

Presencia del sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) aislado de Colima

María Inés Barbosa Villa¹

José Luis Cruz Jaramillo²

Hilda Victoria Silva Rojas³

Karina de la Paz García Mariscal⁴

José Concepción García Preciado⁴

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán^{4§}

¹Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Zamora. Carretera Zamora-La Piedad km 7, Zamora, Michoacán, México. CP. 59720. (mines_mibv@hotmail.com). ²CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México. CP. 07360. (lcruz@cinvestav.mx). ³Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. (hsilva@colpos.mx). ⁴Campo Experimental Tecomán-INIFAP. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecomán, Colima, México. CP. 28100. (garcia.karina@inifap.gob.mx; garcia.concepcion@inifap.gob.mx).

§Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx.

Resumen

La caña de azúcar es uno de los cultivos industriales importantes a nivel mundial y es afectado por diversas enfermedades virales, incluido el sugarcane yellow leaf virus (SCYLV). En México este virus se ha detectado basado en sintomatología y °Brix; sin embargo, el diagnóstico basado en estos parámetros no es concluyente. El objetivo del estudio fue detectar la presencia y distribución del SCYLV en zonas cañeras del Occidente de México (Colima, Jalisco y Nayarit) y determinar el origen filogenético de un aislado de Colima. El trabajo se desarrolló en el Campo Experimental Tecomán durante 2013-2014. Se aisló el RNA total a partir de hojas colectadas y se realizaron las RT-PCR con oligonucleótidos específicos para SCYLV. Se analizaron 233 muestras y la incidencia de plantas portadoras del SCYLV fue 14.6%, afectando a los híbridos CP 72-2086, Mex 69-290 y Atemex 96-40. El análisis BLAST mostró que la secuencia parcial CP de Colmex-317 (512 pb) es homóloga con secuencias de Brasil, China, India, Kenia y USA, además comparte porcentajes de identidad superior a 99% con otras secuencias provenientes de varios países. El análisis filogenético de Colmex-317 con secuencias parciales y genomas completos del SCYLV aislados de diversas partes del mundo reveló que el aislado mexicano pertenece al genotipo de Brasil (BRA) y se agrupó con secuencias de Brasil, China, Kenia y Sudáfrica. Sin embargo, es necesario evaluar un mayor número de aislados y secuencias de mayor longitud para determinar si el genotipo BRA es el único presente en México.

Palabras clave: *Saccharum* spp., RNA, RT-PCR, SCYLV.

Recibido: junio de 2018

Aceptado: septiembre de 2018

Introducción

Los virus ocasionan las enfermedades más importantes en caña de azúcar a nivel mundial, causando grandes epidemias y pérdidas de enormes proporciones. Entre los patógenos virales de importancia económica a nivel mundial para el cultivo de la caña de azúcar se encuentran el sugarcane yellow leaf virus (SCYLV), agente causal del síndrome de la hoja amarilla (YLS). El SCYLV es integrante de la familia Luteoviridae, en la cual se ubican aquellos virus que ocasionan síntomas de amarillamiento en las plantas hospederas que infectan, incluida la caña de azúcar (Rott *et al.*, 2008; Girard *et al.*, 2012). El síntoma característico ocasionado por el SCYLV en caña de azúcar es un amarillamiento intenso en la nervadura central de las hojas infectadas, el cual varía según la variedad y factores ambientales (Lockhart y Cronjé, 2000). En variedades afectadas por SCYLV se han reportado pérdidas en rendimiento de 40-50% (Vega *et al.*, 1997), mientras que en plantas asintomáticas con este mismo virus las mermas son de 10-30% (Lehrer y Komor, 2008; Lehrer *et al.*, 2010). Por lo anterior, este virus es considerado en los programas de mejoramiento genético de varios países cañeros, principalmente Brasil, en los que la selección y eliminación de clones susceptibles seguido de pruebas de patogenicidad se han vuelto procedimientos rutinarios (Gonçalves *et al.*, 2012).

El SCYLV fue detectado por primera vez en Hawaii en el año de 1988 y en Brasil en 1990 (Vega *et al.*, 1997; Schenck *et al.*, 2001). Este virus se ha reportado en las áreas productoras de caña de azúcar en varios países. El SCYLV fue responsable de drásticas pérdidas económicas en el sureste de Brasil a comienzos de 1990 y actualmente, es el principal problema fitosanitario en los programas de mejoramiento genético de ese país (Gonçalves *et al.*, 2012). En México, los síntomas del YLS fueron observados por primera vez en el año de 1996 afectando a la variedad CP 72-2086 en la comunidad de La Margarita, Oaxaca. Ese mismo año se reportó su presencia en la misma variedad en Chiapas, Colima y Veracruz.

