., Gao S. J., Damaj, M. B., Fu, H. Y., Chen R. K. y Mirkov, T. E. (2014).

Genome characterization of sugarcane yellow leaf virus from China reveals a novel recombination genotype. Arch Virol 159: 1421-1429.

Lockhart, B. E. L., y Cronjé, C. P. R. (2000). *Yellow leaf syndrome. In: A guide to sugarcane diseases*, 3, CIRAD and ISSCT, 291-297.

Maia, I.G., Goncalves, M. C., Arruda, P., Vega, J. (2000). *Molecular evidence that sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) is a member of the luteoviridae.* Arch. Virol. 145:1009-1019.

Moonan, F., y Mirkov, T. E. (2002). *Analyses of genotypic diversity among North South and Central American isolates of Sugarcane yellow leaf virus: evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation.* Journal of Virology, 76,1339-1348.

Moonan, F. y Mirkov, T. E. (2000). *Analyses of genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of Sugarcane Yellow Leaf Virus: evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation.* Journal of Virology 76:1339-48.

Moonan, F., y Mirkov, T. E. (1999). *Development of methods for pathogen identification and conventional and nonconventional strategies for control of yellow leaf syndrome of sugarcane.* lab ICSB Project # 11 final Report. Texas A&M Agricultural Experiment Station, Weslaco, Texas. 13.

- Ricaud, C. (1968). *Yellow wilt of sugarcane in Easter Africa*. Sugarcane Pathologist Newsletter. 1: 45 – 49.
- Rodríguez, I. (2020, 9 octubre). Cultivo de caña de azúcar. Agrotendencia.tv.
<https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-la-cana-de-azucar/>
- Schenck, S. y Hu, J. S. (1991). *Update on the cause of sugarcane yellow leaf syndrome*. Hawaiian Sugar Technol. 26. Hawaiian Sugar Planters Association, Honolulu.
- Schenck, S., y Hu, J. S. y Lockhart, B. E. L. (1997). *Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii*. Sugarcane, 4, 5–8.
- Scagliusi, S. M., Lockhart, B. E. L. (2000). *Transmission, characterization and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane*. Phytopathology 90: 120-4
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Vol. 2, Núm. 2 pp 70-78 <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Vega, J., Scagliusi, S. M. M., y Ulian, E. C. (1997). *Sugarcane yellow leaf disease in Brazil. Evidence of association with a luteovirus*. Plant Disease 81: 21–26.
- Victoria, J.I; Avellaneda, M.C.; Angel, J. C. y Guzman, M.L. (2005) *Resistance to Sugarcane yellow leaf virus in Colombia*. Proc. ISSCT, Vol. 25: 664-670
- Victoria, J.I., Cuervo, L.E., Guzmán, M.L., Calderón, H. (2000). *Efecto del síndrome de la hoja amarilla sobre la producción de la caña de azúcar en el valle del río Cauca*. Memorias V Congreso de TECNICAÑA. Agosto 4-6. Cali, Colombia.

- Victoria, J. I., Guzmán, M. L., y Cuervo, E. (1999). *Síndrome de la hoja amarilla en Colombia*. Serie divulgativa # 7. Junio de 1999. Centro de Investigación de la caña de azúcar (CENICAÑA), 4.
- Victoria, J. I., Garcés, F., Guzmán, M. L., y Angel, F. (1998). *Síndrome de la hoja amarilla en Colombia ScYLV (Sugarcane Yellow Leaf Virus)*. Carta Trimestral (CENICAÑA) 20 (2 y 3): 3-7.
- Viveros C. y Calderón H. (1995). *Siembra*. En: CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali. p 131-139
- Wang, M. Q. y Zhou, G. H. (2010). *A near-complete genome sequence of a distinct isolate of Sugarcane yellow leaf virus from China, representing a sixth new genotype*. Virus Genes, 41, 268-272.