



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
DIRECCION DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN

PROGRAMA DE MAESTRÍA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN  
EN AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE

DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL VIRUS BACILIFORME DE LA  
CAÑA DE AZÚCAR(ScBV) EN ECUADOR

Por

CARMEN EMELIA MUÑOZ LOPEZ

Guayaquil, Ecuador  
2004





**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
DIRECCION DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL  
FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION.**

**PROGRAMA DE MAESTRIA EN EDUCACION E  
INVESTIGACION EN AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE.**

**Rectores:**

Dr. M.Sc. Carlos Cedeño Navarrete **U.G.**

Dr. Moisés Tagle Galárraga **ESPOL**

**Director Posgrado U.G.**

Econ. M.Sc. Washington Aguirre

**Decanos:**

Ing. José Cuenca Vargas **Facultad CCNN – U.G.**

M.Sc. Eduardo Rivadeneira Pazmiño **FIMCP- ESPOL**

**Director Maestría**

Dr. Wilson Pozo Guerrero

**Directora Académica**

Dra. Carmen Triviño Gilces

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del contenido de la presente obra en cualquier forma, sea electrónica o mecánica, sin el consentimiento previo del autor.

Blga. Carmen Muñoz López

Email: [carmulop74@yahoo.com](mailto:carmulop74@yahoo.com)

Maestría en Ciencias en Agricultura Tropical Sostenible

[www.fccnn@ug.edu.ec](http://www.fccnn@ug.edu.ec) Telf.: 042494270

**Guayaquil.- Ecuador**





**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL  
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN  
EN AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE**

**DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL VIRUS BACILIFORME (ScBV) DE  
CAÑA DE AZÚCAR EN ECUADOR**

**Por**

**CARMEN EMELIA MUÑOZ LÓPEZ**

Esta Tesis fue aceptada en su presente forma por el Comité Consejero y el Consejo Asesor del Programa de Educación e Investigación en Agricultura Tropical Sostenible de la Universidad de Guayaquil, como requisito parcial para optar al grado de:

**Magíster en Ciencias con énfasis en la Agricultura Tropical Sostenible**

**COMITÉ CONSEJERO**

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name of a member of the Advisory Committee.



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL  
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN

PROGRAMA DE MAESTRÍA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN  
EN AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE

DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL VIRUS BACILIFORME (ScBV) DE  
CAÑA DE AZÚCAR EN ECUADOR

Por

CARMEN EMELIA MUÑOZ LÓPEZ

Esta Tesis fue aceptada en su presente forma por el Comité Consejero y el Consejo Asesor del Programa de Educación e Investigación en Agricultura Tropical Sostenible de la Universidad de Guayaquil, como requisito parcial para optar al grado de:

**Magister en Ciencias con énfasis en la Agricultura Tropical Sostenible**

COMITÉ CONSEJERO

Freddy Garcés Obando (M.Sc)

CONSEJO ASESOR

Carmen Triviño Gilces (Ph.D)

Gilberto Páez Bogarín (Ph.D)

Wilson Pozo Guerrero (Ph.D. Candidate)

Guayaquil, Ecuador  
2004



## DEDICATORIA

A la memoria de mi madre, que fue mi fortaleza

A Jesús, mi hija, mi esposo, mi padre, mis hermanos y amigos, porque a través de ellos físicamente me alimente y por medio de Dios el creador avancé.

## AGRADECIMIENTO

Al programa de Maestría en Agricultura Tropical Sostenible y su coordinador el Dr. Wilson Pozo Guerrero por su fructífera labor en la formación y preparación de profesionales competitivos.

Al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar (CINCAE) por el apoyo para la realización de este trabajo.

Al Ing. Agr. M.Sc Freddy Garcés Obando, jefe del área de Fitopatología Director de Tesis a su asistencia y apoyo permanente y aún más por permitir que este trabajo pudiera concluir gracias.

A la PhD Viviane Boulo y Concepto Azul por su colaboración en los inicios de este proyecto.

Al M.Sc. César Bedoya por brindarme su asesoría en el proceso de redacción y corrección de este proyecto de investigación.

A la BlgA Carmen Valladares e Ing. Msc Alexandra Gómez por la ayuda incondicional que me brindaron.

Al Tlgo Giovanni Quiridumbay por su cooperación en todas las tareas de campo que fueron necesarias realizar.

A Reina Medina y Eloy Orellana compañeros y amigos, por que compartimos criterios y culminamos juntos este trabajo.

A mi amigo Thomas Carriel quién me ayudo a darle formato a este trabajo

A todas las personas que de forma directa e indirecta colaboraron para la culminación de la presente investigación.

## BIOGRAFÍA

Carmen Emelia Muñoz López nació en Portoviejo provincia de Manabí el 17 de Febrero de 1974 realizó sus estudios primarios en su ciudad natal, se graduó de Bachiller en el colegio de señoritas Dolores Sucre de la ciudad de Guayaquil.

Obtuvo su título de Bióloga en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil en el año 1998 a partir de esa fecha laboró en la industrial pesquera Santa Priscila en las áreas de microbiología y manejo de policultivo de tilapia y camarón en la cual laboró por un lapso de dos años.

Luego prestó sus servicios en la empresa Concepto Azul dedicada a la investigación de la biología molecular en el área de diagnóstico de enfermedades de camarón, después se desempeñó en la línea de investigación de enfermedades de plantas.

Realizó su tesis de maestría en el Centro de Investigación de la Caña de azúcar (CINCAE) por espacio de año y medio colaboró con dicha institución en el área de fitopatología en trabajos publicados en los principales congresos de caña de azúcar del mundo. En el área de química del mismo centro realizó un proyecto de obtención de abonos orgánicos y aislamiento de microorganismos a partir de residuos de la caña de azúcar.

