

Diversidad genética del complejo de virosis asociadas a la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar en Tucumán, Argentina*

María F. Perera**, María P. Filippone**, Jacqueline C. Ramallo***,
María I. Cuenya**** y Atilio P. Castagnaro**

RESUMEN

El mosaico de la caña de azúcar es una de las enfermedades sistémicas de mayor importancia de este cultivo. El virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) y el virus del mosaico del sorgo (SrMV) son los principales agentes causales de esta enfermedad. Mediante RT-PCR-RFLP (siglas del "reverse transcriptase-polymerase chain reaction"- "restriction fragment length polymorphism") y secuenciación del gen de la proteína de la cápside, se analizaron muestras de caña de azúcar con síntomas de mosaico para evaluar la presencia y estimar la diversidad genética de ambos virus en el área cañera de Tucumán. Noventa y tres por ciento de las muestras resultaron positivas para SCMV al utilizar los cebadores específicos SCMVF4/R3 y 33% de ellas exhibió el perfil RFLP de la raza E. El resto de las muestras presentó nueve perfiles diferentes que no se correspondieron con los de las razas descritas. El análisis de la secuencia indicó que 20% de las muestras de perfil RFLP desconocido presentó una alta identidad con la raza D, mientras que las muestras restantes resultaron divergentes entre sí. Mediante microscopía electrónica de transmisión, se confirmó la presencia de los típicos viriones flexuosos de los *potyvirus*. Asimismo, se detectó la presencia de SrMV en 90% de las muestras con los cebadores específicos y la coexistencia de ambos virus en 85% de las mismas. Mediante RFLP, se identificaron las razas M e I del virus del sorgo en 68% y 14% de las muestras, respectivamente, y en 18% de los casos se detectó coexistencia entre las razas M y H de esta virosis. Solo una de las muestras no amplificó para ninguno de los dos virus, lo que sugeriría la existencia de otro agente responsable de una sintomatología similar.

Palabras clave: virus del mosaico de la caña de azúcar, virus del mosaico del sorgo, RT-PCR-RFLP, gen de la proteína de la cápside, análisis de secuencias.

ABSTRACT

Genetic diversity of sugarcane mosaic virus complex in Tucuman, Argentina

Sugarcane mosaic is one of the most important systemic diseases of sugarcane. *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) and *Sorghum mosaic virus* (SrMV) are the causal agents of the disease. Sugarcane leaves with mosaic symptoms were analysed by RT-PCR-RFLP (reverse transcriptase-polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism) and the nucleotide sequences of the coat protein (CP) genes amplified to assess the presence and genetic diversity of both viruses in the sugarcane producing area in Tucumán. Using the primers SCMVR3/F4, 93% of samples were SCMV positive and 33% of them had the E strain RFLP profile, while the rest produced nine different profiles that did not match those of any known strains. Sequence analyses showed that 20% of the samples with the unknown profiles were highly identical to the SCMV D strain, while the rest differed significantly from each other. The presence of the flexuous virions typical of *potyviruses* was confirmed by transmission electron microscopy. Also, using the specific primers, the presence of SrMV was detected in 90% of the samples, and co-existence of both viruses was found in 85% of the samples. RFLP analysis determined the presence of SrMV strains M and I in 68% and 14% of the samples, respectively, while in approximately 18% of the cases, both M and H strains were present. No RT-PCR product was produced by either SCMV or SrMV primer pairs in one symptomatic sample, suggesting the presence of another pathogen producing similar symptomatology.

Key words: *Sugarcane mosaic virus*, *Sorghum mosaic virus*, RT-PCR-RFLP, coat protein gene, sequence analysis.

*Trabajo previamente publicado en Proc. ISSCT Congress, 26, Durban, South Africa.