También se detectó en Sinaloa afectando a la variedad Mex 57-473 (Flores, 1997). Sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad realizado en México se ha basado en sintomatología típica de la enfermedad asociada a YLS y °Brix del raquis de la hoja. Lo anterior no es concluyente debido a que el amarillamiento es un síntoma muy general de varias enfermedades y deficiencias de micro y macro nutrientes, además de que el patrón de coloración depende de variables como el genotipo y condiciones ambientales (Lockhart y Cronjé, 2000).

Por otra parte, los niveles del porcentaje de los °Brix también se ven afectados (aumentando o disminuyendo) por acción de algunas enfermedades (Vasconcelos *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2012), al igual que por elementos químicos como el potasio (K), el cual tiene una función clave en la síntesis de azúcares y su translocación en los tallos de caña de azúcar, incrementando así los niveles de Pol y °Brix (Aucatoma *et al.*, 2015). Por lo anterior, no resulta confiable emitir diagnósticos basados en estos parámetros. Los métodos de detección de SCYLV más utilizados y fiables están basados en la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) y son los más utilizados en la actualidad por los programas de mejoramiento genético de la caña de azúcar en varias partes del mundo (Xie *et al.*, 2009; Joomun y Dookun, 2010; Aday *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015).

Con respecto al origen filogenético del SCYLV, a la fecha se han determinado 10 grupos genéticos diferentes: 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; ElSayed *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). La diversidad genética de las poblaciones del SCYLV sugieren la existencia de grandes variaciones entre los aislados del virus, las cuales pueden afectar el grado de virulencia, transmisión y gravedad de los síntomas asociados con SCYLV. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia y distribución del SCYLV en zonas cañeras del Occidente de México (Colima, Jalisco y Nayarit) y determinar el origen filogenético de un aislado mexicano.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se colectaron muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit durante los años 2013-2014. Las plantas presentaron sintomatología típica de YLS o fueron asintomáticas. Las muestras se envolvieron en bolsas plásticas y éstas en hieleras con refrigerantes térmicos para trasladarlas al laboratorio de biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán del INIFAP ubicado en el km 35 de la carretera Colima-Manzanillo en Colima.

Purificación, cuantificación y determinación de la pureza e integridad del RNA

Aproximadamente 200 mg de tejido foliar fueron pulverizados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue depositado en tubos de 1.5 mL y homogeneizado con 500 μ L de Tripure (Roche). Se siguieron las recomendaciones del fabricante para la extracción del RNA total. Finalmente, el RNA obtenido fue resuspendido en agua libre de RNasa (0.01% DEPC) y almacenado a -70 °C. La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) utilizando 1 μ L del RNA total extraído y se midieron las relaciones de $A_{260/280}$ y $A_{230/280}$ para determinar su pureza. La integridad del RNA fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y visualizado con bromuro de etidio (BrEt) en un transiluminador con luz ultravioleta (UVP).

Control positivo y detección del SCYLV por RT-PCR

La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realizó utilizando el kit 'Reverse Transcription System' (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los cDNA resultantes fueron utilizados como molde para la amplificación por PCR con el juego de oligonucleótidos SCYLV-F/SCYLV-R descritos por Xie *et al.* (2009). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L, conteniendo 12.5 μ L de REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1 μ M de cada oligonucleótido, 3 μ L de cDNA y H₂O grado molecular. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50 °C por 30 min y 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 5 min.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y fueron cargados 12.5 µL de los productos de PCR, las muestras se corrieron con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñeron con BrEt y se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados. Con el objetivo de contar con un control positivo para la detección del virus, el producto de PCR de 512 pb correspondiente a una muestra de una localidad de Tecomán, Colima fue purificada a partir del gel de agarosa con el kit 'QIAquick Gel Extraction' (QIAGEN).

El fragmento se clonó con el sistema 'pGEM-T Easy' (Promega) y se transformó en células de *E. coli* JM109 (Promega), las cuales se hicieron competentes previamente con CaCl₂ de acuerdo a Riley *et al.* (2008). La comprobación del inserto clonado en el vector se realizó mediante PCR y análisis restrictivo. La extracción de DNA plasmídico de las colonias recombinantes que se utilizó como molde para la PCR se llevó a cabo de acuerdo a Engebrecht *et al.* (2001), mientras que para la reacción de digestión se utilizaron las enzimas de restricción EcoR I y Not I.

Secuenciación, edición y análisis de la secuencia

El DNA plasmídico del fragmento clonado en *E. coli* fue secuenciado en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en ambas direcciones por el método de terminación con el Big Dye (Applied Biosystems). La edición y el ensamblado de las secuencias 'forward' y 'reverse' se realizó con el programa CLC Main Workbench 7.0.3 (<https://www.qiagenbioinformatics.com>). Finalmente, se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para SCYLV en la base de datos del 'National Center for Biotechnology information' (NCBI) empleando la herramienta 'Basic Local Alignment Search Tool' (BLAST). La secuencia fue depositada en la base de datos del NCBI.

