

DetECCIÓN SIMULTÁNEA DE LA ENFERMEDAD DE FIJI, EL MOSAICO Y EL SÍNDROME DE LA HOJA AMARILLA EN CAÑA DE AZÚCAR UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES

Marcela Cadavid O.*; Juan Carlos Angel Sánchez**; Fernando Angel Sánchez**; Jorge I. Victoria Kafure**

Introducción

Los virus causantes de las enfermedades de Fiji (FDV), el mosaico de la caña (ScMV) y el síndrome de la hoja amarilla (ScYLV) ocasionan daños de importancia económica mundial en el cultivo de la caña de azúcar.

La enfermedad de Fiji no ha sido registrada en América pero sí en el hemisferio oriental donde amenaza seriamente la producción de caña de azúcar. Esta enfermedad es causada por un virus perteneciente a la familia Reoviridae (género: *Fijivirus* subgrupo 1) que infecta células del floema de plantas susceptibles (Hatta y Francky, 1997). El síntoma más característico de la enfermedad es la presencia de agallas a lo largo de los haces vasculares de la superficie inferior de la lámina foliar y la nervadura (Figura 1A). Los cultivos infectados con la enfermedad también pueden presentar un severo raquitismo dando la apariencia, muchas veces, de un césped (Irvine, 1982). La enfermedad es transmitida por saltahojas (Homoptera: Delphacidae) del género *Perkinsiella*, siendo *P. saccharicida*, que presenta una distribución mundial, el vector más eficiente (Egan *et al.*, 1989). En Colombia no hay registros de la presencia de la enfermedad pero sí del insecto vector, por tanto, existen altas probabilidades de infección si no se hace un control sanitario estricto al momento de introducir variedades importadas desde países con cultivos infectados.

El mosaico de la caña y el síndrome de la hoja amarilla son de origen viral y actualmente afectan el cultivo de la caña de azúcar en el valle del río Cauca en Colombia. El segundo es causado por un polerovirus que se manifiesta por el amarillamiento de la nervadura central de las hojas de tallos afectados, el cual se extiende desde la parte distal hacia la base (Figura 1B). Este síntoma no se observa fácilmente en algunas variedades, lo que dificulta su diagnóstico en campo (Victoria *et al.*, 1998). El mosaico es la enfermedad viral de registro más antiguo; es causada por un potyvirus cuya sintomatología se caracteriza por la presencia en forma alterna de áreas verde-oscuras y cloróticas en la lámina foliar (Figura 1C) (Koike y Gillaspie, 1989). La incidencia de esta enfermedad en Colombia es baja debido al uso de variedades resistentes (Guzmán y Victoria, 2001).

El objetivo de la investigación que se reporta en este documento fue estandarizar y desarrollar métodos moleculares para el diagnóstico de los virus causantes de las enfermedades mencionadas, constituidos por ácido ribonucleico (ARN).

* Estudiante en proyecto de pregrado, Departamento de Biología, Universidad del Valle. Programa de Variedades, CENICAÑA.

** Ingeniero Agrónomo, M.Sc.; fitopatólogo <jcangel@cenicana.org>. Biólogo molecular, Ph.D.; biotecnólogo <fangel@cenicana.org>. Ingeniero Agrónomo, Ph.D, director del Programa de Variedades <jvictor@cenicana.org>. Todos de CENICAÑA.



Figura 1. Síntomas en la lámina foliar de las principales enfermedades de la caña de azúcar ocasionadas por virus. **A.** Enfermedad de Fiji; **B.** Síndrome de la hoja amarilla; **C.** Mosaico de la caña.

Metodología

Para la detección de las enfermedades se realizó un trabajo a nivel molecular utilizando la técnica Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Esta técnica es muy sensible y específica, y permite sintetizar el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) proveniente del ARN para posteriormente amplificarlo a fin de obtener bandas específicas de acuerdo con el patógeno que se quiere diagnosticar (Angel *et al.*, 2001a; Angel *et al.*, 2001b).