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

***Sección Fitopatología, EEAOC.

****Sección Caña de Azúcar, EEAOC.

INTRODUCCIÓN

El mosaico de la caña de azúcar es una de las enfermedades virales más importantes del cultivo. Los virus comúnmente asociados con los síntomas de mosaico corresponden a numerosas razas del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV, *Sugarcane mosaic virus*) y del virus del mosaico del sorgo (SrMV, *Sorghum mosaic virus*). Ambos virus son miembros del subgrupo conocido como "virus del mosaico de la caña de azúcar" dentro del género *Potyvirus* en la familia *Potyviridae*. Otros dos virus, el virus del mosaico del maíz (MDMV, *Maize dwarf mosaic virus*) y el virus del mosaico del johnsongrass (JGMV, *Johnsongrass mosaic virus*), también forman parte de este subgrupo aunque nunca fueron encontrados en caña de azúcar (Chatenet *et al.*, 2005).

Si bien la enfermedad del mosaico está ampliamente distribuida en el mundo (Koike y Gillaspie, 1989), su importancia económica varía entre los países, ya que en algunos de ellos ha causado pérdidas sustanciales debido a severos estallidos de la enfermedad. A mediados de la década de 1920, por ejemplo, las industrias azucareras de la Argentina, Brasil y Luisiana (EE. UU.) fueron amenazadas por una epidemia de la enfermedad (Koike y Gillaspie, 1989).

Hasta el momento, la única forma efectiva para controlar la enfermedad es el uso de variedades resistentes (Xia *et al.*, 1999), lo que requiere el completo entendimiento de la diversidad genética del patógeno y su interacción con los principales cultivares de caña de azúcar.

En la Argentina, la presencia del SCMV en caña de azúcar se detectó desde los comienzos de la industria, hace ya 190 años. Las primeras caracterizaciones se realizaron mediante el estudio de la sintomatología en hospedantes diferenciales y el primer patógeno identificado de este modo fue la raza B del SCMV (Bennett, 1941). Tiempo después, Ramallo (1981) describió dos variantes adicionales del virus, las razas A y F. También, utilizando una aproximación similar, se detectó la raza I del mosaico del sorgo en plantas con síntomas de mosaico.

Recientemente, mediante técnicas moleculares como RFLP (siglas "restriction fragment length polymorphism") basado en RT-PCR (siglas "reverse transcriptase-polymerase chain reaction"), se determinó la predominancia de la raza E del SCMV en la provincia de Tucumán (Fontana *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue continuar el estudio de los virus asociados con los síntomas de mosaico y estimar la diversidad genética que presentan en el área productora de caña de azúcar de la provincia de Tucumán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se recolectaron 61 muestras correspondientes a 35 variedades con síntomas leves y severos de mosaico, en seis localidades de la provincia de Tucumán (Tabla 1). En la Figura 1, se observan plantas de caña de azúcar con ambos tipos de síntomas (Vázquez de Ramallo y Ramallo, 2004). Las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su utilización. El tejido congelado de hojas fue molido en mortero con nitrógeno líquido y el ARN total fue extraído a partir de 200 mg del mismo, utilizando el protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999). El ADN contaminante se eliminó mediante tratamiento con DNAsa.

RT-PCR

Para la detección del virus del mosaico de la caña de azúcar, se empleó el protocolo de RT-PCR publicado por Alegria *et al.* (2003), utilizando el par de cebadores SCMVF4/R3. La identificación del virus del mosaico del sorgo se realizó utilizando el protocolo de RT-PCR propuesto por Yang y Mirkov (1997) con los cebadores SrMV3/R3. Ambos pares de cebadores amplifican un fragmento del gen de la proteína de la cápside viral de aproximadamente 900 pares de bases (pb) en el caso de SCMV y de 870 pb para SrMV. La primera hebra de ADNc fue sintetizada empleando la enzima transcriptasa reversa de *Maloney-murine leukemia virus* (M-MLV, Promega, Madison, WI, USA) según las recomendacio-

Tabla 1. Localidades de muestreo y genotipos de caña de azúcar.

