

Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones

María P. Filippone*, María F. Perera*, Mariela Salgado*, María G. García*, Gabriel R. Vellicce* y Atilio P. Castagnaro*

RESUMEN

Las enfermedades sistémicas representan uno de los principales factores que afectan la producción de caña de azúcar. El conocimiento del estado fitosanitario del cultivo y la identificación correcta de los fitopatógenos son claves para reducir las pérdidas por enfermedades. En este sentido, es fundamental contar con técnicas de diagnóstico sensibles, rápidas y fáciles de ejecutar, para realizar un diagnóstico preciso y precoz. A partir del año 2005, en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres se incorporó el diagnóstico molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa, para la detección específica de cuatro enfermedades sistémicas de la caña de azúcar: raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* sp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus*, ScMV) y síndrome de la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, ScYLV). En este trabajo, se presenta la optimización metodológica del diagnóstico molecular y se compara su eficiencia con la de la técnica inmunoquímica ELISA. El método molecular mostró mayor sensibilidad para las enfermedades evaluadas, tanto bacterianas como virales. El establecimiento del diagnóstico molecular constituye un avance tecnológico de gran importancia para la industria azucarera regional, ya que no solo ayudará a disminuir la incidencia de dichas enfermedades, sino que también evitará el ingreso de otras nuevas al introducir germoplasma de caña de azúcar desde otras regiones.

Palabras clave: PCR, sanidad vegetal, detección de fitopatógenos, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Molecular diagnosis of systemic sugarcane diseases in Argentina: methodology adjustment and applications

Systemic diseases represent one of the main factors affecting sugarcane production. The knowledge of crop sanitary conditions and the correct identification of phytopathogens are key factors to reduce losses caused by them. To diagnose diseases as early as possible is crucial, so techniques that are sensitive, fast, accurate and easy to use are essential. Since 2005, molecular diagnosis based on polymerase chain reaction has been applied at Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, for detecting four systemic sugarcane diseases: ratoon stunting (*Leifsonia xyli* sp. *xyli*), leaf scald (*Xanthomonas albilineans*), *Sugarcane mosaic virus* (ScMV) and yellow leaf syndrome (*Sugar cane yellow leaf virus*, ScYLV). This paper presents the methodological optimization of molecular diagnosis and compares its efficiency with that of ELISA immunochemistry technique. The molecular approach showed greater sensitivity for the detection of both the bacterial and viral diseases evaluated. The implementation of molecular analysis constitutes a technological advance for regional sugar industry, which will not only help to reduce disease incidence, but also avoid the entrance of new pathogens whenever sugarcane germplasm is introduced from other regions.

Key words: PCR, plant health, pathogen detections, *Saccharum* spp.

* Sección Biotecnología, EEAOC- Unidad Asociada al Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO; UNT-CONICET). paulafilippone@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN

Los problemas fitosanitarios constituyen un factor crítico en la producción de caña de azúcar. Sus características de cultivo semipermanente y de multiplicación vegetativa favorecen el aumento de la carga patogénica y la dispersión de las enfermedades, que llevan a un rápido deterioro de la cepa.

En la provincia de Tucumán se registraron 22 enfermedades que afectan al cultivo (Ramallo *et al.*, 2000), siendo las de mayor incidencia las enfermedades sistémicas de origen bacteriano, tales como la escaldadura de la hoja, causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, y el raquitismo de la caña soca, ocasionada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Entre las enfermedades virales, las que más afectan al cultivo son el mosaico de la caña de azúcar (ScMV, siglas del inglés *Sugarcane mosaic virus*) y el síndrome de la hoja amarilla, producido por el virus de la hoja amarilla o ScYLV (siglas del inglés *Sugarcane yellow leaf virus*). Esta última enfermedad tiene gran importancia a nivel mundial y, aunque en Tucumán aún no se confirmó la presencia del virus se han detectado plantas con síntomas típicos (Ramallo y Plopler, 1998) y se ha constatado la presencia del insecto vector, el áfido *Melanaphis sacchari* (Delfino, 1984), lo cual constituye una amenaza potencial. Todas estas enfermedades son sistémicas; vale decir que se diseminan en la planta a través de los vasos conductores y se transmiten mediante la caña semilla.

El panorama sanitario del cultivo de la caña de azúcar se ve agravado por su limitada diversidad genética, ya que esto aumenta el riesgo ante la aparición de nuevas plagas y enfermedades (Cuenya *et al.*, 2005). Para prevenir o reducir la incidencia de las enfermedades, es fundamental conocer la situación fitopatológica del cultivo, tanto en el ámbito nacional como internacional. Con el fin de preservar o mejorar la sanidad del cultivo se deben tomar medidas, tales como evitar el ingreso de nuevas enfermedades al país mediante el establecimiento de cuarentenas, el uso de variedades resistentes y el control estricto de la calidad de la caña semilla utilizada. Se entiende por caña semilla el fragmento de tallo de caña que se emplea en la propagación vegetativa o asexual del cultivo.

La selección de variedades tolerantes y resistentes y el uso de caña semilla saneada (libre de plagas y enfermedades sistémicas) constituyen actualmente las mejores prácticas de manejo, debido a que aún el control químico de enfermedades no resulta rentable en este cultivo. Entre los métodos de saneamiento más utilizados, se pueden mencionar los tratamientos con agua caliente (hidrotermoterapia), micropropagación (cultivo de meristemas) y electroterapia, entre otros (Digonzelli *et al.*, 2006; Hoy y Flynn, 2001).

Sin embargo, el éxito de cualquier programa de

manejo y control de enfermedades depende de un correcto sistema de detección e identificación de patógenos a través de técnicas de diagnóstico sensibles, rápidas y altamente específicas. En ese sentido, se han ensayado diferentes técnicas para identificar, con menor o mayor precisión, la presencia de patógenos en plantas, desde los procedimientos más simples, como la observación directa de síntomas, hasta los de mayor complejidad, como las técnicas inmunoquímicas y, más recientemente, las moleculares. Las técnicas de diagnóstico molecular se basan en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos (ARN o ADN), mediante hibridación molecular con secuencias complementarias unidas a distintos marcadores, o la amplificación *in vitro* de un segmento determinado del genoma del patógeno, mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés "polymerase chain reaction") (Cadavid *et al.*, 2003; Chatenet *et al.*, 2001; Graces *et al.*, 2005). Esta metodología es una de las herramientas más poderosas utilizadas en el diagnóstico de enfermedades, ya que a su simplicidad y reproducibilidad se suma su rapidez y alta sensibilidad, lo que permite detectar cargas patogénicas que no pueden ser detectadas por técnicas anteriores.

En este trabajo se presenta la optimización de procedimientos basados en PCR para el diagnóstico de las enfermedades sistémicas de mayor incidencia en la producción de caña de azúcar: escaldadura de la hoja, raquitismo de la caña soca, mosaico de la caña de azúcar y síndrome de la hoja amarilla. Asimismo, se intenta incorporar a la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), una técnica que permita detectar de forma rápida y eficiente la presencia de bajos niveles de carga patogénica en caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para el ajuste de los protocolos de diagnóstico de mosaico, escaldadura y raquitismo, se utilizaron muestras de láminas de hojas de plantas con los síntomas típicos de las enfermedades, confirmadas por inmunodetección en el Laboratorio de la Sección Fitopatología de la EEAOC. En el caso del síndrome de la hoja amarilla, debido a que la presencia de este virus no fue confirmada en Tucumán, como control positivo se utilizó ADNc de una región del gen de la proteína de la cápside clonado en el plásmido pFM350, cedido por el Dr. E. Mirkov del Department of Plant Pathology and Microbiology, de Texas A&M University Agricultural Experiment Station (Weslaco, Texas, EE. UU.).