Análisis filogenético

Los análisis bioinformáticos se realizaron con el software CLC Main Workbench versión 7.0.3. Se llevó a cabo el análisis BLAST en NCBI con la secuencia del SCYLV denominada ColMex-317 (NCBI: KT334298.1). Se seleccionaron y descargaron secuencias completas con los mayores porcentajes de identidad con ColMex-317 y se emplearon otras más de la misma base de datos con distintos orígenes geográficos. Posteriormente fue utilizada la herramienta de alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo MUSCLE y para la construcción del árbol filogenético se usó el método de máxima verosimilitud y UPGMA (Edgar, 2004). Se realizó un modelo de prueba para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para los datos y se seleccionó Kimura 80. El análisis bootstrap consistió de 1 000 réplicas y se agregó como grupo externo la región CP del PRSV (NCBI: AJ012650.1). Finalmente, el árbol filogenético fue editado con el software TreeGraph 2.

Resultados y discusión

El síntoma característico de amarillamiento intenso en la nervadura central de hojas de caña de azúcar, asociado con la presencia del SCYLV, se encontró en la mayor parte de muestras positivas al virus (Figura 1). Sin embargo, algunas muestras con síntomas severos, similares a los mostrados en la Figura 1, resultaron negativas a SCYLV por RT-PCR, lo cual coincide con lo reportado por Wang *et al.* (2012), quienes obtuvieron 129/634 muestras positivas al SCYLV, de las cuales 96 y 33 fueron de plantas sintomáticas y asintomáticas, respectivamente.



Figura 1. Síntomas del síndrome de la hoja amarilla (YLS) en plantas de caña de azúcar. Se observa sintomatología característica de amarillamiento intenso en nervaduras centrales asociados al SCYLV.

Lo anterior, sugiere que la infección con el virus solamente tiene cierto grado de asociación con los síntomas de amarillamiento en campo, ya que dicho síntoma es muy general para varias enfermedades de origen viral que afectan a plantas. En caña de azúcar, las deficiencias de micro y macro nutrientes, generan síntomas de amarillamiento (McCray *et al.*, 2006), los cuales podrían ser similares a los causados por el SCYLV. Además, el patrón de coloración también depende de variables como el genotipo y condiciones ambientales (Lockhart y Cronjé, 2000).

Por otra parte, la detección temprana del SCYLV en híbridos de *Saccharum* spp. es posible, mediante técnicas moleculares, debido a que puede haber niveles detectables del virus en etapas asintomáticas (Viswanathan *et al.*, 2009). En este estudio los productos de RT-PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa que mostraron la amplificación de fragmentos de ~512 pb del SCYLV fueron considerados como positivos al virus (Figura 2). De las 233 muestras foliares analizadas, 34 dieron positivo al virus, lo que representa una incidencia 14.6%. El SCYLV se presentó en los tres estados del Pacífico de México que abarcó el presente estudio (Cuadro 1).

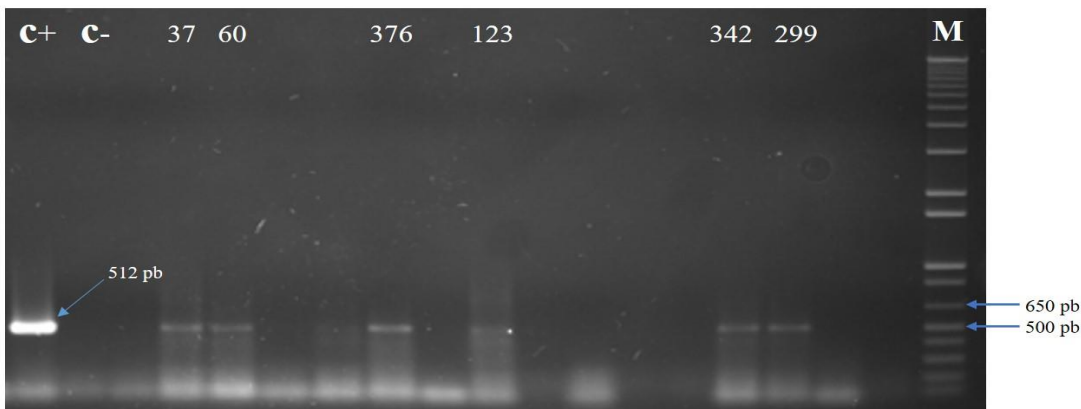


Figura 2. Detección del Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) mediante RT-PCR en muestras de caña de azúcar procedentes de tres estados del Pacífico Mexicano. C+= control positivo; C-= control negativo; M= marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). Los números corresponden a diferentes muestras positivas al virus.

Cuadro 1. Relación de muestras de caña de azúcar positivas al SCYLV mediante RT-PCR en la región cañera del Occidente de México.