Localidades	Genotipos de caña de azúcar
Mercedes	CP 65-357; TUC 93-89; TUC 93-104; TUC 94-12; TUC 95-17; TUC 95-18; TUC 96-43; TUC 97-4; TUC 97-19.
Palá Palá	CP 65-357; TUC 93-104; TUC 95-17; TUC 97-21.
Fronterita	CP 65-357; TUC 95-17.
Los Córdoba	CP 65-357; TUC 93-58; TUC 93-89; TUC 93-104; TUC 95-17; TUC 95-18; TUC 95-59; TUC 96-24; TUC 97-4.
Yaquilo	CP 65-357; TUC 93-89; TUC 95-17; TUC 96-24; TUC 97-8.
Santa Ana	CP 65-357; TUC 94-58; TUC 95-59; TUC 95-60; TUC 95-61; TUC 96-27; TUC 96-46; TUC 96-54; TUC 96-55; TUC 96-56; TUC 97-4; TUC 97-5; TUC 97-10; TUC 97-11; TUC 97-15; TUC 98-23; TUC 98-39; TUC 98-53; TUC 98-55; TUC 99-5; TUC 99-7; TUC 99-15; TUC 00-29; TUC 00-9.

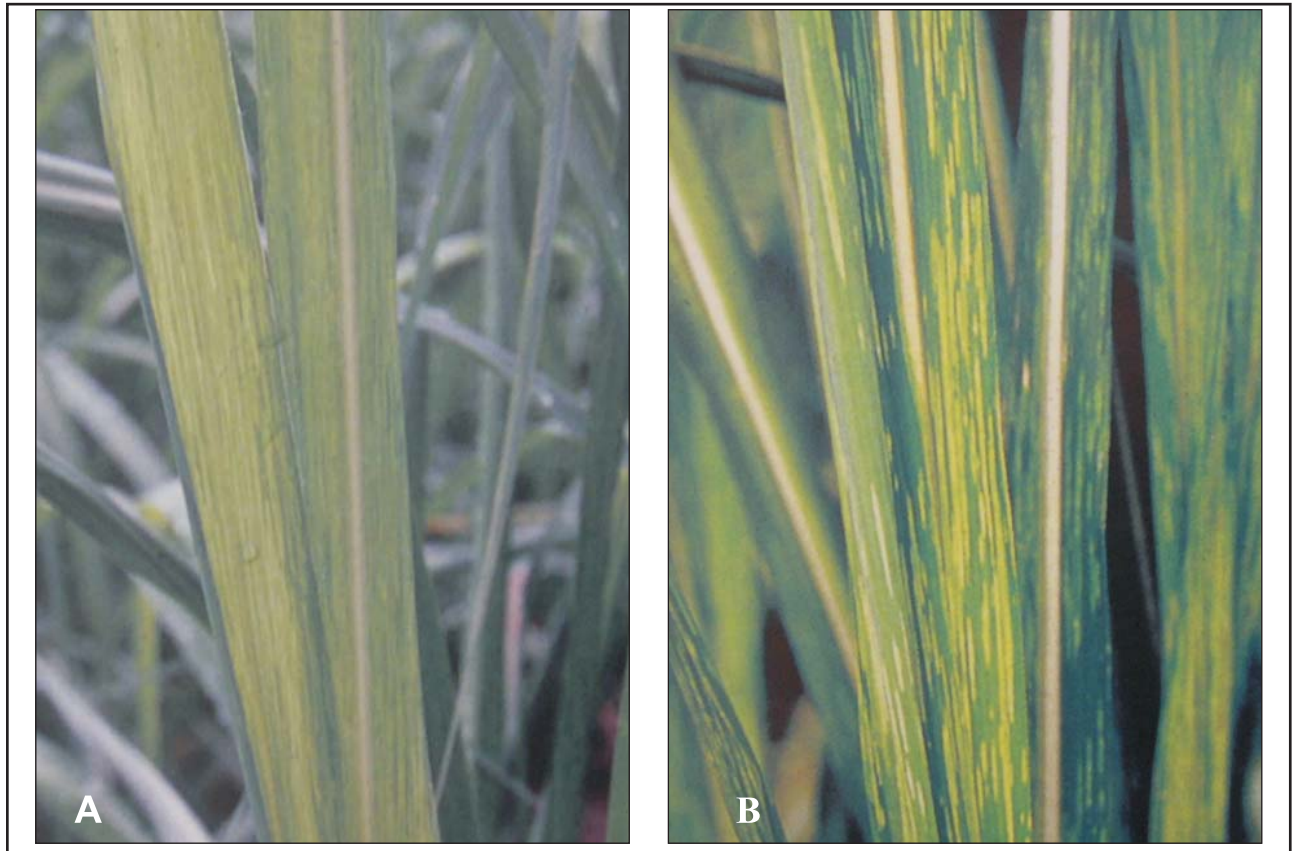


Figura 1. Síntomas leves (A) y severos (B) de mosaico en caña de azúcar.

nes del proveedor y utilizando los cebadores antisentido como iniciadores.