Defendió su tesis de grado en Noviembre del 2004

Actualmente se encuentra en el desarrollo un proyecto de elaboración de productos orgánicos para el área agrícola y acuícola.

e-mail: [carmulop74@yahoo.com](mailto:carmulop74@yahoo.com).

## ÍNDICE

| <u>CONTENIDO</u>   | <u>PÁGINA</u> |
|--|---------------|
| Portada  | i             |
| Dedicatoria  | ii            |
| Agradecimiento   | iii           |
| Biografía  | iv            |
| Índice   | v             |
| Resumen  | viii          |
| Summary  | ix            |
| Lista de cuadros   | x             |
| Lista de figuras   | x             |
| Tema   |               |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 1             |
| 1.1. Objetivos   | 2             |
| 1.1.2. Objetivos general   | 2             |
| 1.1.3. Objetivos específicos   | 2             |
| 1.2. Hipótesis   | 2             |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA  | 4             |
| 2.1. Origen y distribución   | 4             |
| 2.2. Síntomas  | 4             |
| 2.3. Características del agente causal   | 5             |
| 2.4. Transmisión   | 6             |
| 2.5. Efecto en la producción en caña de azúcar                                   | 6             |
| 2.6. Infección y síntesis viral  | 7             |
| 2.7. Asociación con otros virus  | 7             |
| 2.8. Eliminación del virus por cultivo de tejidos                                | 8             |
| 2.9. Métodos de diagnóstico  | 8             |
| 2.10. Diagnóstico molecular por PCR  | 10            |
| 2.11. Diagnóstico del virus baciliforme en bancos de germoplasma<br>(cuarentena) | 11            |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS  | 13            |
| 3.1. Localización  | 13            |
| 3.2. Materiales y Equipos  | 13            |

|  |    |
|--|----|
| 3.3. Unidad experimental   | 13 |
| 3.3.1. Control Positivo  | 14 |
| 3.4. Optimización de las metodologías para el diagnóstico molecular  | 15 |
| 3.4.1. Protocolos de extracción de ADN total   | 15 |
| 3.4.2. Selección de iniciadores  | 15 |
| 3.4.3. Protocolos de ampliación de PCR inicial   | 16 |
| 3.4.4. Preparación del premix de PCR   | 16 |
| 3.4.5. Análisis electroforético  | 16 |
| 3.4.6. Análisis estadístico  | 18 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN  | 19 |
| 4.1. Establecimiento y optimización de protocolos de extracción de ADN para caña de azúcar   | 19 |
| 4.1.1. Elección del Protocolo de extracción de ADN   | 19 |
| 4.1.2. Protocolo de extracción de ADN establecido  | 21 |
| 4.1.3. Análisis de varianza protocolos de extracción de ADN evaluados  | 23 |
| 4.2. Establecimiento y optimización de la PCR y Nested-PCR para la detección del virus baciliforme de la caña de azúcar ScBV.  | 23 |
| 4.2.1. Optimización de la PCR  | 26 |
| 4.2.2. Establecimiento de la Nested-PCR  | 28 |
| 4.2.3. Validación de la técnica de PCR   | 28 |
| 4.3. Diagnóstico y detección del ScBV en variedades de cuarentena cerrada, colección universal CINCAE, Vitro plantas para semilleros fundación y semilleros de Ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal. | 29 |
| 4.3.1. Diagnóstico en Cuarentena Cerrada   | 29 |
| 4.3.2. Diagnóstico en Lotes comerciales de los Ingenios San Carlos y Valdez  | 31 |
| 4.3.3. Diagnóstico de 15 variedades de la colección Universal del CINCAE   | 31 |
| 4.3.4. Diagnóstico en semilleros   | 33 |
| 4.3.5. Diagnóstico en Vitro plantas  | 35 |
| 4.3.6. Diagnóstico en variedades inoculadas con mosaico ScMV (B74-132)   | 35 |
| 4.3.7. Diagnóstico del virus del rayado del banano BSV   | 35 |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 38 |
| 5.1. Conclusiones                 | 38 |
| 5.2. Recomendaciones              | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA.                     | 39 |
| ANEXOS                            | 45 |

## RESUMEN

El ScBV está ampliamente distribuido en el mundo, en la mayoría de las regiones geográficas productoras de caña de azúcar; sin embargo, aún existen pocos datos epidemiológicos de este patógeno en Ecuador y se sospecha que se encuentra en la zona de cultivo. Por otro lado, se cuenta con un proceso cuarentenario y un sistema de limpieza, mediante de cultivo de meristemos, en los cuales es importante contar con técnicas de diagnóstico rápidas, específicas y sensibles, como la PCR.

Inicialmente se estableció la metodología de extracción de ADN total, y luego la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, PCR. Se probaron dos parejas de primers (iniciadores) conocidos y luego con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la reacción debido a que el virus baciliforme (ScBV) suele presentarse en ausencia de síntomas y en concentraciones muy bajas se diseñaron primers internos ScBVif5 y ScBVir5. Para la detección del ScBV se evaluaron muestras provenientes de cuarentena, colección universal, cultivo de meristemos y lotes comerciales de los ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal. Al comparar la PCR con la Nested PCR se incrementó la sensibilidad, detectándose un 16 por ciento más de muestras positivas, provenientes de cuarentena cerrada.

La presencia del virus baciliforme de la caña de Azúcar ScBV en Ecuador fue confirmada en 22 variedades de las 108 analizadas de la cuarentena del CINCAE, en cuarentena cerrada, entre ellas cuatro *Saccharum officinarum*, De las muestras analizadas en los ingenios San Carlos y Valdez fue detectada la presencia del ScBV en las variedades comerciales Ragnar y B7678. Además en las variedades NCo310 y POJ60-16 de la colección universal del CINCAE.