Núm. Muestra	Estado	Municipio	Georreferencia	Variedad
1	347	-	-	<i>Saccharum</i> spp.
2	346	-	-	Colmex 95-27
3	2	Colima	Tecomán N 18°56'06.52" W 104°00'03.54"	<i>Saccharum</i> spp.
4	37	Colima	Tecomán N 18°48'33.23" W 103°50'37.89"	Mex 69-290
5	148	Colima	Tecomán N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
6	336	Colima	Tecomán N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
7	27	Colima	Tecomán N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
8	58	Colima	Tecomán N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
9	60	Colima	Tecomán N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"	CP 72-2086
10	318	Colima	Tecomán N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
11	325	Colima	Tecomán N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
12	380	Colima	Tecomán N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
13	409	Colima	Tecomán N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
14	312	Colima	Tecomán -	<i>Saccharum</i> spp.
15	317	Colima	Tecomán N 18°58'27.53" W 103°51'17.04"	CP 72-2086
16	376	Colima	Tecomán N 18°58.455' W 103°51.285'	CP 72-2086
17	401	Colima	Tecomán N 18°57'47.88" W 103°50'15.24"	<i>Saccharum</i> spp.
18	405	Colima	Tecomán N 18°57'47.88" W 103°50'15.24"	<i>Saccharum</i> spp.
19	123	Jalisco	Zapotiltic N 19°38'42.58" W 103°24'31"	Atemex 9640
20	138	Jalisco	Zapotiltic N 19°38'42.58" W 103°24'31"	Atemex 9640
21	340	Jalisco	La Huerta N 19°31'07.39" W 104°32'11.61"	Atemex 96-40
22	342	Jalisco	Cuautitlán N 19°26'49.58" W 104°24'10.45"	<i>Saccharum</i> spp.
23	344	Jalisco	Cuautitlán N 19°26'54.74" W 104°23'40.70"	Mex 79-431
24	349	Jalisco	El Grullo N 19°47'44.20" W 104°13'38.63"	Atemex 96-40
25	248	Jalisco	Zapotiltic N 19°38'42.58" W 103°24'31"	Atemex 9640
26	281	Jalisco	-	Atemex 96-40
27	348	Jalisco	Autlán -	Mex 69-290
28	217	Nayarit	Jala N 21°05'08.59" W 104°25'56.82"	Mex 69-290
29	299	Nayarit	Santa María del Oro N 21°20'23.8" W 104° 34'55.1"	Mex 69-290
30	169	Nayarit	Xalisco N 21°27'50.1" W 104° 53'11.4"	<i>Saccharum</i> spp.
31	176	Nayarit	Tepic N 21°27'17.7" W 104° 49'09.2"	<i>Saccharum</i> spp.
32	191	Nayarit	Santa María del Oro N 21°15'33.4" W 104° 29'54.3"	<i>Saccharum</i> spp.
33	192	Nayarit	Santa María del Oro N 21°15'33.4" W 104° 29'54.3"	<i>Saccharum</i> spp.
34	306	Nayarit	-	CP 89-2143

En Colima, se detectó afectando a la variedad CP 72-2086 en Tecomán, mientras en Jalisco, el virus se detectó en Autlán, El Grullo, La Huerta, Cuautitlán y Zapotiltic, afectando a las variedades Mex 79-431, Mex 69-290 y Colmex 95-27. Finalmente, en Nayarit la zona de estudio comprendió los municipios de Jala, Santa María del Oro, Tepic y Xalisco, donde el SCYLV se encontró afectando las variedades Mex 69-290 y CP 89-2143. Este es el primer reporte basado en métodos moleculares para la detección del SCYLV en cultivos de caña de azúcar comerciales en México.

En Cuba se determinó la distribución del SCYLV en diferentes provincias. Se analizaron 525 muestras de 35 zonas (348 ha), el virus se detectó por inmunopresión de tejidos y RT-PCR, en la mayoría de las zonas muestreadas fue alta la incidencia de síntomas asociados a esta enfermedad (82.29%) (Aday *et al.* 2014). En China, Gao *et al.* (2012), evaluaron la distribución del virus en las principales provincias de ese país sembradas con caña de azúcar en 22 híbridos de *Saccharum* spp. que mostraron síntomas de YLS utilizando técnicas moleculares (RT-PCR, qRT-PCR) y serológicas (TBIA y DAC-ELISA). De las 22 muestras analizadas 19 fueron positivas al virus por RT-PCR, TBIA y/o DAC-ELISA, mientras que con la técnica de qRT-PCR todas las muestras resultaron positivas, lo que demuestra la elevada sensibilidad de la qRT-PCR en comparación con la RT-PCR y técnicas serológicas para detectar patógenos. En otro estudio Wang *et al.* (2012) analizaron muestras de caña de azúcar de la parte sur de China para detectar presencia del SCYLV.