En la reacción de PCR (20 μ l de volumen final), se utilizaron 7,5 μ l de ADNc, 250 ng de cada cebador, 1 X tampón (Promega), 1,5 mM $MgCl_2$ (Promega), 100 μ M dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), 0,6 unidades de Taq DNA polymerase (Promega) y agua tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato, USB Corp., Cleveland, OH, USA) para llevar a volumen final.

Los parámetros del termociclador (PTC-100: Peltier Thermal Cycler, MJ Research) para el mosaico de la caña de azúcar fueron los siguientes: un ciclo de 94°C (15 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 60°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto) y un ciclo final de 72°C durante 5 minutos. Para el virus del mosaico del sorgo, los parámetros fueron: un ciclo de 94°C (15 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 52°C (1 minuto) y 72°C (2 minutos) y un ciclo final de 2°C durante 7 minutos. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV.

RFLP

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción se realizó según el protocolo propuesto por Yang y Mirkov (1997). Los fragmentos amplificados con los cebadores específicos, contienen diferentes sitios de restricción

que pueden ser utilizados para diferenciar las razas virales presentes (Yang y Mirkov, 1997).

Los productos amplificados por RT-PCR fueron precipitados de la fase acuosa al agregar 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Los precipitados se lavaron dos veces con etanol 70% y fueron disueltos en 10 μ l de agua destilada. Para la caracterización de las razas de SCMV, los productos de amplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción *TaqI* (Promega) y *HinfI* (Promega), mientras que para la caracterización de las razas de SrMV se empleó la enzima *HgaI* (Promega).

Las reacciones de digestión se realizaron en 15 μ l de volumen final, utilizando 0,3 unidades/ μ l de enzima. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,7%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

Secuenciación

Los fragmentos de SCMV amplificados por RT-PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA), clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y transformados en *E. coli* DH5 α . Los clones recombinantes fueron secuenciados y las secuencias resultantes se analizaron utilizando el programa DNAMAN y programas para alineamientos múltiples de secuencias (BLASTn).

Microscopía electrónica de transmisión

La presencia de los viriones flexuosos, característicos de la familia *Potyviridae*, se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (Microscopio modelo Jeol JSM-35 CF; Laboratorio de Microscopía Electrónica del Noroeste Argentino, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de Tucumán).

Inoculación mecánica en plantas indicadoras

Se inocularon mecánicamente plantas de sorgo Río (*Sorghum bicolor* cv Río) y maíz (Avant, NK 120, Mac 1000, MG 83213) en el estadio de dos o tres hojas, con jugo obtenido a partir de hojas de caña de azúcar con síntomas de mosaico común y severo. El inóculo se preparó macerando las hojas de caña en un mortero de porcelana previamente humedecido con tampón fosfato, y el macerado se filtró a través de una gasa para recuperar el jugo infectivo. La inoculación se realizó sobre las hojas más jóvenes de las plantas indicadoras, previamente espolvoreadas con carborundum 600, frotando con hisopos de algodón empapados en el inóculo. Las hojas se lavaron con agua corriente después de la inoculación y las plantas inoculadas se colocaron en invernadero durante 12 semanas, bajo condiciones de luz natural y temperaturas que oscilaron entre 25 y 28°C.

Se evaluó la presencia de SCMV en las plantas indicadoras mediante la prueba de ELISA (siglas "Enzyme Linked Immunosorbent Assay") utilizando el antisuero correspondiente (Bioreba).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación de SCMV y SrMV mediante RT-PCR

Al amplificar el ARN total extraído de hojas de caña de azúcar con síntomas de mosaico con los cebadores específicos mediante RT-PCR, se obtuvieron los fragmen-

tos de ADN del tamaño esperado para SCMV y SrMV. En 57 de las 61 muestras evaluadas se obtuvo un fragmento de aproximadamente 900 pb al utilizar los cebadores SCMVF4/R3, y en 55 muestras se obtuvo un fragmento de aproximadamente 870 pb con los cebadores SrMV3/R3 (Figura 2). Del total de las muestras, en 52 se detectaron ambos virus, en cinco sólo SCMV y en tres sólo SrMV. Solamente en una muestra no se obtuvo ningún producto de amplificación por RT-PCR.