Para la evaluación sanitaria con los protocolos ajustados, se colectaron las muestras detalladas a continuación: láminas de hojas de 103 plantines micropropagados, pertenecientes al ciclo de producción del año 2005 del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC; 57 muestras correspondientes a

cinco genotipos en cuarentena fitosanitaria, introducidos en el año 2004 desde Luisiana (EE. UU.), en el marco del Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (PMGCA) de la EEAOC y 129 muestras correspondientes a 34 genotipos introducidos en el año 2005. Las muestras se molieron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su utilización. La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de 200 mg de polvo de hoja, siguiendo el protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999). La calidad de los ácidos nucleicos se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%, que se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta (UV).

Detección molecular de patógenos mediante PCR

El estudio consistió en la utilización de la técnica de PCR para amplificar una región específica del genoma de los patógenos. En el caso de las enfermedades virales, se utilizó la técnica de transcripción reversa seguida de PCR, la cual primero sintetiza ADN a partir del ARN viral. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa, considerándose positivo (presencia del patógeno), al observarse las bandas o fragmentos de ADN producidos por ampliificaciones con cebadores específicos para cada patógeno.

Diagnóstico de las enfermedades virales

En el caso del mosaico de la caña de azúcar (ScMV), se emplearon los cebadores SCMV-F3 (5'-TTTCTCAC-CAAGCTGGAA) y SCMV-R3 (5'-AGCTGTGTGTCTCTGTATTCTC), publicados por Yang y Mirkov (1997). Estos amplifican una banda de aproximadamente 900 pares de base, correspondiente a una región que codifica para la proteína de la cápside del virus. El protocolo cuenta con tres etapas: i) desnaturalización: la mezcla de reacción, compuesta por 10 μM del cebador SCMV-R3 (Sigma), 0,75 μl de H_2O y 2,5 μl de muestra de ARN, se calentó a 70°C durante cinco minutos; ii) retrotranscripción (RT): durante esta etapa, se sintetizó una hebra de ADN (ADNc o ADN complementario) a partir del ARN del virus y se llevó a cabo, incubando a 42°C durante 1 h la mezcla de reacción, previamente desnaturalizada y a la que se le agregaron 1,5 μl de tampón RT 5 X (Promega), 100 U de la enzima M-MLV- transcriptasa reversa (Promega); 1.000 μM de dNTPs (Sigma) y 10 U de inhibidor de RNasa (Promega) y iii) amplificación del ADN: 1,25 μl de tampón Taq 10x (Promega), 1,6 mM de MgCl_2 (Promega), 1.000 μM de dNTPs (Sigma), 2,4 μM del cebador SCMV-F₃ (Sigma) y 3 U de Taq polimerasa (Promega) (volumen final: 12,5 μl), se agregaron a la mezcla RT, sometiéndose al siguiente programa de amplificación en un termociclador (MJ Research): dos ciclos a 94°C (cinco minutos), 37°C (tres minutos) y 72°C (tres minutos); un ciclo a 94°C (cinco minutos); 35 ciclos a 94°C (un minuto), 52°C (un minuto), 72°C (dos minutos) y una extensión final a 72°C (siete minutos).

Como control positivo se utilizó ARN extraído de material enfermo, provisto por la Sección Fitopatología y el PMGCA de la EEAOC.

En el proceso de optimización se realizaron modificaciones al protocolo original descrito anteriormente, tales como ajustes en el programa de amplificación, temperatura de hibridación de los cebadores y concentración de nucleótidos (dNTPs).

Para el diagnóstico del virus del síndrome de la hoja amarilla se siguió el protocolo de Pan (1997), que utiliza el par de cebadores YLS 111f/ YLS 462r (secuencia sin publicar, cebadores gentilmente cedidos por Dr. Irey, US Sugar Corporation, Florida, EE. UU.), los cuales amplifican un fragmento de 352 pb de la región que codifica la proteína de la cápside. En este protocolo, la muestra de ARN se somete a desnaturalización con 10 μM del cebador YLS 462r (Sigma) y 1,25 μl de H_2O a 100°C por cinco minutos. Luego, se adicionan 3,0 μl de la mezcla RT, compuesta por 1,5 μl de tampón RT 5x (Promega), 100 μM de dNTP (Sigma), 10 U de inhibidor de RNasa (Promega) y 100 U de la enzima M-MLV-transcriptasa reversa (Promega). La transcripción reversa se llevó a cabo a 42°C durante quince minutos, y se realizó una posterior desnaturalización a 99°C durante cinco minutos, con el fin de inactivar la enzima. El ADNc fue amplificado en el mismo tubo de reacción, luego de la adición de 1,25 μl de tampón Taq 10 X (Promega), 1,6 mM de MgCl_2 (Promega), 100 μM de dNTPs (Sigma), 2,4 μM del cebador YLS 111f (Sigma), 3 U de Taq polimerasa (Promega) y H_2O , hasta completar un volumen final de 25 μl . El programa de amplificación consistió de: un ciclo inicial a 95°C (cinco minutos), 54°C (un minuto), 72°C (diez minutos); un ciclo a 94°C (un minuto); 40 ciclos a 94°C (1 s), 54°C (1 s), 72°C (30 s) y extensión final a 72°C (cinco minutos).

En el proceso de optimización del diagnóstico, se modificaron las unidades de la enzima Taq polimerasa y la concentración de MgCl_2 , de 3 U y 1,6 mM a 4 U y 2 mM, respectivamente. Se ensayaron diferentes concentraciones de dNTPs (37,5 μM ; 62,5 μM ; 125 μM ; 250 μM y 500 μM) y distintas concentraciones del ADN molde (1 ng/ μl , 10 ng/ μl y 20 ng/ μl).

Diagnóstico de las enfermedades bacterianas

Se ensayaron dos variantes de la técnica de PCR: una basada en una reacción simple propuesta por Pan *et al.* (1997, 1998 y 1999), que consistió en una única reacción de PCR utilizando cebadores específicos para cada bacteria, y otra propuesta por Davis *et al.* (1998), que consistió en una doble PCR o PCR anidada, técnica en la que se realizan dos ampliificaciones sucesivas con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores de la segunda PCR flanquean una región genómica amplificada en la primera PCR, aumentando así la sensibilidad con respecto a la PCR simple.

PCR anidada: ajuste simultáneo del diagnóstico de las enfermedades bacterianas

Según describe el protocolo original, en la primera PCR se utilizaron 1,5 U de Taq polimerasa (Promega), 2,5 μ l del tampón Taq 10 x (Promega), 2 mM de $MgCl_2$ (Promega), 480 μ M de dNTPs (Sigma), 1,2 μ M de cada cebador (Sigma), 2 μ l de muestra ADN y agua bidestilada estéril, hasta completar un volumen final de 25 μ l. Para la segunda PCR se utilizó, como molde, una dilución 1/40 del producto de la primera PCR. En ambas PCR se siguió el mismo programa de amplificación: un ciclo de desnaturalización a 94°C (cuatro minutos), seguido por 31 ciclos a 94°C (30 s), 55°C (30 s), 65°C (un minuto) y una etapa final de polimerización a 65°C (tres minutos).