## SUMMARY

The Sugarcane Bacilliform Virus (SCBV) is widely distributed in many geographic regions of sugarcane production around the World. SCBV symptoms are not useful for diagnosis. The SCBV presence in Ecuador is suspected. In order to reduce the risk of introducing new diseases or strains of pathogens into the Ecuadorian sugarcane area, the development of more sensible and reliable molecular diagnosis techniques and the use of prophylactic actions as meristem tissue culture in closed quarantine is a priority.

After studied different DNA extraction methods, two Polymerase chain reaction PCR techniques were established for SCBV diagnosis, the simple and Nested-PCR. A simple PCR protocol published was tested and based on SCBV sequence analysis, two new primers ScBVif5 and ScBVir5 were designed to use in the Nested-PCR. Tissue visible dewlap leaf samples, from close quarantine varieties, sugarcane germoplasm collection, meristem tissue culture and sugarcane fields, were evaluated.

The SCBV presence in Quarantine and sugarcane commercial fields of Ecuador was confirmed. Twenty two quarantine varieties of 108 tested positive to the SCBV infection by simple PCR and Nested-PCR. In San Carlos and Valdez mills, the SCBV was detected in Ragnar and B76-78 varieties. One sample of ECSP98-127 from tissue culture and two samples from the sugarcane germoplasma collection showed the SCBV presence. Nested-PCR showed 16% more positive samples than the simple-PCR.

## LISTA DE CUADROS

|          | <u>CONTENIDO</u>  | <u>PÁGINA</u> |
|----------|---|---------------|
| Cuadro 1 | Primers para la detección del ScBV  | 16            |
| Cuadro 2 | Protocolo de amplificación del ScBV   | 16            |
| Cuadro 3 | Cantidad de reactivos para PCR  | 17            |
| Cuadro 4 | Protocolo de amplificación de ADN, CINCAE   | 25            |
| Cuadro 5 | Primers diseñados Nested PCR  | 27            |
| Cuadro 6 | Relación de las muestras evaluadas en la prueba de sensibilidad                     | 28            |
| Cuadro 7 | Distribución del ScBV en variedades de cuarentena cerrada por origen de importación | 30            |
| Cuadro 8 | Variedades evaluadas en lotes comerciales de los Ingenios San Carlos y Valdez       | 32            |
| Cuadro 9 | Diagnostico en Semilleros de los Ingenios La troncal                                | 35            |

## LISTA DE FIGURAS

|           | <u>CONTENIDO</u>  | <u>PÁGINA</u> |
|-----------|---|---------------|
| Figura 1  | ADN extraído por el método de extracción  | 19            |
| Figura 2  | ADN extraído por el método de extracción Doyle & Doyle  | 20            |
| Figura 3  | ADN extraído por el método de extracción Jhingan  | 20            |
| Figura 4  | ADN extraído por la combinación de protocolo de extracción de Doyle & Doyle   | 21            |
| Figura 5  | Maceración del tejido con nitrógeno líquido   | 22            |
| Figura 6  | Separación de fases con cloroformo isoamyl alcohol  | 23            |
| Figura 7  | Precipitación de ADN en isopropanol a -20 °C  | 23            |
| Figura 8  | Aumento de sensibilidad en la nested PCR con un patrón MPM  | 29            |
| Figura 9  | Pozo 2 variedades 1995:R55-PO4 muestra positiva pozo 23, 26 (1995: R45-P78) usadas como control positivo  | 30            |
| Figura 10 | Variedades de cuarentena cerrada positivas para el virus baciliforme ScBV pozo 9 var PR 1152, pozo 19 positivo leve var HM661, pozo 28 var SS66-001 | 30            |
| Figura 11 | Incidencia del virus baciliforme ScBV en cuarentena cerrada   | 31            |
| Figura 12 | Análisis de PCR (14 variedades) de la colección universal del CINCAE muestras positivas en pozo 6 variedades POJ 3016 y pozo 7 variedad NCO310      | 33            |

|           | <u>CONTENIDO</u>   | <u>PÁGINA</u> |
|-----------|--|---------------|
| Figura 13 | Diagnostico del virus ScBV en semilleros básicos y comerciales del ingenio Valdez pozo 12 variedad positiva Ragnar | 34            |
| Figura 14 | Análisis simple y Nested PCR de las variedades de cuarentena cerrada (vitroplantas)                                | 36            |
| Figura 15 | Diagnóstico de BSV Banana Streak Virus con primers para ScBV   | 37            |

#### LISTA DE ANEXOS

|          | <u>CONTENIDO</u>  | <u>PÁGINA</u> |
|----------|---|---------------|
| Anexo 1  | Esquema de la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)                     |               |
| Anexo 2  | Variedades de Cuarentena cerrada evaluadas para el diagnóstico del ScBV por PCR         |               |
| Anexo 3  | 14 variedades de la colección universal del Cincae analizadas por PCR para el ScBV      |               |
| Anexo 4  | Variedades de cultivo de tejidos analizadas por PCR                                     |               |
| Anexo 5  | Extracción de ADN por el método de Dellaporta <i>etal</i> (1983), modificado            |               |
| Anexo 6  | Protocolo de Extracción de ADN para caña de azúcar libre de polisacáridos y polifenoles |               |
| Anexo 7  | extracción de ADN de caña de azúcar<br>Ref: Jhingan (1992) y Dellaporta(1983)           |               |
| Anexo 8  | Modelo matemático y ANDEVA de las metodologías probadas en la extracción de ADN         |               |
| Anexo 9  | Esquema de primer dímeros (A) y hairpin (B y C)   |               |
| Anexo 10 | Ubicación de los primers para la detección del ScBV en el genoma del virus              |               |