Identificación de razas virales

La identificación de las razas virales se realizó mediante comparación de los perfiles de RFLP con los de las razas descritas por Yang y Mirkov (1997). Al digerir los productos amplificados por RT-PCR de SCMV con *TaqI* y *HinfI*, se obtuvieron 10 perfiles diferentes y solo uno de ellos (33% de las muestras positivas para SCMV) coincidió con la raza conocida E. Ninguno de los perfiles restantes coincidió totalmente con los de razas de SCMV descritas con anterioridad, revelando un complejo polimorfismo (Figura 3 A).

Con la finalidad de determinar los genotipos de la población de SCMV bajo estudio, se secuenciaron los fragmentos de RT-PCR. El análisis de las secuencias de nucleótidos reveló que el 20% de las muestras con perfiles RFLP desconocidos presentó un 95% de identidad con la raza D de SCMV, mientras que el resto mostró una gran diversidad genética.

El análisis de RFLP de los productos de RT-PCR específicos de SrMV digeridos con *HgaI* indicó la existencia de las tres razas del virus descritas: H, I y M (Figura 3 B). Las razas M e I fueron detectadas en 68% y 14% de las muestras, respectivamente, mientras que la raza H sólo se encontró en 18% de las muestras y, en todos los casos, en asociación con la raza M.

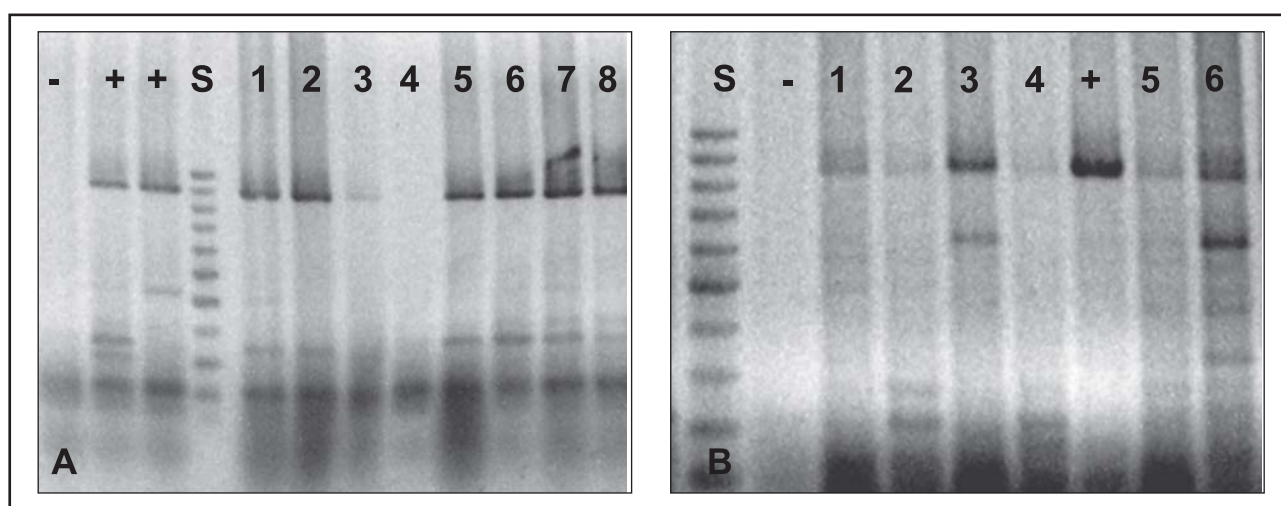


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por RT-PCR para la detección de SCMV y SrMV. A) Productos de amplificación utilizando los cebadores SCMVF4/R3 específicos para SCMV. Calles 1 a 8, muestras individuales desconocidas. B) Productos de amplificación utilizando los cebadores SrMV3/R3 específicos para SrMV. Calles 1 a 6, muestras desconocidas. S, marcador de peso molecular (de arriba hacia abajo: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb; Promega); (-) y (+): controles negativos y positivos, respectivamente.