Los cebadores para el diagnóstico de raquitismo se diseñaron en base a la secuencia del espaciador transcrito intergénico, región entre los genes 16S-23S del ADN ribosomal de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*. En la primera reacción, se utilizaron los cebadores RSD33(F) (5'-CTGGCACCTGTGTTGTTTTC) y RSD297(R) (5'-TTCGGTTCTCATCTCAGCGTC), que amplificaron un fragmento de 265 pb, mientras que en la segunda PCR, se utilizaron los cebadores RST60(F) (5'-TCAACGCAGAGATGTCCAG) y RST59(R) (5'-CGTCTTGAAGACACAGC-GATGAG), los cuales amplificaron un fragmento de 229 pb.

Para el diagnóstico de escaldadura de la hoja, los cebadores se diseñaron a partir del complejo de genes de albicidina (Rott *et al.*, 1995), antibiótico codificado en el cromosoma de la bacteria *Xanthomonas albilineans*. Los cebadores utilizados en la primera PCR fueron XaAlb2-f3 (5'-CACACACACAATACAGCATTGCGG) y XaAlb2-r3 (5'-CCCACTTACTTGAGGCTATGG), los cuales amplificaron una banda de 440 pb. Para la segunda PCR, se utilizaron los cebadores XaAlb2-f4 (5'-CTTCTGCAGCTTGC TCGTC) y XaAlb2-r4 (5'-GCTCAGTTACGCTCAGCTAATC), que producen una banda de 308 pb (Davis *et al.*, 1998).

Para la optimización de esta técnica, se realizaron cambios tanto en la concentración de los reactivos como en el programa de amplificación. Así por ejemplo, se cambió la temperatura de polimerización a 72°C; se ensayaron distintas temperaturas de hibridación de los cebadores: de 55°C (como describe el protocolo original) a 60°C, 62°C, 64°C y 66°C por 30 s; 64°C por 10 s y 65°C por 15 s y 20 s. En cuanto a los reactivos, se variaron las concentraciones de $MgCl_2$ (1,6 mM; 1,8 mM y 2 mM); dNTPs (75 μ M, 100 μ M, 150 μ M y 250 μ M); de los cebadores (0,3 μ M; 0,4 μ M y 0,6 μ M de cada uno) y ADN molde (6,25 ng; 12,5 ng; 25 ng y 50 ng). En el ajuste de la segunda PCR, se probaron distintas diluciones del producto de la primera PCR (1:4, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:80, 1:200, 1:10.000); distintas concentraciones de los cebadores (0,2 μ M; 0,3 μ M; 0,4 μ M y 0,6 μ M) y la temperatura y tiempos de hibridación de los cebadores (58°C, 60°C, 64°C, 65°C y 66°C por 30 s y 60°C, 64°C, 65°C y 66°C por 10 s). Se cambiaron regularmente todos los reactivos por soluciones nuevas y estériles, y se trabajó en asepsia, con el fin de descartar contaminaciones.

PCR convencional

Para el diagnóstico del raquitismo de la caña soca, se siguió el protocolo de Pan *et al.* (1998), utilizando los cebadores Cxx₁ (5'-CCGAAGTGAGCAGATTGACC) y Cxx₂ (5'-ACCCTGTGTTGTTTCAACG), los cuales amplifican un fragmento de 438 pb. Cada reacción consistió de 1,5 U de Taq polimerasa (Promega), 2,5 μ l de tampón Taq 10 x (Promega), 2 mM de $MgCl_2$ (Promega), 200 μ M de dNTPs (Sigma), 0,4 μ M de cada cebador (Sigma), 2 μ l de ADN muestra y agua bidestilada estéril, hasta completar un volumen final de 25 μ l. El programa de PCR utilizado fue: 95°C (cinco minutos), 40 ciclos a 95°C (1 s), 57°C (1 s), 72°C (30 s) y 72°C (cinco minutos).

En el caso de la escaldadura de la hoja, se utilizó el protocolo de Pan *et al.* (1997) y los cebadores PGBL1 (5'-CTTTGGGTCTGTAGCTCAGG) y PGBL2 (5'-GCCTCAAGGTCATATTCAGC) (Pan *et al.*, 1999), los cuales amplifican un fragmento de 288 pb correspondiente al (del inglés "internal transcribed spacer") de la bacteria *Xanthomonas albilineans*. La mezcla de reacción fue la misma que para el diagnóstico de raquitismo mediante PCR convencional. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 95°C (cinco minutos), 30 ciclos a 95°C (1 s), 57°C (1 s), 72°C (30 s) y 72°C (cinco minutos).

En ambos casos, los parámetros evaluados fueron: cantidad de ADN (6,25 ng; 12,5 ng; 25 ng y 50 ng); concentración de los dNTPs (100 μ M, 150 μ M y 250 μ M); concentración de los cebadores (0,3 μ M y 0,5 μ M) y diferentes combinaciones de tiempo y temperatura de anillamiento de los cebadores, entre 1 s y 10 s y entre 50°C y 57°C, respectivamente.

Como controles negativos en todas las reacciones de PCR, se utilizó ADN de plantas sanas y mezcla de reactivos sin ADN. Las determinaciones de cada enfermedad se realizaron por duplicado en todas las muestras.

RESULTADOS

Diagnóstico de las enfermedades virales Mosaico de la caña de azúcar

Se ajustó el diagnóstico del ScMV por RT-PCR (del inglés "reverse trancription-polymerase chain reaction"), mediante la optimización del protocolo descrito por Yang y Mirkov (1997). Parte de los resultados se presentan en la Figura 1. En el proceso de optimización, se realizaron ajustes en el programa de amplificación, temperatura de hibridación de los cebadores y concentración de nucleótidos (dNTPs), introduciéndose las siguientes modificaciones al protocolo original: se eliminaron los dos ciclos iniciales del programa de amplificación, la temperatura de hibridación de los cebadores se elevó de 52°C a 60°C y la concentración de los dNTPs se disminuyó de 1000 μ M a 100 μ M. Estas modificaciones permitieron mejorar la calidad de las bandas específicas, eliminar bandas espurias y reducir el tiempo necesario para la determinación. De acuerdo a esto, el protocolo final optimizado para la detección del virus causante del mosaico de la caña de azúcar, es el que se describe en la Tabla 1.