## 1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar en Ecuador, es un rubro muy importante en el sustento diario de miles de familias desde los puntos de vista económico y social debido a que, en época de zafra, en los seis principales ingenios azucareros nacionales, laboran 30.000 personas directa y 80.000 indirectamente, lo que representa el 9 por ciento de la población económicamente activa del sector agropecuario, y el 12 por ciento del PIB (producto interno bruto) agrícola SICA (2004). En el contexto actual de competitividad de mercados, es imprescindible reforzar los programas de prevención y control de enfermedades, así como los de selección de variedades resistentes, y el estudio de enfermedades potenciales causadas por patógenos emergentes como el virus baciliforme de la caña de azúcar.

En nuestro país, el área destinada al cultivo de la caña de azúcar está sembrada de manera intensiva prácticamente con la variedad Ragnar, ocupando aproximadamente el 80 por ciento del cultivo. Esta variedad es tolerante a la mayoría de las principales enfermedades presentes en Ecuador, y se desconoce el efecto de otros patógenos potenciales como es el fleca o rayado de la hoja (leaf fleck) causado por el virus baciliforme de la caña de azúcar.

En la actualidad se conoce que el virus baciliforme, está presente en cañas nobles y ciertos híbridos comerciales en bancos de germoplasmas y procesos cuarentenarios, este virus se ha detectado en países vecinos como Perú, Colombia y se sospecha que pueda estar distribuido comercialmente en Ecuador.

El Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar, gracias al apoyo de sus auspiciantes los Ingenios Azucareros San Carlos, Valdez y La Troncal, ha establecido un proceso cuarentenario de regulación y detección temprana de patógenos en variedades introducidas, durante el intercambio de germoplasma con otros países. Técnicas como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) han comprobado ser muy sensibles para el diagnóstico temprano de enfermedades que no pueden ser detectadas con síntomas visuales aparentes y cuando presentan títulos o concentraciones virales muy bajas, como es el caso del virus Baciliforme de la caña de azúcar (ScBV).

Por otro lado. Para tener un conocimiento de la distribución del virus, en los semilleros de los ingenios y en algunos canteros comerciales, fue necesario establecer una técnica de diagnóstico del virus lo que servirá más adelante para el control fitosanitario en el intercambio de germoplasma de caña de azúcar y para la certificación de semilleros fundación, provenientes de cultivo de meristemos, con la finalidad de realizar un manejo preventivo de la enfermedad.

## **1.1. Objetivos:**

### **1.1.1. General:**

- Contribuir al manejo preventivo de enfermedades de la caña de azúcar en Ecuador, mediante el establecimiento de técnicas de biología molecular para la detección temprana de patógenos sistémicos.

### **1.1.2 Especifico:**

- Establecer y optimizar protocolos de extracción de ADN para caña de azúcar.
- Establecer y optimizar la técnica de PCR y Nested-PCR, para la detección del Virus Baciliforme de la caña de azúcar SCBV.
- Determinar la presencia del ScBV en variedades de cuarentena cerrada, en la colección universal del CINCAE en *in vitro-plantas* para semilleros fundación y semilleros de los ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal.

## **1.2 Hipótesis**

- Existe alta distribución del ScBV en las principales variedades de caña de azúcar en Ecuador.

- El proceso cuarentenario (cuarentena cerrada) evita el escape de material asintomático infectado con el virus.
- El ScBV fue previamente introducido al país en semilla importada (variedades de La colección universal –banco de germoplasma).

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Origen y distribución

El virus Baciliforme de la caña de azúcar ScBV (sugarcane Bacilliform virus) fue registrado por primera vez por Rodríguez-Lema (1985) cuando descubrieron partículas baciliformes asociadas con el virus del mosaico de la caña (ScMV) durante ensayos de microscopía electrónica.

Según Lockhart y Autrey (1988) el ScBV, está ampliamente distribuido en todas las regiones geográficas donde se cultiva esta gramínea, infectando a las cañas nobles *Saccharum officinarum* y cultivares comerciales *Saccharum* sp, híbridos inter específicos.

Es posible que el virus se presento en el centro de origen de la caña de azúcar en Nueva Guinea y se diseminó por movimiento de germoplasma de las cañas nobles y posteriormente por medio de vectores (Viswanathan, 1996)

De acuerdo con Autrey *et al.* (1992) se encuentra registrado en los países de Australia, Madagascar, Madeira, Malawi, Mauricio, Marruecos, Nueva Guinea, Reunión, Sur África, Taiwán, EE. UU y en cuarentena en clones sembrados en Argentina, Barbados, Brasil y Puerto Rico.

En Ecuador el ScBV fue detectado en muestreos realizados por Lockhart y Garcés (Cinca, 2000), en plantas asintomáticas, mediante una prueba serológica y de microscopía electrónica se reveló la presencia de este virus en las variedades : Azul Casa grande, Ragnar, B76-78 y B74-132.

### 2.2. Síntomas

Según Braithwaite (1995) los síntomas de infección son variables, entre ellas manchas en las hojas, pronunciado blanqueamiento o rayado clorótico, también puede estar ausente como sucede con las cañas nobles; en híbridos comerciales los síntomas son generalmente poco severos.

Los síntomas en *Saccharum officinarum* varían desde asintomáticas a rayado clorótico blanquecino pronunciado, el síntoma más común son las pecas amarillas o blancas en las hojas (Parmessur, 2001).