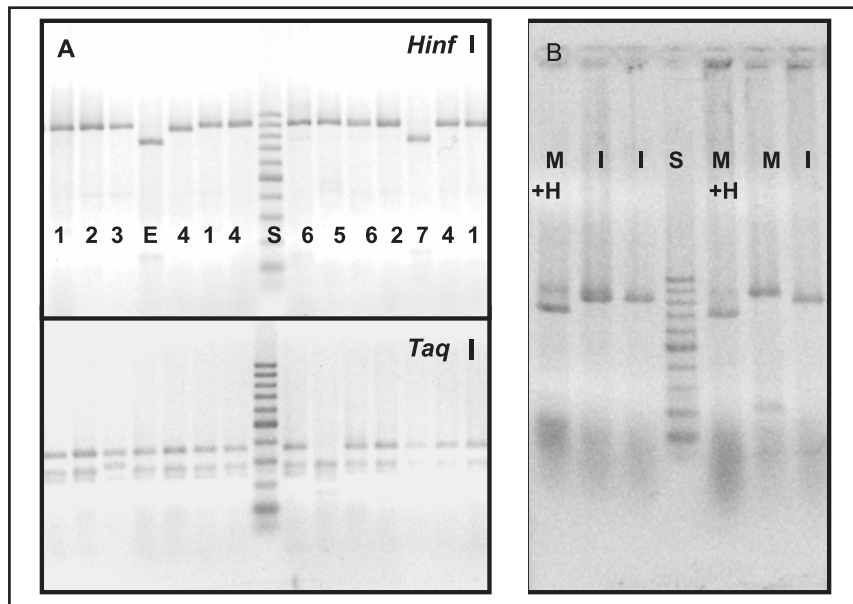


Figura 3. RFLP de los productos amplificados por RT-PCR con cebadores específicos para SCMV y SrMV. A) Determinación de razas de SCMV mediante digestión con *Hinf* I (gel superior) y *Taq* I (gel inferior). E, raza E de SCMV; calles: 1 a 7, perfiles diferentes. B) Determinación de razas de SrMV mediante digestión con *Hga*I. I, H y M, razas del SrMV. S, marcador de peso molecular 100 Marker (de arriba hacia abajo: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb; Promega).

Comprobación de la presencia de viriones

En muestras de hojas de caña de azúcar con síntomas de mosaico, se observó mediante microscopía electrónica de transmisión, la presencia de viriones flexuosos de 700-900 x 12-15 nm, típicos de los miembros de la familia *Potyviridae*. No se observaron diferencias en el tipo de partículas entre las muestras con síntomas leves y severos de mosaico.

Verificación de los postulados de Koch

Las inoculaciones realizadas utilizando jugo de hojas de caña de azúcar con síntomas de mosaico severo y común, indujeron síntomas similares en las plantas indicadoras de sorgo Río después de dos semanas de la inoculación (Figura 4). La severidad de la enfermedad permaneció muy elevada en las plantas de sorgo hasta el final del ensayo (12 semanas). Sin embargo, no se observaron sín-



Figura 4. Dos tipos diferentes de síntomas de mosaico severo en plantas indicadoras de sorgo Río, dos semanas después de su inoculación con jugo de caña de azúcar con síntomas de mosaico.

tomas en plantas indicadoras de maíz.

Todas las plantas con síntomas fueron positivas para la prueba de ELISA utilizando el antisuero para SCMV.

DISCUSIÓN

El mosaico de la caña de azúcar, junto con la enfermedad bacteriana conocida como raquitismo de la caña soca (ambas tienen un efecto sinérgico cuando se presentan juntas), son las enfermedades que más afectan a los cañaverales argentinos. A diferencia del raquitismo, se conoce muy poco del estado actual y local del mosaico, tanto en cuanto a la epidemiología como a las bases genéticas de la enfermedad. Es así que, aunque todos los años por observaciones de campo se evidencia una amplia distribución de la enfermedad del mosaico, no se conoce con exactitud la incidencia de la misma en las pérdidas de rendimiento.