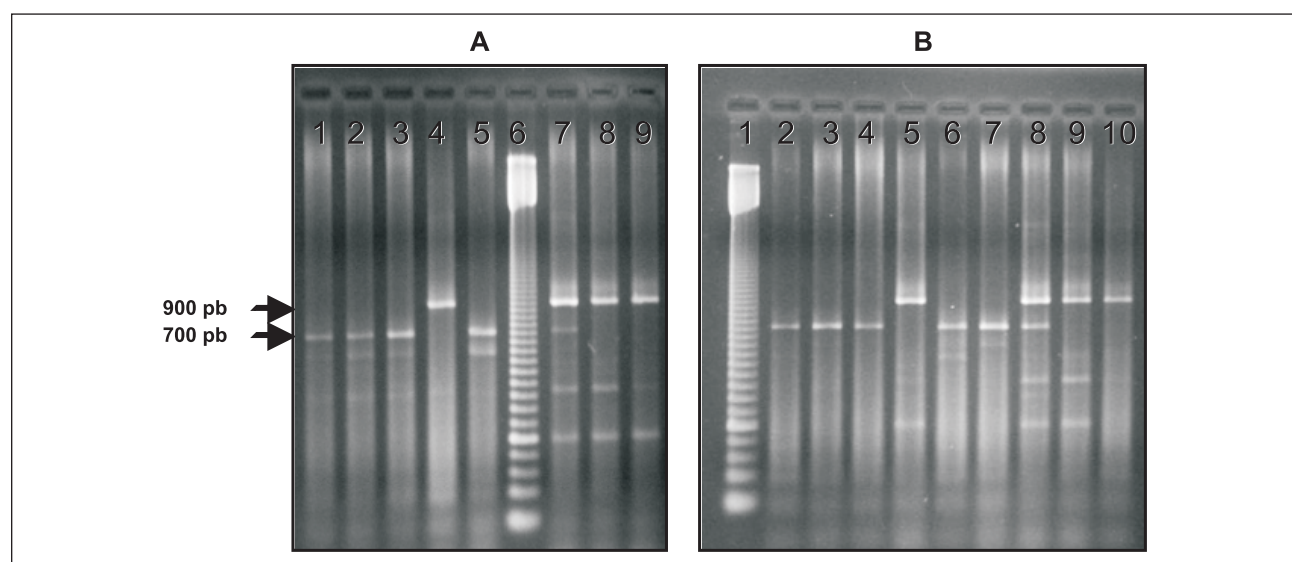


Figura 1. Electroforesis de los productos de amplificación por RT-PCR en el ajuste de la técnica para el diagnóstico de mosaico. A: PCR con los ciclos iniciales a 37°C. Calles 1, 2, 3 y 5: controles negativos; calle 6: marcador; calles 4, 7, 8 y 9: controles positivos. B: PCR sin los ciclos iniciales a 37°C. Calle 1: marcador de peso molecular; calles 2, 3, 4, 6 y 7: controles negativos; calles 5, 8, 9 y 10: controles positivos. La banda de 900 pb corresponde a un resultado positivo, mientras que la de 700 pb, a una amplificación inespecífica.

Tabla 1. Protocolos de PCR para la detección de los virus ScMV y ScYLS, optimizados en el Laboratorio de Biotecnología de la EEAOC.

Etapa	Diagnóstico de ScMV			Diagnóstico de ScYLS		
	Reactivos		Programa	Reactivos		Programa
Desnaturalización	Muestra	2,5 µl		Muestra	2,5 µl	
	Cebador SCMV-R3	10 µM	70°C (5 min)	Cebador YLS462	10 µM	100°C (5 min)
	Vol. final	3,75 µl		Vol. final	4,5 µl	
Retrotranscripción	Tampón RT 5 X	1 X		Tampón RT 5 X	1 X	
	M-MLV-Reverse Transcriptase	100 U		M-MLV-Reverse Transcriptase	100 U	
	dNTPs	100 µM	42°C (1 h)	dNTPs	37,5 µM	42°C (15 min)
	Inhibidor de RNAsa	10 U		Inhibidor de RNAsa	10 U	
	Mezcla desnaturalización	3,75 µl		Mezcla desnaturalización	4,5 µl	
	Vol. final	7,5 µl		Vol. final	7 µl	
Amplificación	Tampón Taq 10 X	1 X		Tampón Taq 10 X	1 X	1 ciclo inicial a 95°C (5min),
	MgCl ₂	1,6 mM	1 ciclo a 94°C (5 min),	MgCl ₂	2 mM	54°C (1 min),
	dNTPs	100 µM	35 ciclos a 94°C (1 min),	dNTPs	37,5 µM	72°C (10 min),
	Cebador SCMV-F3	2,4 µM	54°C (1 min),	Cebador YLS111	2,4 µM	1 ciclo a 94°C (1 min),
	Taq polimerasa	3 U	54°C (1 min),	Taq polimerasa	4 U	40 ciclos a 94°C (1 s),
	Mezcla RT	7,5 µl	72°C (2 min), y una extensión final a 72°C (7 min)	Mezcla RT	7 µl	54°C (1 s),
	Vol. final	20 µl		Vol. final	25 µl	72°C (30 s) y extensión final a 72°C (5 min)

Síndrome de la hoja amarilla

Se optimizó el protocolo descrito por Pan *et al.* (1997), con los cebadores YLS 111f y 462r, los cuales amplifican un fragmento de 352 pb (Figura 2). Los parámetros ajustados fueron las concentraciones de la enzima polimerasa, $MgCl_2$, dNTPs y ADN molde. Se realizaron distintas combinaciones de los reactivos y se seleccionó aquella con la que se obtuvo una banda específica del tamaño esperado: concentración de ADN molde de 1 ng/ μ l, 37,5 μ M de dNTPs, 4 U de Taq poli-

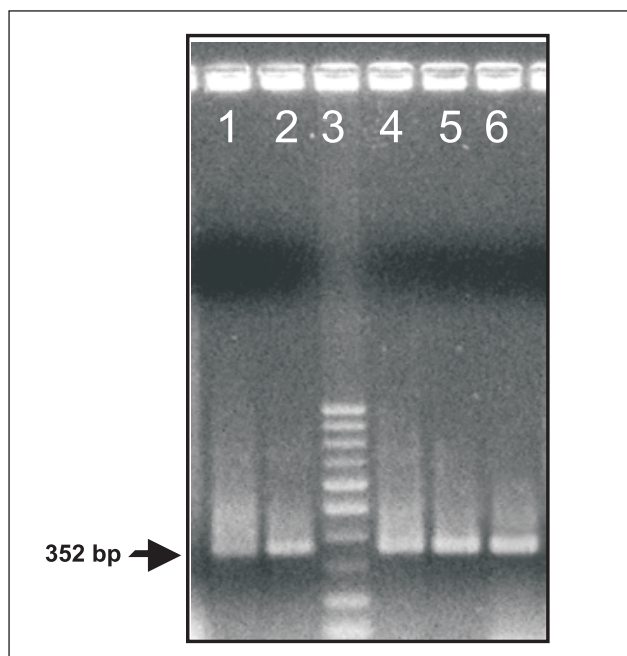


Figura 2. Productos de la reacción de RT-PCR en el ajuste de la técnica para el diagnóstico del síndrome de la hoja amarilla. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de nucleótidos: 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M y 37,5 μ M de dNTPs en las calles 1, 2, 4, 5 y 6, respectivamente. Calle 3: marcador de peso molecular. La reacción se realizó con 1 ng/ μ l de ADN del control positivo.

merasa y 2 mM de $MgCl_2$. En base a estos resultados, el protocolo final para el diagnóstico del virus ScYLS quedó establecido según se detalla en la Tabla 1.

Diagnóstico de las enfermedades bacterianas

PCR anidada: ajuste de la detección simultánea de las enfermedades de la escaldadura de la hoja y del raquitismo de la caña soca

Siguiendo la técnica de PCR anidada descrita por Davis *et al.* (1998) para el diagnóstico simultáneo de raquitismo y escaldadura, no se pudieron obtener resultados satisfactorios para reproducir los resultados reportados. El ajuste de la primera PCR no presentó mayores inconvenientes, obteniéndose las bandas del tamaño esperado con las siguientes condiciones: 12 ng a 25 ng de ADN molde; temperatura y tiempo de hibridación de los cebadores: 62°C (30 s); 1,6 mM de $MgCl_2$; 0,4 μ M de cada cebador y 150 μ M de dNTPs. Sin embargo, en la segunda PCR, no se pudieron obtener resultados reproducibles, aun cuando se ensayaron numerosas variantes, que incluyeron cambios en la concentración de los reactivos ($MgCl_2$, dNTPs o Taq, por ejemplo), como así también en los parámetros de tiempo y temperatura del programa de amplificación. Uno de los mayores inconvenientes de esta técnica fue la producción de falsos positivos, incluso con ADN de especies vegetales filogenéticamente distantes de la caña de azúcar, como la papa y frutilla (Figuras 3 y 4). En base a estas observaciones, se decidió descartar esta técnica como método de diagnóstico para las enfermedades bacterianas.