### 2.3. Características del agente causal

El Sugarcane bacilliform virus (ScBV) es un miembro del género Badnavirus, familia pararetroviridae, caracterizado por ser un virus que contiene doble cadena de ADN que se replican por la vía de la transcriptasa reversa (Liang *et al.*, 1995; Lockhart *et al.*, 1995). Es una partícula no envuelta de tipo baciliforme con un promedio de 30 x 120 a 150 nm, de 7.5 Kb, el genoma está interrumpido por dos sitios específicos discontinuos, conteniendo tres marcos de lectura abierta "open readings" (ORF, I, II, III) que codifican tres proteínas de 22, 13 y 215 kb, respectivamente (Lockhart *et al.*, 1988; Brunt *et al.*, 2000). Las proteínas de la cápside pueden tener un peso molecular entre 37 a 39 Kb (Lockhart, 1988; Lockhart *et al.*, 2000).

Estudios serológicos indican que el BSV está cercanamente relacionado con el virus baciliforme de la caña (ScBV) (Reichel *et al.*, 1996; Viswanathan *et al.*, 1996; Lockhart y Autrey, 1988). La ocurrencia de estos virus en variedades mejoradas ha constituido un freno para el movimiento del germoplasma (Crouch *et al.*, 1998; Lockhart y Autrey, 1999).

El virus del rayado del banano (BSV) es el virus más comúnmente encontrado en especies de *Musa*, está probablemente presente en todas las áreas de cultivo de banano y plátano a través del mundo. Algunos aislados del BSV causan daños graves y conducen a la pérdida del cultivo.

De acuerdo al Genbank (2004) el grupo de los badnavirus contiene 15 miembros: Banana Streak Virus (BSV), Cacao Swollen Shoot Virus (CSSV), Citrus Yellow Mosaic Virus (CYMV), Commelina Yellow Mottle Virus (CYMV), Dioscorea Alata Bacilliform Virus (DABV), Gooseberry Vein Banding Associated Virus (VBAV), Spizaea Yellow Leaf Spot Virus (SYLV), Bougainvillea spectabilis chlorotic vein-banding virus, Kalanchoe top-spotting virus, Piper yellow mottle virus, Rubus yellow

net virus, Stilbocarpa mosaic bacilliform virus, Taro Bacilliform virus, Yuca Bacilliform virus y Sugarcane Bacilliform Virus (ScBV).

Un primer aislado infeccioso de ScBV, ha sido clonado y secuenciado por completo de acuerdo con Bouhida, *et al* (1993); luego, un segundo aislado de ScBV ha sido totalmente secuenciado y comparado con la secuencia anteriormente descrita (Geijskes *et al*, 2000). Comparaciones de estas secuencias, además de otras informaciones relacionadas con secuencias de ScBV y Badnavirus, han permitido identificar regiones altamente conservadas, con hasta 100% de homología; Algunas de estas regiones son utilizadas para desarrollar primers de PCR (Geijskes *et al*, 2000).

Finalmente, el conocimiento a nivel molecular y genético del ScBV es esencial para el desarrollo exitoso de estrategias de detección y control del virus.

#### **2.4. Transmisión**

El virus es transmitido por propagación vegetativa y por la acción vectora de la cochinilla rosada, *Saccharicoccus sacchari* y cochinilla gris, *Dysmicoccus boninsis* (Lockhart y Autrey, 1991; Lockhart *et al.*, 1992).

El BSV (Banana Streak Virus) asociado serológica y molecularmente con el ScBV fue transmitido de manera experimental por inoculación mecánica a caña de azúcar, arroz *Oryza sativa*, al banano *Musa sp.* AAA (Cavendish Enano) y al sorgo *Sorghum vulgar* (Lockhart y Autrey, 1999).

#### **2.5. Efectos en la producción en Caña de Azúcar**

Los efectos del ScBV en la producción de caña de azúcar, no están claramente determinados, sin embargo, evidencias circunstanciales sugieren que el ScBV contribuye a disminuir la productividad, como sucedió con el clon Mex 57-473 en Marruecos (Lockhart y Autrey, 1998).

Según, Comstock y Lockhart (1996) en un estudio realizado en campo sobre los efectos del ScBV en la producción de biomasa de caña de azúcar, obtuvieron resultados

conflictivos, en tres cultivares, las cuales fueron inoculadas con el virus (CP63-588, CL61-620 y CP65-537) usando como vector la cochinilla rosada, *Saccharicoccus sacchari* y el cultivar Raratonga como fuente de inóculo.

Los mismos autores, indican que la producción de Biomasa en el cultivar CP63-588 fue disminuida en un 22-31%, incrementada en CL61-620 mientras que se obtuvieron resultados variables con CP65-357 y el título viral fue alto en CP63-588 y CP65-357 y bajo en CL61-620.

No se puede explicar con certeza la variación observada entre los tres cultivares, sin embargo se puede atribuir a la variación de la cepa, infecciones mixtas preferencia y eficiencia del vector y efectos ambientales, los que pueden tener influencia del efecto del ScBV en caña de azúcar. (Comstock y Lockhart, 1996)

La interacción de la cochinilla del ScBV con otros virus, induzca a una mayor susceptibilidad de la caña de azúcar a factores de stress, dando como resultado la clorosis y la formación de plantas enfermas y de menor vigor (Irey et al., 1998). La infección mixta del ScBV con el virus del mosaico (ScMV) existe un aumento en el número de partículas del ScBV, que se observan en las células (Lockhart y Autrey, 1998).