Inicialmente se trabajó en la estandarización para la detección individual de cada enfermedad mediante RT-PCR y posteriormente se desarrolló la técnica RT-PCR múltiple para diagnosticar los tres patógenos simultáneamente en una misma reacción. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa donde es posible observar las bandas o fragmentos de ADN producidos por amplificaciones a partir de cebadores o iniciadores específicos. Lo anterior permite separar los fragmentos de ADN según su peso molecular. De esta forma, para cada virus se amplifican bandas de ADN de diferentes pesos moleculares que permiten el diagnóstico a partir de la ausencia o presencia de bandas. En los geles se utilizó un patrón o marcador de peso molecular para calcular el tamaño (en pares de bases, pb) de las bandas producidas en el diagnóstico de las diferentes variedades evaluadas. Para todas las reacciones se empleó λ *Pst I* como marcador de peso, el cual tiene un rango de tamaño de bandas entre 11,501 y 150 pb.

Resultados

Diagnóstico individual de la enfermedad de Fiji

Se estandarizó la técnica de RT-PCR para el diagnóstico individual de esta enfermedad según la técnica de Smith y Van de Velde (1994). Como control positivo se utilizó ARN del virus enviado desde Australia (A. James, com. pers.) empleando los cebadores específicos FDV7F y FDV7R. Como resultado se logró la amplificación de un fragmento (banda) de 450 pb correspondiente a un diagnóstico positivo para la enfermedad (Figura 2, carril 2); en el carril 3 se observa el control negativo (sin banda). Estos resultados son comparables con los obtenidos por Smith y Van de Velde quienes, utilizando la prueba RT-PCR con los mismos cebadores específicos, amplificaron este fragmento de igual peso molecular.

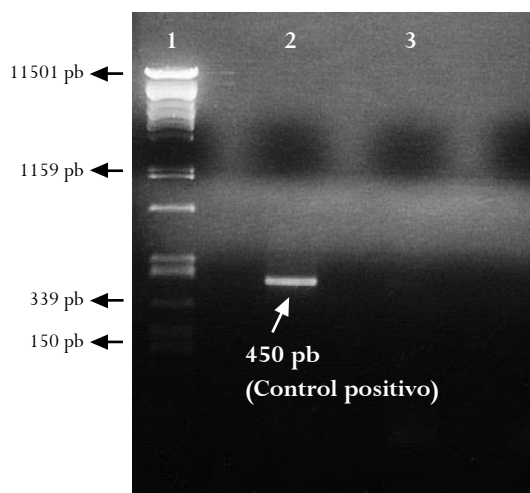


Figura 2.

Electroforesis para la detección de la enfermedad de Fiji.
1 = Marcador λ *Pst* I;
2 = Control positivo (banda de 450 pb);
3 = Control negativo (ausencia de banda).

Detección de la enfermedad de Fiji en variedades importadas

Las variedades Q 121, Q 127, Q 151, Q 152, Q 155, Q 157, Q 159, Q 165 y Q 171 —importadas de Australia y provenientes de la estación de cuarentena cerrada donde se encontraban en proceso de limpieza mediante termoterapia y cultivo in vitro antes de pasar a cuarentena abierta— se sometieron a diagnóstico mediante RT-PCR para el virus de la enfermedad de Fiji.

La RT-PCR se realizó a partir de los ARN extraídos (Qiagen, 1997) de cada una de estas variedades, utilizando como control positivo el ARN del virus enviado desde Australia y agua destilada como control negativo. Los resultados de la amplificación indicaron que las plantas de estas variedades resultaron libres del virus de la FDV (Figura 3, carriles 2 a 5 y 10 a 14). En los carriles 7, 8 y 16 se observa la banda de 450 pb correspondiente al control positivo; los carriles 6 y 15 corresponden a controles negativos (ausencia de banda).

Esta misma metodología se está empleando para el diagnóstico en las variedades importadas por CENICAÑA que llegan a la estación de cuarentena cerrada en Tibaitatá, con el objeto de realizar una evaluación sanitaria precisa y evitar la entrada al país de nuevas razas del virus que puedan afectar el cultivo de la caña de azúcar en Colombia.