Ajuste del diagnóstico mediante PCR simple o convencional

La técnica descrita por Pan *et al.* (1998) para la detección del raquitismo de la caña soca fue optimizada sin mayores dificultades. Los mejores resultados, determinados por la banda más nítida en el control positivo (438 pb), se obtuvieron al combinar los siguientes parámetros: 6,25 ng del ADN

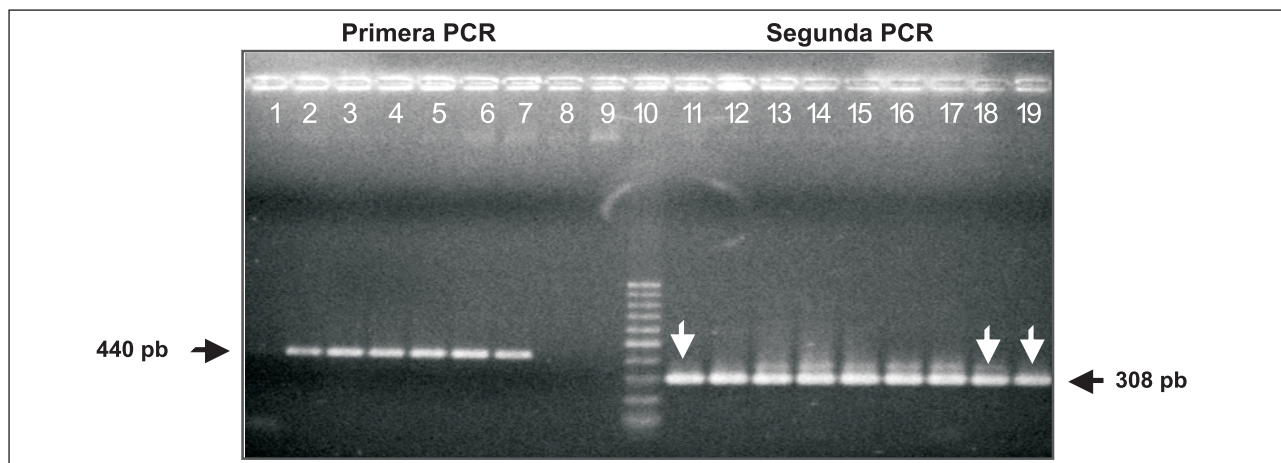


Figura 3. Productos de la amplificación mediante PCR anidada en el ajuste del diagnóstico de escaldadura. Primera PCR, calles 1, 8 y 9: controles negativos; calles 2-7: controles positivos; calle 10: marcador de peso molecular. Segunda PCR, calles 11, 18 y 19: controles negativos; calles 12-17: controles positivos. La flecha blanca indica los falsos positivos.

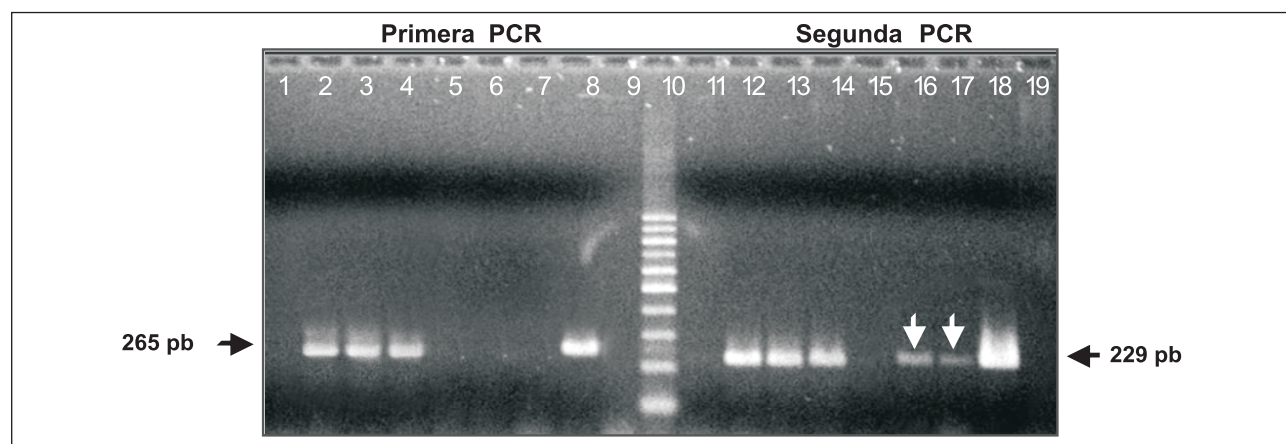


Figura 4. Productos de la amplificación mediante PCR anidada en el ajuste del diagnóstico de raquitismo. Primera PCR, calles 1, 5, 6, 7 y 9: controles negativos; calles 2, 3, 4 y 8: controles positivos; calle 10: marcador de peso molecular. Segunda PCR, calles 11, 15, 16, 17 y 19: controles negativos; calles 12, 13, 14 y 18: controles positivos. La flecha blanca indica los falsos positivos.

molde, 150 μ M de nucleótidos, 0,4 μ M de cada uno de los cebadores, 57 °C de temperatura de hibridación y un tiempo de hibridación de los cebadores en aumento, de 1 s a 10 s. Por lo tanto, el protocolo utilizado para el diagnóstico de raquitismo quedó establecido según se detalla en la Tabla 2.

En el caso de la escaldadura de la hoja, no se logró obtener el producto de amplificación esperado (una banda de 288 pb) con el protocolo original de la técnica de PCR convencional, aunque las modificaciones realizadas permitieron la optimización sin demasiadas dificultades. Tales modificaciones consistieron en lo siguiente: cambios en la cantidad de ADN molde (6,25 ng y 50 ng); la temperatura y tiempo de hibridación de los cebadores, que inicialmente era 55°C/1 s, se ensayaron a 54°C/1 s y 57°C/1 s y 52°C/3 s, mientras que la concentración de dNTPs se redujo de 200 μ M a 150 μ M y 75 μ M. La amplificación de la banda esperada y de mayor nitidez se obtuvo al utilizar 6,25 ng de ADN y 0,4 μ M de cada cebador. Al igual que para raquitismo, se aumentó el tiempo de

hibridación de 1 s a 10 s. También se incrementó de 30 a 40 el número de ciclos totales. En cuanto a la concentración de los nucleótidos, no hubo diferencias de intensidad en las bandas utilizando 150 μ M y 200 μ M, mientras que estas desaparecían con una concentración de 75 μ M, por lo que esta se fijó en 150 μ M, con el fin de utilizar la mínima cantidad de reactivo. El volumen final de cada reacción se estableció en 20 μ l.

El protocolo final utilizado en la evaluación fitosanitaria se detalla en la Tabla 2.