Los productos esperados de 1.3 kb fueron amplificados en 129/634 (20.3%) individuos por RT-PCR y el virus estuvo presente en 6 provincias. Finalmente, también en China, se analizaron 332 muestras foliares para detectar al virus por RT-PCR y se observó una incidencia de 24-38%, dependiendo del área geográfica (Lin *et al.*, 2015). Estos trabajos evidencian que el SCYLV se ha detectado principalmente por técnicas moleculares, no solamente en China y Cuba como se describió, sino en diversos países del mundo como Argentina, Brasil, India y Kenia (Scagliusi *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2015; Amata *et al.*, 2016).

La amplia distribución del SCYLV en distintas zonas cañeras del planeta se puede deber a la forma de reproducción de la caña de azúcar por semilla estaca, donde el traslado de germoplasma entre las regiones cañeras de un país a otro, en algunas ocasiones se da de manera descontrolada, transportando la carga patogénica a otras regiones. También la presencia de áfidos vectores constituyen otro importante factor para la dispersión de este virus (Figueredo *et al.*, 2004).

En relación al origen filogenético del aislado mexicano, la secuencia ColMex-317 fue depositada en la base de datos de NCBI con el registro KT334298. Se determinó que la secuencia de 512 pb corresponde a una región parcial del gen de la proteína de la cápside (CP) del SCYLV codificada por el ORF3. El análisis BLAST indicó que la secuencia ColMex-317 de 512 pb es homóloga (100% de identidad) con secuencias reportadas de Brasil, China, India, Kenia y USA, y comparte un elevado porcentaje de identidad con otras secuencias de diversos orígenes geográficos.

Los resultados del análisis filogenético realizado con el fragmento ColMex-317 y otras secuencias del SCYLV (Cuadro 2) con las que comparte 96.29-100% de identidad se muestran en la Figura 3. Se observa la formación de cinco grupos y se distinguen siete de los diez genotipos reportados para SCYLV: HAW, PER, BRA, REU, COL, CHN1 y CHN2 (Moonan y Mirkov, 2002; Abu Ahmad *et al.*, 2006; ElSayed *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). No se consideraron secuencias de Cuba, India y CHN3. ElSayed *et al.* (2011) reportaron la formación de tres grupos: BRA, HAW-PER y REU utilizando diversos árboles filogenéticos construidos con fragmentos de distintas longitudes y genomas completos.

Cuadro 2. Secuencias parciales y completas de los ORF y genomas completos del SCYLV obtenidas de la base de datos de NCBI y utilizadas en este estudio para el análisis filogenético. Se incluye la secuencia CP del PRSV como grupo externo.

Nombre del aislado	Híbrido	Origen geográfico	Acceso NCBI	Tamaño de fragmento (pb)	Porción del genoma
Aus1	VMC71-238	Australia	AJ491255.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
BRA1	<i>Saccharum</i> spp.	Brasil	AJ582772.1	555	ORF3 y ORF4 parciales
BRA-YL1	SP71-6163	Brasil	AM072750.1	5 612	Genoma completo
Braz1	SP77-5181	Brasil	AJ491257.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
chn1	CP93-1309	China	GU327735.1	5 803	Genoma completo
CHN-FJ4	FN02-3924	China	JQ266226.1	2 915	ORF1, ORF2 y ORF5 parciales, ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD3	YT86-368	China	JQ266228.1	2 876	ORF1, ORF2 y ORF5 parciales, ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-GZ10-1	CP93-1634	China	HQ245324.1	1 284	ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-GZ10-3	CP93-1634	China	HQ245326.1	1 284	ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-ZC1	<i>Saccharum</i> spp.	China	HQ245328.1	1 284	ORF3 y ORF4 completos
CHN-GD-ZJ1-2	<i>Saccharum</i> spp.	China	HQ245330.1	1 284	ORF3 y ORF4 completos
ColMex-317	CP 72-2086	México, Colima	KT334298.1	512	ORF3 parcial
Haw1	H78-3606	USA, Hawái	AJ491261.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
Haw2	H87-4094	USA, Hawái	AJ491262.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
J55/487	<i>Saccharum</i> spp.	Kenia, Kilifi	KR608794.1	996	ORF3 completo
Kampala	<i>Saccharum</i> spp.	Kenia, Kilifi	KR608793.1	996	ORF3 completo
Maur1	M1658-78	Mauricio	AJ491263.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
Maur2	M2350-79	Mauricio	AJ491264.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
PER-YL1a	H50-7209	Perú	AM072752.1	5 612	Genoma completo
PER-YL1b	H50-7209	Perú	AM072753.1	5 612	Genoma completo
Reun2	R85-1102	Reunión	AJ491266.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
REU-YL1a	R570	Reunión	AM072754.1	5 612	Genoma completo
SA1	N30	Sudáfrica	AJ491267.1	672	ORF5, ORF3 y ORF4 parciales
SCYLV-C4	CC84-75	Colombia	AF369929.1	2 832	ORF1, ORF2 y ORF5 parciales, ORF3 y ORF4 completos
ChT-11	NA	México	AJ012650.1	924	Gen CP del PRSV