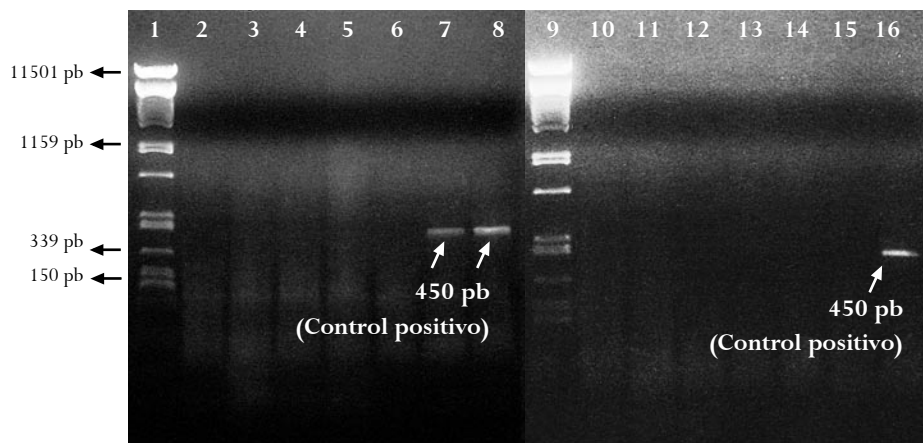


Figura 3.

Electroforesis para el diagnóstico de la enfermedad de Fiji en variedades de caña de azúcar importadas.

1 y 9 = Marcador λ Pst I;
 2 = Q 121; 3 = Q 127;
 4 = Q 151; 5 = Q 152;
 6 y 15 = Control negativo (ausencia de banda);
 7, 8 y 16 = Control positivo (banda de 450 pb);
 10 = Q 155; 11 = Q 157;
 12 = Q 159; 13 = Q 165;
 14 = Q 171.

Diagnóstico individual del virus del mosaico de la caña de azúcar

Se estandarizó la técnica de RT-PCR para el diagnóstico individual de esta enfermedad (Smith y Van de Velde, 1994). Como control positivo se utilizó ARN extraído (Qiagen, 1997) de plantas de caña de azúcar de la variedad CP 31-294 afectadas por mosaico de la caña. Con el uso de los cebadores específicos S400-910 y S400-551 para ScMV se logró amplificar una banda de 359 pb correspondiente a un diagnóstico positivo de la enfermedad (Figura 4, carril 3). Estos resultados confirman los obtenidos por Smith y Van de Velde (1994) quienes utilizando la misma prueba también obtuvieron resultados positivos.

Diagnóstico individual del virus del síndrome de la hoja amarilla

Para el diagnóstico de esta enfermedad se utilizaron los cebadores específicos FM359 y FM323. Este diagnóstico molecular había sido estandarizado previamente por Ángel *et al.* (2001a, b). Como control positivo se utilizó el ARN extraído (Qiagen, 1997) de plantas enfermas de la variedad SP 71-6163 que habían sido previamente analizadas mediante la técnica Tissue Blot Inmuno Assay (TBIA) (Guzmán y Victoria, 2001). Como resultado fue posible amplificar el fragmento de 1200 pb (Figura 4, carril 2) que fue comparable con los resultados obtenidos por Ángel *et al.* (2001a, b).

Detección simultánea de la enfermedad de Fiji, el mosaico y el síndrome de la hoja amarilla mediante RT-PCR múltiple

Para detectar simultáneamente las tres enfermedades en una sola reacción mediante RT-PCR múltiple, primero se estandarizó la reacción doble para síndrome de la hoja amarilla (ScYLV) y el mosaico (ScMV) y después se mezcló el ARN extraído de plantas afectadas por estas dos enfermedades utilizando los cebadores específicos para cada una de ellas. Como resultado se obtuvieron bandas de 1200 y 359 pb correspondientes a ScYLV y ScMV, respectivamente, en una misma reacción (Figura 4, carril 6).

Para la RT-PCR múltiple se mezclaron los ARN extraídos de plantas afectadas por las dos enfermedades anteriores con el ARN positivo para la enfermedad de Fiji (FDV) que fue enviado desde Australia, utilizando los tres pares de cebadores específicos para cada enfermedad. En estos trabajos se obtuvieron bandas de 1200, 450 y 359 pb amplificadas simultáneamente en una misma reacción, asociadas con la presencia de los patógenos ScYLV, FDV y ScMV respectivamente (Figura 4, carril 7). El control negativo no presentó ninguna banda (Figura 4, carril 8).