Determinación cuantitativa de la sensibilidad de la técnica de PCR convencional

Para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR en nuestras condiciones experimentales, se evaluó la mínima concentración de ADN de la bacteria causante de escaldadura de la hoja con la que se observa amplificación del fragmento esperado. Para ello, se utilizaron diluciones del ADN molde, realizadas a partir de una solución de 2 μ g/ μ l de ácidos

Tabla 2. Protocolo de PCR simple para la detección individual de las bacterias responsables de raquitismo y escaldadura de la caña de azúcar, optimizado en el Laboratorio de Biotecnología de la EEAOC.

Diagnóstico de raquitismo o escaldadura		
Reactivos	Programa	
Muestra	2 μ l	
Tampón Taq 10 X	1 x	
MgCl ₂	2 mM	
dNTPs	150 μ M	1 ciclo a 95°C (5 min), 40 ciclos a 95°C (1 s), 57°C (10 s), 72°C (30 s) y una extensión final a 72°C (5 min)
Cebador sentido	0,4 μ M	
Cebador antisentido	0,4 μ M	
Taq polimerasa	1,5 U	
Vol. final	20 μ l	

nucleicos. La banda esperada de 288 pb se observó hasta una concentración de 3 pg de ADN (Figura 5).

Evaluación fitosanitaria

Con los protocolos de diagnóstico optimizados, se evaluaron las 57 muestras de genotipos en cuarentena perteneciente al PMGCA de la EEAOC, introducidos en el año 2004, 129 genotipos introducidos en el año 2005 y 103 plantines pertenecientes al Proyecto Vitroplantas de la EEAOC. El diagnóstico para la enfermedad del mosaico determinó la presencia de la banda de 900 pb en dos muestras del material micropropagado de los genotipos 75-33 y 65-357 (Figura 6). En el caso de la enfermedad del síndrome de la hoja amarilla, no se observó la banda asociada a la presencia de la patología en ninguna de las muestras analizadas.

En el diagnóstico individual de las enfermedades bacterianas, la banda del tamaño esperado para raquitismo (*L. xyl* subsp *xyl*) se observó en 11 muestras de los genotipos micropropagados y en 25 muestras de la cuarentena del año 2004 (Figura 7). En el caso del diagnóstico de escaldadura (*X. albilineans*), 23 muestras de los genotipos micropropagados, dos muestras de la cuarentena 2004 y 74 muestras de la cuarente-

na 2005 resultaron positivas (Figura 8). Los resultados se expresan en la Tabla 3, como porcentajes de incidencia de las enfermedades, calculados como el número de muestras positivas sobre el total de muestras analizadas, multiplicado por 100.

Análisis comparativo de la eficiencia de detección entre el diagnóstico molecular y el diagnóstico por inmunodetección (ELISA)

Se realizó el análisis comparativo de la eficiencia de detección de la técnica molecular y la técnica inmunológica de ELISA (del inglés "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), utilizada en la EEAOC, para el diagnóstico de enfermedades sistémicas en vitroplantas de caña de azúcar hasta el año 2005. Para ello se trabajó con las 103 muestras pertenecientes al Proyecto Vitroplantas 2005, y se evaluó la presencia de mosaico, raquitismo y escaldadura. En el diagnóstico de mosaico, se detectaron 11 y 9 muestras positivas con PCR y ELISA, respectivamente. En el caso de la bacteria causante de la escaldadura, se detectaron tres muestras positivas mediante ELISA y 26 con PCR, mientras que para raquitismo no se observaron diferencias entre ambas técnicas (Tabla 4).

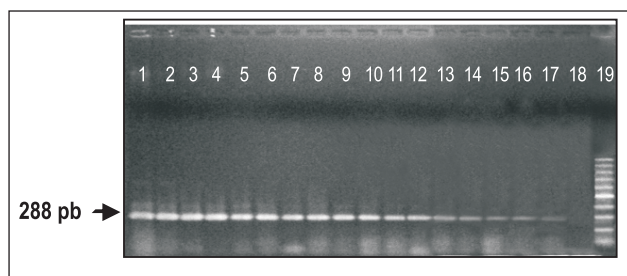


Figura 5. Determinación cuantitativa de la sensibilidad de la reacción de PCR. Productos de la amplificación por PCR, con diferentes concentraciones de ADN molde correspondiente a *X. albilineans*. Calles 1 a 18 corresponden a diluciones sucesivas desde 100 ng a 1,5 pg de ADN, respectivamente; 19: marcador de peso molecular. La última calle (17) en la que se observa amplificación, corresponde a la dilución de 3 pg de ADN en la reacción.

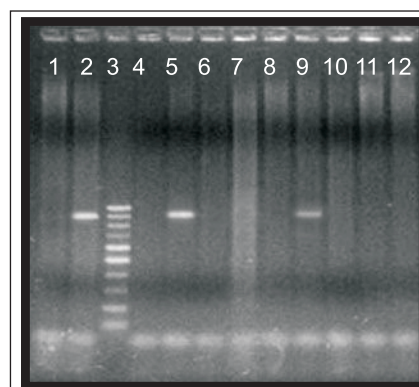


Figura 6. Productos de la amplificación por RT-PCR en el diagnóstico de mosaico en muestras de plantines micropropagados. Calle 1: control negativo; 2: control positivo; 3: marcador de peso molecular; 4-12: muestras procesadas.

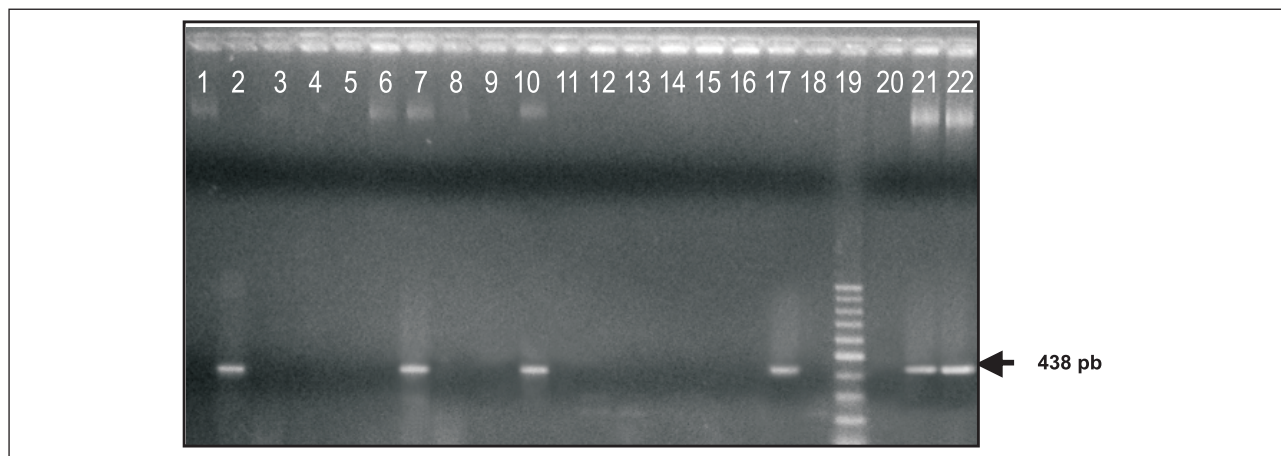


Figura 7. Productos de la amplificación por PCR en el diagnóstico de raquitismo de la caña soca, en muestras de plantas ubicadas en cuarentena durante el año 2004. Calles 1-18: muestras analizadas; 19: marcador de peso molecular; 20: control negativo; 21 y 22: controles positivos.