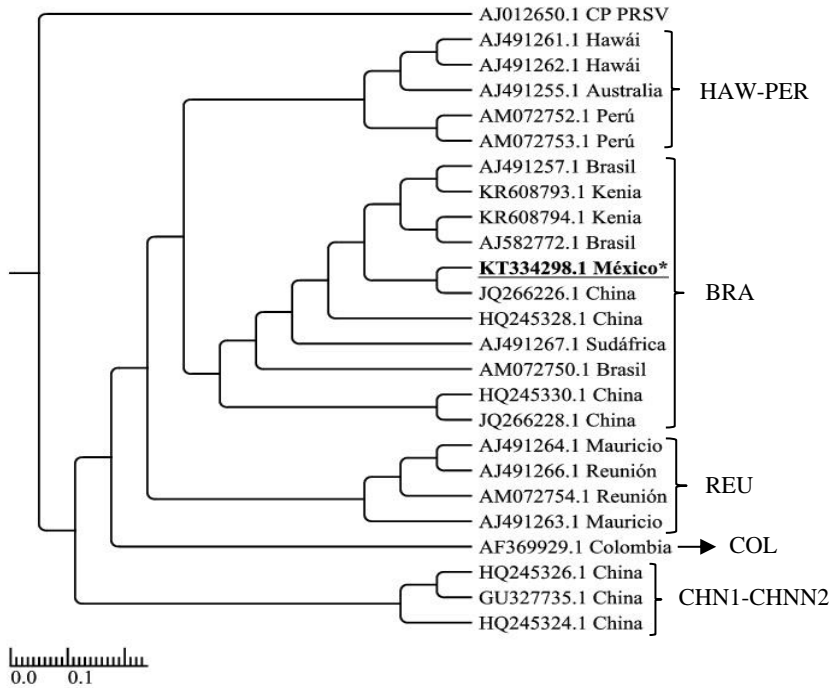


Figura 3. Árbol filogenético basado en el método UPGMA y máxima verosimilitud utilizando secuencias parciales y genomas completos del SCYLV. Se utilizó como grupo externo la secuencia CP del PRSV (*Papaya ringspot virus*) y se realizó análisis bootstrap con 1000 réplicas. Con un asterisco se resalta el aislado mexicano de este estudio. Genotipos HAW-PER= Hawái-Perú, BRA= Brasil, REU= Reunión, COL= Colombia y CHN= China.

En otro estudio Chinnaraja *et al.* (2013) obtuvieron agrupaciones similares, además de otros clústeres correspondientes a otros genotipos reportados para SCYLV. En este estudio se obtuvo la misma tendencia de formación de tres clústeres principales antes mencionados, además de otros dos grupos donde se ubicaron el aislado de Colombia y en otro grupo secuencias de origen chino (Figura 3). Las variaciones genéticas entre los alineamientos de las secuencias que conformaron el árbol filogenético fueron de 0-18 nucleótidos, siendo las más diversas las secuencias de los genotipos CHN1 y CHN2, las cuales compartieron con la secuencia ColMex317 (KT334298.1) porcentajes de identidad de 96.29, 96.68 y 98.63% para CHN1 (HQ245326.1), CHN1 (GU327735.1) y CHN2 (HQ245324.1), respectivamente. El resto de secuencias tuvieron porcentajes de identidad elevados con ColMex317, superiores al 99%. La secuencia de origen mexicano se agrupó con secuencias de Brasil, China, Kenia y Sudáfrica, por lo que probablemente su origen sea brasileño ya que todas las secuencias de este grupo corresponden al genotipo BRA, sin embargo, es necesario analizar un mayor número de secuencias y de mayor longitud nucleotídica.

Varios autores han reportado un grupo exclusivo para cepas de Reunión (genotipo REU) (Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.*, 2013; Amata *et al.*, 2016; ElSayed *et al.*, 2018). En este estudio secuencias de Reunión y Mauricio fueron agrupadas en un clúster, en el cual los dos aislamientos REU que resultaron homólogos entre sí compartieron 99.41 y 99.61% de identidad con dos secuencias de Mauricio: AJ491264.1 y AJ491263.1, respectivamente. Sin embargo, dada la poca variabilidad genética y la cercanía geográfica de estas dos islas (Reunión y

Mauricio) lo más probable es que se trate del mismo genotipo REU. La mayor cantidad de secuencias que consideró este trabajo correspondieron al genotipo BRA del SCYLV, el cual es el más abundante según se observa en reportes previos (Wang *et al.*, 2012; Chinnaraja *et al.* 2013; Amata *et al.*, 2016).