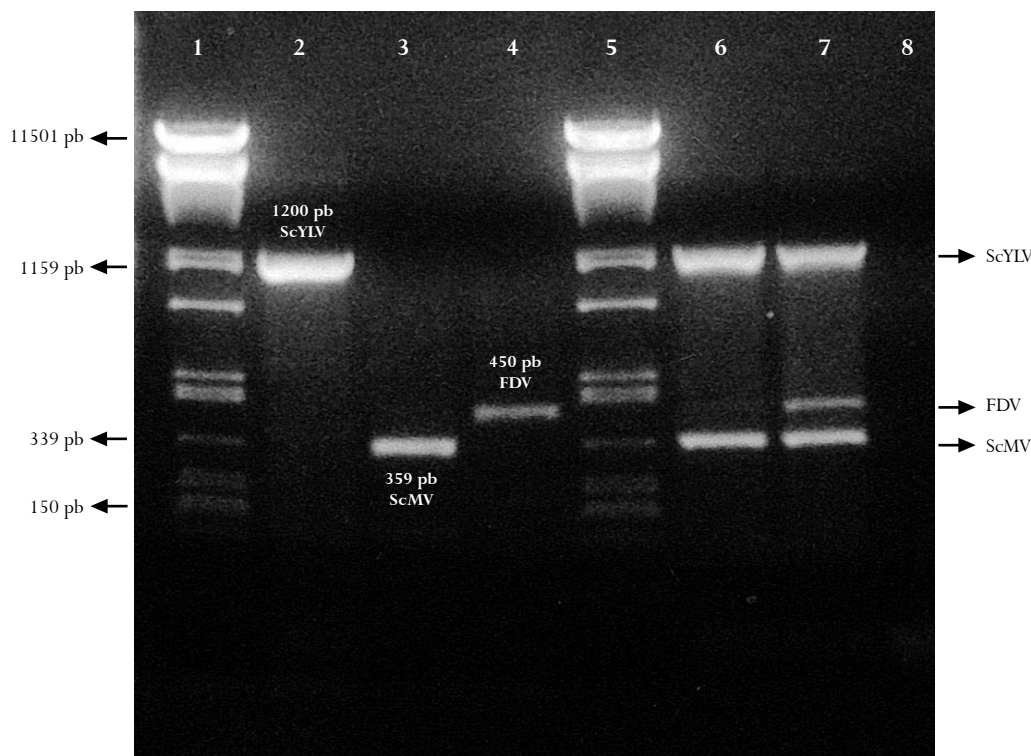


Figura 4.

Electroforesis para el diagnóstico positivo de ScYLV, FDV y ScMV.
1 y 5 = Marcador λ Pst I;
2 = Muestra positiva para ScYLV (banda de 1200 pb);
3 = Muestra positiva para ScMV (banda de 359 pb); **4** = Muestra positiva para FDV (banda de 450 pb);
6 = Muestra positiva para ScYLV y ScMV (bandas de 1200 y 359 pb); **7** = Muestra positiva para ScYLV, FDV y ScMV (bandas de 1200, 450 y 359 pb);
8 = Control negativo (ausencia de bandas).

Conclusiones

A partir de estos estudios fue posible:

- Estandarizar la técnica molecular para el diagnóstico de la enfermedad de Fiji y el mosaico de la caña de azúcar.
- Desarrollar la técnica de RT-PCR múltiple que permite diagnosticar en una misma reacción los virus de la enfermedad de Fiji, el síndrome de la hoja amarilla y el mosaico de la caña de azúcar.
- Utilizar la técnica de RT-PCR múltiple en la evaluación sanitaria de las variedades importadas, evitando así la entrada de nuevas razas de estos virus al país.

Referencias bibliográficas

Ángel, J. C.; Angel, F.; y Victoria, J. I. 2001a. Razas del síndrome de la hoja amarilla en Colombia. Carta Trimestral, CENICAÑA (Colombia). 23(2):9-11.

_____; _____; y _____. 2001b. Diagnóstico molecular de razas del virus del síndrome de la hoja amarilla en caña de azúcar (ScYLV) en Colombia. Fitopatología Colombiana. 25(1):19-22.