Hasta el momento, la única manera efectiva para controlar la enfermedad ha sido la utilización de cultivares resistentes (Xia *et al.*, 1999), lo que implica indefectiblemente tener un conocimiento pleno tanto de la diversidad genética del patógeno, como de su interacción con los principales genotipos de caña de azúcar cultivados, y más aún si se piensa en un futuro, en una aproximación biotecnológica para el control de la enfermedad, basada en el uso de variedades transgénicas.

Los resultados de este estudio determinaron por primera vez que, además del SCMV, también se encuentra presente el SrMV, y ambos son los principales agentes causales de la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar en las áreas productoras de la provincia de Tucumán. Al mismo tiempo, se determinó un alto nivel de coinfección entre ambos virus. En una única muestra, no se obtuvo producto de amplificación por RT-PCR con los cebadores específicos para SCMV y para SrMV, lo que sugirió que la misma podría estar infectada por una nueva variante de *potyvirus* o por un virus diferente. Se requieren estudios complementarios para confirmar esta hipótesis.

La caracterización de las razas del SCMV mediante RFLP reflejó que la raza E es la más generalizada en la región (33% de las muestras estuvieron infectadas con esta raza), seguida por variantes con una alta identidad con la raza D (20% de las muestras). En 47% de las muestras restantes se detectaron ocho perfiles de RFLP diferentes, indicando la gran diversidad en la población de este virus. En contraste, solo se encontraron tres razas de SrMV, las cuales ya habían sido descritas por distintos autores en otros países azucareros.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado del gen de la CP reveló que la diversidad genética del virus es mucho mayor que la detectada mediante RT-PCR-RFLP. Estos resultados confirman que

la secuenciación, aunque mucho más costosa y laboriosa, es la única técnica disponible en la actualidad para estimar la diversidad genética real de los virus asociados con la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alegria, O. M.; M. Royer; M. Bousalem; M. Chatenet; M. Peterschmitt; J. C. Girard and P. Rott. 2003.** Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Arch. Virol.* 148: 357-372.
- 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. Report.* 17: 1-8.
- Bennett, C. W. 1941.** Informe sobre experimentos con el mosaico de la caña de azúcar en Tucumán, Argentina. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán* 31 (10-12): 427-437.
- Chatenet, M.; C. Mazarin; J. C. Girard; E. Fernandez; D. Gargani; G. Rao; M. Royer; B. Lochart and P. Rott. 2005.** Detection of *Sugarcane streak mosaic virus* in sugarcane from several Asian countries. En: *Proc. ISSCT Congress*, 25, Guatemala, pp. 656-662.
- Fontana, P. D.; J. C. Ramallo; G. R. Vellicce; M. Ontivero; D. Ploper; J. C. Diaz Ricci y A. P. Castagnaro. 2005.** Caracterización molecular de razas del virus del mosaico de la caña de azúcar en Tucumán, Argentina. En: *Libro de Resúmenes del Congreso Latinoamericano de Fitopatología*, 13, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, pp. 591.
- Koike, H. and A. G. Jr. Gillaspie. 1989.** Mosaic. En: *Ricaud, C.; B. T. Egan; A. G. Jr. Gillaspie and C. G. Hughes. (eds.), Diseases of sugarcane: major diseases.* Elsevier, Amsterdam, Holland, pp. 301-322.
- Ramallo, N. E. V. 1981.** Razas del mosaico de la caña de azúcar. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán* 58 (2): 57-68.
- Vázquez de Ramallo, N. E. y C. J. Ramallo. 2004.** Enfermedades de la caña de azúcar en Argentina. Guía para su reconocimiento y manejo. 1. ed. EEAOC, Las Talitas, Tucumán.
- Xia, X.; A. E. Melchinger; L. Kuntze and T. Lübberstedt. 1999.** Quantitative trait loci mapping of resistance to sugarcane mosaic virus in maize. *Phytopathology* 89 (8): 660-666.
- Yang, Z. N. and T. E. Mirkov. 1997.** Sequence and relationships of *Sugarcane mosaic* and *Sorghum mosaic virus* strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology* 87 (9): 932-939.