#### Interacción y patógeno viral

La infección por el ScBV provoca infección en las células de las hojas se distribuye en el citoplasma, alterando la estructura interior de las mitocondrias reforzando la cantidad de proteínas y causando a la formación de inclusiones filamentosas en el núcleo. (Comstock y Autrey, 2001).

Después de que se ha producido la infección de la planta hospedante, el virus se mueve al núcleo de la célula donde parece súper enrollarse y forma un complejo, este último se duplica parcialmente y también es transcrito en dos formas, el RNA más grande es transportado al citoplasma, donde se replican y se modificadas por el virus (Agrios, 1996).

El mismo autor menciona que el RNA de mayor tamaño también se transporta al mismo punto en el citoplasma, pero ahí se utiliza como molde para que, por medio del proceso de transcripción inversa, se transforme en un DNAdS completo del virión, que rápidamente se encapsula por sub-unidades proteínicas para formar viriones completos (Agrios, 1996).

### 2.7. Asociación con otros virus.

Los Badnavirus, se caracterizan por estar asociados frecuentemente a infecciones mixtas con otros virus, es probable que exista una interacción sinérgica entre el ScBV y el virus del mosaico de la caña de azúcar (ScMV) en plantas de caña de azúcar (Lockhart y Autrey, 1999).

La asociación entre el virus del mosaico de la caña (ScMV) el virus baciliforme (ScBV) ha complicado la purificación del ScBV, además de encontrarse muy pocas partículas por campo de visualización al microscopio electrónico, amplia variabilidad con las condiciones ambientales, alta sensibilidad al proceso de purificación y estar restringido a los tejidos del floema (Rodríguez *et al.*, 1987; Lockhart *et al.*, 1995).

El ScBV, lo reportan asociado con el virus del mosaico suave (ScMV) del género Cuscutavirus, en Mauricio la infección mixta ha provocado un crecimiento lento (Lockhart *et al.*, 1992).

### 2.8. Eliminación del virus por cultivo de tejidos.

Cualquier programa moderno de eliminación de virus requiere el conocimiento del virus y su comportamiento dentro de la planta. Para identificación de virus se ha utilizado técnicas serológicas y de microscopía inmunoelectrónica, actualmente se utilizan técnicas más sofisticadas como técnicas moleculares por su mayor sensibilidad. Hadidi, (1988).

La multiplicación de meristemas *in vitro* permite, además de la destrucción por quimioterapia de los patógenos, una rápida multiplicación del material. El desarrollo de una metodología para el cultivo de caña de azúcar *in vitro*, surgió como respuesta a la

necesidad de erradicar enfermedades de tipo sistémico, y para mantener y multiplicar materiales de escasa disponibilidad. Dávila, 1995)

En Mauricio el ScBV se utilizó un agente antiviral como es la Rivarina a una concentración de 10- 30 mg/l<sup>1</sup> desde el meristemo apical, en siete variedades de cañas nobles en cultivo de callos. Este compuesto ejerce su efecto en el ADN y ARN de virus en plantas, en este caso para el ScBV y el ScYLV respectivamente. Sin embargo el ScBV no pudo ser eliminado con las técnicas tradicionales de tratamiento térmico, cultivo de tejidos y con el agente antiviral utilizado (Parmessur y Sauntally, 2004).

### 2.9. Métodos de diagnóstico

Hasta hace poco años el método de diagnóstico más utilizado para el diagnóstico de enfermedades era la microscopía electrónica (IEM) sin embargo este es lento, tedioso y carece de la sensibilidad suficiente para detectar virus en plantas con bajo título viral. (Viswanathan *et al.*, 1996)

El diagnóstico por sintomatología no es confiable porque los síntomas de infección son variables o ausentes, tampoco es seguro el uso de plantas indicadoras porque es difícil transmitir el virus mecánicamente (Braithwaite, 1995).

Trabajos realizados en Mauricio registran que el método de ELISA (enzyme -linked immunosorbent assay) fue un método de diagnóstico poco confiable para la detección de ScBV excepto en muestras altamente infectadas como cañas nobles. Sin embargo se obtuvieron mejores resultados cuando se utilizó un antisuero específico para ScBV (Braithwaite *et al.*, 1995).

Una rápida, confiable y sensible metodología de diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la que fue requerida para la detección del ScBV de germoplasma en cuarentena y determinar la distribución de este patógeno en variedades comerciales en Mauricio (Braithwaite, 1995).

## 2.10. Diagnóstico molecular por PCR

Hasta la década de 1980, el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de DNA era clonándolo en vectores adecuados e introduciéndolo y multiplicándolo en bacterias. En el año 1986, el investigador norteamericano, K. Mullis desarrolló un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, obtener millones de copias de DNA *in vitro*, en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas. Esta técnica llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Estas secuencias para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos de DNA complementarios a una porción de cada una de las dos cadenas de la doble hélice (Curtis, 2001).

La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termo estable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos Trifosfato – dATP, dGTP, dCTp, y dTTP.

1. La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95 °C, se separan las dos cadenas del DNA molde.

2. Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

3. Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72°C, temperatura a la cual la DNA polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3 de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta el doble

4. Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72°C, temperatura a lo cual la DNA polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3 de los

cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

5. Entre muchas aplicaciones que la PCR pone a disposición se encuentran la detección prenatal de enfermedades genéticas, la detección de infecciones virales latentes y la producción de grandes cantidades de fragmentos de DNA humano a una velocidad muy superior a lo posible mediante otros métodos (Curtis, 2001).

Se puede conseguir aún mayor sensibilidad con la nested PCR, que consiste en utilizar una alícuota del producto de una PCR como molde para una segunda PCR, empleando primers internos. Además de una mayor sensibilidad (entorno a 100 veces más) se consigue mayor Especificidad, puesto que son cuatro los primers empleados a lo largo del proceso de Amplificación (McPherson, 2000).