En China el análisis filogenético de 141 secuencias procedentes de diversas partes de ese país y el mundo mostró que todos los aislados de SCYLV se agruparon en 8 genotipos, de los cuales 107 aislados de China se clasificaron en tres genotipos (BRA, HAW, CHN3), donde el genotipo BRA fue el más prevaleciente y fue detectado en todas las zonas muestreadas (102/107) (Lin *et al.*, 2015). En Mauricio, África, se identificó al SCYLV y se determinaron sus variantes genéticas. El genotipo REU se detectó en 10 variedades, mientras que otras 4 presentaron la variante genética BRA-PER. Fue detectada una infección mixta de los genotipos CUB y REU en la variedad Co6304, mientras que la Q88 estuvo coinfectada por genotipos BRA-PER y REU (Joomun y Dookun, 2010).

En estos trabajos se utilizaron oligonucleótidos específicos para discriminar entre variantes genéticas de los aislamientos del SCYLV; sin embargo, en este estudio no se utilizaron estos iniciadores para ese fin. Por lo anterior, hacen falta realizar estudios con los oligonucleótidos utilizados en los trabajos descritos anteriormente para determinar las variantes genéticas presentes en nuestro país, tomando en cuenta aislamientos provenientes de las regiones cañeras del sureste de México, que es en donde se concentra la zona cañera más importante. Los resultados de este estudio ayudan a comprender la distribución de este virus en cultivos de caña de azúcar y dan una primera aproximación del origen filogenético del SCYLV aislado de México.

Conclusiones

En los estados de Colima, Jalisco y Nayarit se detectó la presencia del SCYLV, agente causal del síndrome de la hoja amarilla en las principales zonas cañeras de varios municipios. Este virus se encuentra ampliamente distribuido en las zonas cañeras del Occidente de México, probablemente por la propagación por semilla estaca infectada y presencia de áfidos vectores. El análisis filogenético donde se incluyó el aislado mexicano indicó que el virus tiene un origen brasileño y corresponde al genotipo BRA ya que se agrupó con tres aislados de ese país, entre otros más de diversos orígenes geográficos. En futuros trabajos sobre el SCYLV en México se deben utilizar regiones nucleotídicas de mayor longitud o teniendo en cuenta que el genoma de este virus es relativamente pequeño (5 800 nucleótidos aproximadamente) se pueden emplear genomas completos para obtener más información de su variabilidad genética.

Literatura citada

- Abu, A. Y.; Royer, M.; Daugrois, J. H.; Costet, L.; Lett, J. M.; Victoria, J. I.; Girard, J. C. and Rott, P. 2006. Geographical distribution of four Sugarcane yellow leaf virus genotypes. *Plant Dis.* 90(9):1156-60.
- Aday, D. O. C.; O-Hechavarría, M. L. L.; Zardón, N. M. A.; Rodríguez, L. E.; Mesa, L. J. M.; Puchades, I. Y.; Delgado, P. J. y Díaz, M. F. R. 2014. Distribución del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar en Cuba. *Rev. Protec. Veg.* 29(3):177-184.

- Amata, R. L.; Fernandez, E.; Filloux, D.; Martin, D. P.; Rott, P. and Roumagnac, P. 2016. Prevalence of Sugarcane yellow leaf virus in sugarcane producing regions in Kenya revealed by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Plant Dis.* 100(2):260-268.
- Aucatoma, G. B.; Castillo, R. O.; Mendoza, J. M. y Garcés, F. O. 2015. Factores que afectan la calidad de la caña de azúcar. Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador-CINCAE. Carta informativa CINCAE. 17(1):1-8.
- Chinnaraja, C.; Viswanathan, R.; Karuppaiah, R.; Bagyalakshmi, K.; Malathi, P. and Parameswari, B. 2013. Complete genome characterization of Sugarcane yellow leaf virus from India: evidence for RNA recombination. *Eur. J. Plant Pathol.* 135(2):335-49.
- Edgar, R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.
- ElSayed, A. I.; Weig, A. and Komor, E. 2011. Molecular characterization of Hawaiian Sugarcane yellow leaf virus genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries. *Eur. J. Plant Pathol.* 129(3):399-412.
- ElSayed, A. I.; Boulila, M.; Odero, D. C. and Komor, E. 2018. Phylogenetic and recombination analysis of sorghum isolates of Sugarcane yellow leaf virus. *Plant Pathol.* 67(1):221-232.
- Engbrecht, J.; Brent, R. and Kaderbhai, M. A. 2001. Minipreps of plasmid DNA. *Current protocols in molecular biology.* 15:II:1.6:1.6.1-1.6.10.
- Figueredo, L.; Hernández, L. y Linares, B. 2004. Relación epidemiológica entre áfidos (Homoptera: Aphididae) y enfermedades virales en el cultivo caña de azúcar en los valles de los ríos Turbio y Yaracuy, Venezuela. *Caña de azúcar.* 22(01):5-19.
- Filippone, M. P.; Perera, M. F.; Salgado, M.; García, M. G.; Vellicce, G. R. y Castagnaro, A. P. 2010. Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones. *Rev. Ind. Agríc. Tucumán.* 87(2):01-11.
- Flores, C. S. 1997. Las enfermedades de la caña de azúcar en México. C. Gómez-Núñez (Ed). Córdoba, Veracruz, México. 285 p.
- Gao, S. J.; Lin, Y. H.; Pan, Y. B.; Damaj, M. B.; Wang, Q. N.; Mirkov, T. E. and Chen, R. K. 2012. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Sugarcane yellow leaf virus isolates from China. *Virus Genes.* 45(2):340-349.
- Girard, J. C.; Fernández, E.; Daugrois, J. H.; Roques, D.; Roumagnac, P. and Rott, P. 2012. Genetic diversity of Sugarcane yellow leaf virus in a sugarcane selection plot in Guadeloupe (FWI). *Inter. Sugar J.* 114:96-100.
- Gonçalves, M. C.; Pinto, L. R.; Souza, S. C. and Landell, M. G. A. 2012. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. *Functional Plant Sci. Biotechnol.* 6(2):108-116.
- Joomun, N. and Dookun, A. S. 2010. Occurrence of three genotypes of Sugarcane yellow leaf virus in variety collection in Mauritius. *Sugar Technol.* 12(3-4):312-316.
- Lehrer, A. T. and Komor, E. 2008. Carbon dioxide assimilation by virus-free sugarcane plants and by plants which were infected by Sugarcane yellow leaf virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73(6):147-153.
- Lehrer, A.; Yan, S. L.; Fontaniella, B.; El-Sayed, A. and Komor, E. 2010. Carbohydrate composition of sugarcane cultivars that are resistant or susceptible to Sugarcane yellow leaf virus. *J. General Plant Pathol.* 76(1):62-68.
- Lin, Y. H., Wu, X. B.; Liu, Y. H.; Xiao, S. H.; Zhou, G. H.; Chen, R. K.; Fu, H. Y. and Gao, S. J. 2015. Molecular detection, genetic diversity and distribution of Sugarcane yellow leaf virus genotypes in China. *Tropical Plant Pathol.* 40(3):200-207.