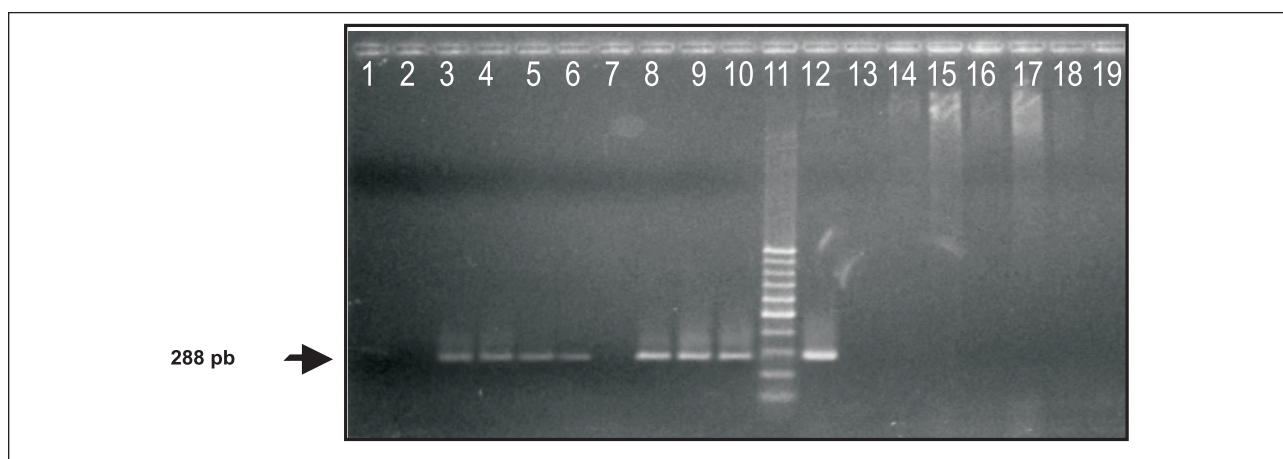


Figura 8. Productos de la amplificación por PCR en el diagnóstico de escaldadura de la hoja, en muestras de plantines micropropagados. Calles 1-10 y 14-24: muestras analizadas; 11: marcador de peso molecular; 12: control positivo y 13: control negativo.

Tabla 3. Porcentajes de incidencia de enfermedades sistémicas en genotipos pertenecientes al Proyecto Vitroplantas y en cuarentena fitosanitaria. La incidencia (%) se determinó a partir de la relación entre el número de muestras positivas detectadas sobre el número total de muestras evaluadas, multiplicado por 100.

	Muestras evaluadas	Incidencia (%)			
		Escaldadura	Raquitismo	Mosaico	YLS
Vitroplantas 2005	103	23,7	11,3	2,06	0
Cuarentena 2004	57	3,5	43,9	0	0
Cuarentena 2005	129	57,4	0	0	0

Tabla 4. Comparación de la eficiencia de PCR y ELISA en el diagnóstico de enfermedades sistémicas en plantines de vitroplantas de caña de azúcar, producidas en el año 2005.

Enfermedad evaluada	ELISA		PCR	
	Nº de muestras positivas	% de detección	Nº de muestras positivas	% de detección
Escaldadura	3	2,9	26	25,2
Raquitismo	11	10,6	11	10,6
Mosaico	9	8,7	11	10,6

DISCUSIÓN

La optimización del diagnóstico de las enfermedades virales se realizó en nuestro laboratorio sin mayores inconvenientes. La detección del virus del mosaico de la caña se realizó por RT-PCR, siguiendo el protocolo descrito por Yang y Mirkov (1997), mientras que para el diagnóstico de la enfermedad del síndrome de la hoja amarilla, se ajustó la técnica de RT-PCR descrita por Pan *et al.* (1998).

La optimización del diagnóstico de las enfermedades bacterianas presentó algunos inconvenientes cuando se usó la técnica de PCR anidada, descrita por Davis *et al.* (1998). Se observó la amplificación de falsos positivos en la segunda PCR, fenómeno que podría atribuirse a diversas causas como por ejemplo, errores de manipulación en la

ejecución de la técnica, lo que posiblemente haría ingresar contaminaciones exógenas que amplifican una banda del tamaño esperado. También podría deberse a la inespecificidad de los cebadores, que hibridarían con secuencias del genoma de la planta. Ya que en este trabajo se realizaron todas las modificaciones posibles al protocolo entre los límites recomendados, sin lograr reproducir los resultados, la falta de especificidad de los cebadores sería la hipótesis más fuerte, especialmente porque se obtuvieron amplificaciones con ADN de especies vegetales no relacionadas a la caña de azúcar. Por los resultados antes expuestos, se desestimó la técnica propuesta por Davis *et al.* (1998), y se trabajó con el protocolo publicado por Pan *et al.* (1998), que está basado en la PCR convencional y con el cual se obtuvieron resultados repetibles.

El uso de cebadores para amplificar dos regiones intergénicas 16S-23S del ADNr (ITS), altamente conservadas, fue de gran utilidad para el diagnóstico específico de las enfermedades bacterianas (Fenby *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1998). Los protocolos de PCR convencional establecidos por Pan *et al.* (1997 y 1998) fueron aplicados en nuestro laboratorio exitosamente. Se obtuvo la amplificación de los fragmentos esperados de 288 pb para escaldadura y de 438 pb para raquitismo en los controles positivos (muestras de plantas enfermas), coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Iglesia *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2003; Ramallo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999).

La optimización de los protocolos de diagnóstico permitió realizar la evaluación fitosanitaria de tres grupos de muestras de plantines, provenientes de cultivo *in vitro* (vitroplantas) del ciclo de producción 2005 y de dos grupos de genotipos introducidos desde los EE. UU. durante los años 2004 y 2005, que se encontraban en cuarentena fitosanitaria. Debido a que en la evaluación fitosanitaria se determinó la presencia de mosaico solamente en las vitroplantas, surgió la necesidad de realizar una evaluación fitosanitaria de las plantas donadoras de meristemas (plantas madres), previo a su utilización en la micropropagación. Por otro lado, este es el primer reporte en la Argentina de una evaluación molecular de materiales introducidos desde otros países, para asegurar su sanidad. Esto último es de gran importancia para la producción cañera del país, considerando que una deficiente evaluación sanitaria podría significar la entrada de nuevos patógenos que constituirían una verdadera amenaza para esta agroindustria. En el caso de los análisis para el síndrome de la hoja amarilla, no se detectó ninguna muestra positiva bajo las condiciones experimentales descritas en este trabajo.

Con respecto a las enfermedades bacterianas, se determinó una fuerte incidencia de raquitismo en las muestras de la cuarentena 2004 (43,9%), siendo nula en las de 2005, mientras que en el caso de las vitroplantas, la incidencia fue del 11,3%. Asimismo, la escaldadura de la hoja estuvo presente en los tres grupos de materiales evaluados. La elevada incidencia de ambas enfermedades en las muestras analizadas resalta la necesidad de establecer medidas contundentes para mejorar el control sanitario en caña de azúcar, previo a su liberación en el campo o a su incorporación en los programas de mejoramiento, tales como el PMGCA de la EEAOC.