- Egan, B. T.; Ryan C. C.; y Francki, R. I. 1989. Fiji Disease. En: Ricaud, C.; Egan, B. T. y Gillaspie, A. G. Jr. (eds.). Diseases of sugarcane. Major diseases. Elsevier Sci. Publ. B.V., Holanda. p.261-287
- Guzmán, M. L. y Victoria, J. I. 2001. Evaluación de cinco enfermedades de la caña de azúcar mediante las técnicas Dot-Blot y Tissue-Blot a partir de la misma muestra de tejido. Fitopatología Colombiana 25(2):103-110.
- Hatta, T. y Francky, R. I. B. 1997. Morphology of Fiji disease virus. Virology 76:797-807.
- Irvine, J. E. 1982. Enfermedad de Fiji y *Perkinsiella*. Sugar J. (ed. en español) 2(4):16-17.
- Koike, H. y Gillaspie A. G. Jr. 1989. Mosaic. En: Ricaud, C.; Egan, B. T. y Gillaspie, A. G. Jr. (eds.). Diseases of sugarcane. Major diseases. Elsevier Sci. Publ. B.V., Holanda. P. 301-322
- Qiagen. Inc 1997. Rneasy Mini Handbook. Product guide. Second edition. 64 p.
- Smith, G. R. y Van de Velde, R. 1994. Detection of sugarcane mosaic virus and Fiji disease virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. Plant Disease 78(6):557-561.
- Victoria, J. I; Garcés, F.; Guzmán, M. L.; y Ángel, F. 1998. Síndrome de la hoja amarilla en Colombia ScYLV (Sugarcane yellow leaf virus). Carta Trimestral, CENICAÑA (Colombia). 20 (2 y 3):3-7.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR DE COLOMBIA -CENICAÑA
Agroindustria unida en la investigación y el desarrollo

CENICAÑA es una institución privada y sin ánimo de lucro fundada en 1977 por iniciativa de la agroindustria azucarera localizada en el valle del río Cauca. Su misión es contribuir por medio de la investigación, evaluación y divulgación de tecnología y el suministro de servicios especializados al desarrollo de un sector eficiente y competitivo, de manera que éste juegue un papel importante en el mejoramiento socioeconómico y en la conservación de un ambiente productivo, agradable y sano en las zonas azucareras.

Las actividades de investigación y desarrollo son financiadas por los ingenios azucareros y los cultivadores de caña a través de donaciones directas definidas cada año como un porcentaje del valor de la producción de azúcar.

Las áreas de investigación se enmarcan en tres programas: Variedades, Agronomía y Procesos de Fábrica.

Los servicios de apoyo son: Información y documentación, Economía y Estadística, Cooperación Técnica y Transferencia de Tecnología y Tecnología Informática.

El Centro Experimental está ubicado a 3°13' latitud norte, a 1024 metros de altura sobre el nivel del mar. En este sitio la temperatura media anual es de 23.5°C, la precipitación de 1160 mm y la humedad relativa de 77%.

La *Carta Trimestral* es una publicación periódica, editada por Cenicaña con el propósito de difundir información y conocimientos científicos y tecnológicos relacionados con el desarrollo de la agroindustria azucarera colombiana. Ofrece documentación resumida sobre los resultados generados por el centro de investigación y las experiencias de ingenios y cañicultores con las nuevas tecnologías, al tiempo que provee las referencias bibliográficas complementarias sobre cada tema. El primer volumen fue editado en 1978, y los cambios más significativos de diseño y concepto editorial se dieron en 1997 cuando la versión impresa comenzó a publicarse también en Internet.

Título: Detección simultánea de la enfermedad de Fiji, el mosaico y el síndrome de la hoja amarilla en caña de azúcar utilizando métodos moleculares

Autores: Marcela Cadavid-O; Juan Carlos Angel-Sánchez; Fernando Angel-Sánchez;
Jorge I. Victoria-Kafure

Publicado en: Carta Trimestral. Cenicaña, 2003. v.25, no. 2y3. p.11-15

© Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, 2003.

Centro Experimental: vía Cali-Florida, km 26

Tel: (57) (2) 2606611 – Fax: (57) (2) 2607853

Oficina de enlace: Calle 58 norte no.3BN-110

Apartado aéreo: 9138

Cali, Valle del Cauca –Colombia

www.cenicana.org

webmaster@cenicana.org