- Lockhart, B. E. and Cronjé, C. P. R. 2000. Yellow leaf syndrome. *In*: a guide to sugarcane diseases. Rott, P. R. A.; Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft and Sauntally, A. S. (Eds.). CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 291-295 pp.
- McCray, J. M.; Ezenwa, I. V.; Rice, R. W. and Lang, T. A. 2006. Sugarcane plant nutrient diagnosis. Florida Cooperative Extension Service Pub. SS-AGR-129. <http://edis.ifas.ufl.edu/sc075>.
- Moonan, F. and Mirkov, T. E. 2002. Analyses of the genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of Sugarcane yellow leaf virus: evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *J. Virol.* 76(3):1339-1348.
- Riley, S. P.; Woodman, M. E. and Stevenson, B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.* 00:4.2:4.2.1-4.2.25.
- Rott, P.; Mirkov, T. E.; Schenck, S. and Girard, J. C. 2008. Recent advances in research on Sugarcane yellow leaf virus, the causal agent of sugarcane yellow leaf. *Sugarcane International.* 26(3):18-22.
- Scagliusi, S. M.; Basu, S. K.; Gouvea, J. A. and Vega, J. 2009. Comparison of two diagnostic methods for evaluation of Sugarcane yellow leaf virus concentration in Brazilian sugarcane cultivars. *Functional Plant Sci. Biotechnol.* 3(1):26-30.
- Schenck, S.; Lehrer, A. T. and Wu, K. K. 2001. Yellow leaf syndrome. Hawaii Agriculture Research Center, Pathology Report 68.
- Tiwari, A. K.; Vishwakarma, S. K. and Rao, G. P. 2012. Increasing incidence of sugarcane grassy shoot disease in Uttar Pradesh, India and its impact on yield and quality of sugarcane. *Phytopathogenic Mollicutes.* 2(2):63-67.
- Vasconcelos, A. C. M.; Gonçalves, M. C.; Pinto, L. R.; Landell, M. G. A. and Perecin, D. 2009. Effects of Sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and root system development. *Functional Plant Sci. Biotechnol.* 3(1):31-35.
- Vega, J.; Scagliusi, S. M. and Ulian, E. C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a Luteovirus. *Plant Dis.* 81(1):21-26.
- Viswanathan, R.; Karuppaiah, R.; Malathi, P.; Kumar, V. G. and Chinnaraja, C. 2009. Diagnosis of Sugarcane yellow leaf virus in asymptomatic sugarcane by RT-PCR. *Sugar Technol.* 11(4):368-372.
- Wang, M. Q.; Xu, D. L.; Li, R. and Zhou, G. H. 2012. Genotype identification and genetic diversity of Sugarcane yellow leaf virus in China. *Plant Pathol.* 61:986-993.
- Xie, Y.; Wang, M.; Xu, D.; Li, R. and Zhou, G. 2009. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 162(1-2):64-68.