El principal inconveniente de la nested PCR viene dado precisamente por su elevada sensibilidad. Productos de la 1ª amplificación pueden introducirse inadvertidamente (contaminar) en la 2ª reacción y ser amplificados, generándose resultados de falsos positivos. Cuando se utiliza esta técnica hay que ser muy estricto en tomar precauciones que eviten los resultados falsos positivos (McPherson, 2000).

En la práctica, la amplificación ocurre en un microtubo en el cual se colocan los reactivos necesarios para la reacción; el protocolo se descompone en tres etapas sucesivas, realizadas bajo condiciones térmicas diferentes y automatizadas, mediante el uso de un termociclador. La repetición de varios ciclos "desnaturalización-hibridación-anclaje" (20 a 40 ciclos) conduce a una acumulación exponencial del fragmento de ADN; (anexo 1). Luego, se realiza una electroforesis que permite separar las moléculas de ADN de acuerdo a su peso molecular y visualizarlas en un gel de electroforesis (Boulo, 2002).

#### **2.1.4. Diagnóstico del virus baciliforme en bancos de germoplasma y cuarentena**

Prasadithan (1996) menciona que el virus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) fue detectado usando microscopía electrónica y ELISA; en la colección universal del banco de germoplasma en Cannanore, India, mostrando síntomas foliares, acortamiento de

entrenados y escaso crecimiento. Se evaluaron Genotipos de *S. officinarum* que fueron fuertemente infectados por el virus.

El mismo autor menciona, que la presencia de este virus en el banco de germoplasma de India y otros países es el mayor obstáculo para el movimiento de germoplasma, es por esta razón que se necesita un método como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de material infectado.

El virus fue detectado en Australia en cañas comerciales *Erianthus* spp. Y otras especies de *Saccharum*, mediante PCR, se usaron los primers ScBVF5 y ScBVR5, que fueron seleccionados a partir de secuencias publicadas por Bouhida *et al.* (1993). Resultando un método sensible y específico que se está utilizando para examinar germoplasma en cuarentena y para la distribución de este virus en el campo (Braithwaite, 1995).

Investigaciones básicas de enfermedades de plantas y en particular de enfermedades en cuarentena han beneficiado los avances en la biotecnología en los últimos 10 años. En el instituto BSES, Brisbane Australia, fueron monitoreadas plantas de cuarentena con técnicas rutinarias para el diagnóstico de enfermedades como ScBV: ELISA, RT-PCR y PCR, esta última técnica de diagnóstico se basó en la desarrollada por Braithwaite (1995).

En Colombia, el ScBV ha sido detectado por PCR, en variedades de colección universal, mediante el uso de los primers SCBVF5 y SCBVR5 publicados por Braithwaite (1995) el virus fue detectado en las variedades PR10-13, NG28-055 y Akoki. Evaluadas con la técnica de PCR, se logró la amplificación del fragmento de 221 pb que corresponde a una porción del genoma del ScBV, indicando la presencia del virus. Este mismo fragmento fue detectado en muestras de banano infectadas y en muestras de banano supuestamente sanas. (Sánchez *et al.*, 1997).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE) ubicado en el Km. 49.5 vía Duran – Tambo, cantón El Triunfo, provincia del Guayas.

Está localizada geográficamente a 02° 19' 33" de latitud sur y 79° 26' 83" de longitud oeste a una altitud de 60 msnm, pertenece a la formación ecológica de Bosque Seco tropical con una temperatura media anual de 25°C, precipitación 1400 mm/año y humedad relativa de 81 por ciento.

#### 3.2. Materiales y Equipos

**Equipos:** Micro centrifugadora, cubetas de electroforesis, termociclador, transiluminador, micropipetas y baño María.

#### 3.3. Unidad experimental

##### Material biológico

De acuerdo con Sánchez *et al* (1997) la muestra tomada para realizar el diagnóstico fue la hoja TVD (Primera hoja con ligula visible), para el caso de caña de azúcar y la primera hoja funcional para banano, ya que en trabajos previos indican estos autores que estas partes foliares, mantiene el título viral mas alto que el resto de la planta. Las muestras de hojas se colectan previamente se desinfecta con alcohol. El material y luego se transporta en hielo la edad, corte difieren de la localidad muestreada.

Para determinar la presencia y distribución de ScBV en Ecuador principalmente en el cultivo de la caña de azúcar, para lo cual se evaluó el 100 % del material de cuarentena cerrada del CINCAE (108 variedades) y mediante un muestreo al azar para los materiales provenientes de la colección universal, clones promisorios y cultivo de tejidos del CINCAE, canteros, semilleros básicos y comerciales de los ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal.

Las edades de las plantas variaron según la localidad y variedades a muestrearse como se indica a continuación.

Variedades cuarentena cerrada (estación Bullcay – Cuenca) de 8 meses de edad (plantilla), (Ver Anexo 2), colección universal (CINCAE) de 3 meses (soca). (Anexo 3) y Vitroplantas 2 a 12 plantas por variedad MSI (Anexo 4).

Semilleros básicos y comerciales: en semilleros básicos 20 hojas por cada 3 hectáreas (10 hojas por muestra) en semilleros comerciales 20 hojas por cada 5 has la edad del cantero entre 6-7 meses.