Si bien las pruebas serológicas, en muchos casos, permiten acelerar el diagnóstico de una enfermedad, su utilidad se encuentra limitada por su menor sensibilidad respecto a los métodos moleculares basados en ADN/ARN (Comstock e Irey, 1992; Davis *et al.*, 1994; Guzmán y Victoria, 2001; Pan *et al.*, 1997). El diagnóstico basado en técnicas moleculares posee mayor sensibilidad y especificidad, y a diferencia de lo que sucede con las proteínas y con algunos antígenos, el ADN no sufre ningún cambio en función del estado o crecimiento del patógeno. Los resultados

obtenidos en este trabajo, confirman que el método basado en la detección de ácidos nucleicos presentó mayor sensibilidad que el método serológico ELISA, para el diagnóstico de mosaico de la caña de azúcar y escaldadura, coincidiendo con lo informado por otros autores (Iglesia *et al.*, 2003; Tonukari, 2003; Wang *et al.*, 1999). La sensibilidad de la técnica molecular para el análisis de escaldadura de la hoja permitió detectar tan solo 3 pg de ADN en una reacción. Este valor se encuentra dentro de los valores descritos por otros autores (de 1 pg a 20 pg de ADN/ reacción o 2-10 UFC/ml de muestra), para el diagnóstico molecular de las otras cuatro enfermedades evaluadas en este trabajo (Angel *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2002; Pan, 1997; Pan *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

Se ajustó la técnica de PCR, con el fin de aumentar la eficiencia del diagnóstico de cuatro de las enfermedades sistémicas que más afectan el cultivo de la caña de azúcar: raquitismo de la caña soca, escaldadura de la hoja, mosaico de la caña de azúcar y síndrome de la hoja amarilla.

Para el diagnóstico de las enfermedades virales se optimizó la técnica de RT-PCR, y para las bacterianas, la reacción de PCR convencional. En todos los casos, se obtuvo mayor sensibilidad de detección que con la técnica de inmunodetección ELISA.

Los protocolos de diagnóstico ajustados y presentados en este trabajo fueron incorporados en la EEAOC para realizar la evaluación rutinaria de la sanidad de los plantines micropropagados de caña de azúcar, producidos en el marco del Proyecto Vitroplantas, y de los genotipos introducidos desde el extranjero por parte del PMGCA.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aljanabi, S. M.; L. Forget and A. Dookun. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 1-8.
- Angel, J. C.; F. S. Angel y J. I. Victoria. 2001. Diagnóstico molecular de razas del virus del síndrome de la hoja amarilla en caña de azúcar (ScYLV) en Colombia. *Fitopatol. Colomb.* 25 (1): 19-22.
- Cadavid, M.; J. C. Angel; F. Angel y J. I. Victoria. 2003. Detección simultánea de la enfermedad de Fiji, el mosaico y el síndrome de la hoja amarilla en caña de azúcar utilizando métodos moleculares. *Carta Trimest. Cenicaña* 25 (2): 11-15.
- Chatenet, M.; C. Delage; M. Ripolles; M. Irey; B. E. L. Lockhart and P. Rott. 2001. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Dis.* 85 (11): 1177-1180.
- Comstock, J. C. and M. S. Irey. 1992. Detection of the

- sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. *Plant Dis.* 76: 1033-1035.
- Cuenya, M. I.; E. R. Chavanne; S. Ostengo; M. A. Espinosa; M. A. Ahmed; D. D. Costilla; A. A. Armanini y M. B. García. 2005.** Distribución de variedades comerciales de caña de azúcar en el área de cultivo de la provincia de Tucumán: campaña 2004 – 2005. *Gacetilla Agroind.* (65).
- Davis, M. J.; P. Rott and G. Astua-Monge. 1998.** Nested, Multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. En: Abstracts International Congress of Plant Pathology, 7, Edimburgo, Escocia, pp. 334.
- Davis, M. J.; P. Rott; P. Baudin and J. L. Dean. 1994.** Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 78: 78-82.
- Delfino, M. A. 1984.** Hallazgo del áfido de la caña de azúcar, *Melanaphis sacchari* en la Argentina y Uruguay. *CIRPON, Rev. Invest.* 2 (1-2): 57-64.
- Digonzelli, P. A.; E. R. Romero; J. Scandaliaris; O. Arce, J. Giardina; S. Casen y L. Alonso. 2006.** Producción de caña semilla en Semilleros Registrados provenientes de micropropagación y de hidrotermoterapia de tres cultivares de caña de azúcar. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán* 83 (1-2): 9-17.
- Fenby, N. S.; N. W. Scott; A. Slater and M. C. Elliot. 1995.** PCR and non-isotopic labeling techniques for plant virus detection. *Cell. Mol. Biol.* 41 (5): 639-652.
- Gonçalves, M. C.; M. M. Klerks; M. Verbeek; J. Vega, and J. F. J. M. van den Heuvel. 2002.** The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Eu. J. Plant Pathol.* 108: 401-407.
- Graces, F. F.; C. Balladarez; G. Quiridunbay and C. Muñoz. 2005.** Diagnosis of leaf fleck, leaf scald, mosaic, ratoon stunting disease and yellow leaf of sugarcane in commercial fields and quarantine in Ecuador. En: Proc. ISSCT Congress, 25, Guatemala, Guatemala, pp. 695-700.
- Guzmán, R. M. L. y K. J. I. Victoria. 2001.** Evaluación de cinco enfermedades de la caña de azúcar mediante las técnicas de “dot-blot” y “tissue-blot” a partir de la misma muestra de tejido. *Fitopatol. Colomb.* 25 (2): 103-110.
- Hoy, J. and J. Flynn. 2001.** Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. En: Proc. ISSCT Congress, 24, Brisbane, Australia, pp. 417-421.
- Iglesia, A.; M. Díaz; E. Alvarez; E. L. Peralta y V. Pazos. 2003.** Optimización del diagnóstico múltiple de la escaladura foliar y el raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. *Rev. Protección Veg.* 18 (1): 15-18.
- Lozano, A. I.; M. Díaz; E. L. Peralta; V. Pazos y E. Alvarez. 2003.** Diagnóstico del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR). *Rev. Protección Veg.* 18 (1): 19-22.
- Pan, Y. B. 1997.** A RT-PCR protocol for *Sugarcane yellow leaf syndrome virus*. USDA, ARS SRRS SRU. [En línea]. Disponible en www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome (consultado 8 febrero 2006).
- Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; K. E. Damann and Q. Wei. 1998.** A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Dis.* 82: 285- 290.
- Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; B. L. Legendre and Q. Wei. 1997.** A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 81 (2): 189- 194.
- Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; B. L. Legendre and Q. Wei. 1999.** Development of a polymerase chain reaction primer highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 83 (3): 218-222.
- Ramallo, C. J. y L. D. Ploper. 1998.** Síntomas de amarillamiento en cañaverales de Tucumán. *Avance Agroind.* 18 (72): 16-20.
- Ramallo, J.; N. E. de Ramallo y M. Roncedo. 2000.** Achaparramiento de la caña soca: distribución e incidencia en Tucumán. *Avance Agroind.* 19 (76): 17-20.
- Rott, P.; D. Soupa; Y. Brunet; P. Feldmann and P. Letourmy. 1995.** Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. *Plant Pathol.* 44 (6): 1075-1084.
- Tonukari, N. J. 2003.** Serological versus molecular diagnosis. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 169-170.
- Wang, Z. K.; J. C. Comstock; E. Hatziloukas and N. W. Schaad. 1999.** Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA, and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathol.* 48: 245-252.
- Yang, Z. N. and T. E. Mirkov. 1997.** Sequence and relationships of *Sugarcane mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology* 87: 932-939.