### **3.3.1 Control positivo**

En un principio se utilizó como control positivo hojas liofilizadas de caña de azúcar cedidas por Lockhart (2002). El cual perdió sensibilidad por esta razón, se seleccionó material vegetativo de hojas de muestras de banano infectadas con el BSV de la hacienda PAE, y a partir de variedades reportadas susceptible al virus colectadas en la colección universal del CINCAE, muestras de la variedad B74132 inoculada con el virus del mosaico ScMV y variedades de la cuarentena cerrada. *S officinarum Sacharum* sp (Bullcay–Cuenca).de las cuales se seleccionaron dos variedades de cuarentena cerrada para controles positivos estas fueron: PR1152 y 1995:R45-P78

### **3.4. Optimización de las metodologías para el diagnóstico molecular**

#### **3.4.1. Protocolos de extracción de ADN total**

De la literatura se seleccionaron diferentes protocolos de extracción de ADN para la caña de azúcar, con los cuales se planteó un primer ensayo evaluando la calidad y cantidad de ADN estos fueron:

1. Dellaporta (1983). es un protocolo que ha sido utilizado con bastante regularidad en la extracción de ADN utiliza mercaptoetanol como antioxidante protocolo completo descrito en anexo 5.
2. Doyle & Doyle modificado (1990) es un protocolo que ha sido utilizado en la extracción de ADN de caña de azúcar que tiene como particularidad principal liberar polisacáridos y polifenoles utiliza sulfito de sodio y PVP (polyvinil pyrrolidone) como antioxidantes (Protocolo completo descrito en anexo 6)
3. Morillo (1999) modificado de Jhingan (1992) y Dellaporta. Este protocolo ha sido probado en extracción de ADN para caña de azúcar en Ecuador a diferencia de los anteriores utiliza en su buffer de extracción sorbitol y mercaptoetanol como agente antioxidante (protocolo completo descrito en anexo 7).
4. Combinación de protocolos (2 y 3). Se Hizo una combinación de los protocolos antes descritos con la finalidad de determinar el mejor tratamiento mediante ensayos para la optimización del protocolo de extracción de ADN.

#### **3.4.2. Selección de iniciadores**

Los primers fueron seleccionados de acuerdo con Braithwaite (1995) ScBVF5 y ScBVR5, encontrados por alineamiento de regiones que codifican para secuencias de aminoácidos conservados a partir de una región codificante de la reversa transcriptasa; el tamaño del amplicón esperado es de 221 pb (pares de bases).

**Cuadro 1. Primers para la detección del ScBV. Braithwaite (1995)**

| Primers | Posición | Secuencia                         | Región amplificada    | Tamaño |
|---------|----------|-----------------------------------|-----------------------|--------|
| ScBVF5  | 5,589    | 5-TCA AAG TTT GAT TTG AAG AGC GGG | Reversa transcriptasa | 221 bp |
| ScBVR5  | 5,810    | 5-CTC CGA GAA AAC CAA TAT GTC ATC |                       |        |

**c) Resuspensión de primers liofilizados**

**Fórmula para resuspensión de primers = Nanomoles x 1000/ concentración stock**

**3.4.3. Protocolo de amplificación de PCR inicial**

Basándonos en el protocolo de amplificación de Braithwaite (1995)

**Cuadro 2. Protocolo de amplificación del ScBV**

| Condiciones de PCR    | Temperatura ° C | Tiempo         |
|-----------------------|-----------------|----------------|
| Pre-desnaturalización | 94              | 7 min          |
| <b>3 ciclos</b>       |                 |                |
| Desnaturalización     | 94              | 30 seg         |
| Hibridación           | 50              | 30 seg         |
| Elongación            | 72              | 1 min          |
| <b>37 ciclos</b>      |                 |                |
| Desnaturalización     | 94              | 30 seg         |
| Hibridación           | 55              | 30 seg         |
| Elongación            | 72              | 1 min          |
| Extensión final       | 72              | 7 min          |
| Conservación          | 4               | Hasta 24 horas |

**3.4.4. Preparación del premix de PCR**

De acuerdo con Braithwaite (1995) este diagnóstico tiene una particularidad, los primers con el ADN de la muestra se colocan en un microtubo, se colocan en ebullición por 7 minutos luego se colocan en hielo por la misma cantidad de tiempo. La verificación de esta desnaturalización previa se debe a que el ADN del virus es

superenrollado ya que se ha comprobado que en condiciones normales de PCR, no ha sido posible su amplificación.

La mezcla de reactivos se realiza en cámara de flujo laminar para evitar contaminación. Después de ser incorporado al mix de PCR que contiene todos los reactivos (Buffer 1x, Dntps 0.20 mM, 4 mM Cl<sub>2</sub>Mg, Primers 0.5 pm/μl, 1 unidad de taq-polimerasa) con lo que se procedió a hacer una reacción normal.

**Cuadro 3. Cantidad de reactivos para PCR**

| Reactivos               | Mix PCR  |           | Volumen μl. |
|-------------------------|----------|-----------|-------------|
|                         | C1       | C2        |             |
| Agua ultrapura          |          |           | 16.8        |
| Buffer                  | 10 x     | 1x        | 2.5         |
| Cl <sub>2</sub> Mg      | 50 mM*   | 4 mM      | 2.0         |
| Dntps                   | 2.5 mM   | 0.20 mM   | 2.0         |
| Primers                 | 25 pM/μl | 0.5 pm/μl | 0.5         |
| Taq                     | 5 U/ μl  | 1 unid    | 0.2         |
|                         |          | ADN       | 1.0         |
| <b>Volumen final **</b> |          |           | <b>25</b>   |

\*mM= milimolar (unidad de medida)

C1, C2=concentraciones de reactivos

\*\*volumen final de una muestra

#### 1.4.5. Análisis electroforético

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml, las fotos fueron capturadas en un fotodocumentador ultravioleta marca Biodoc-IT and Visidoc- it Systems. Se usó un marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder promega) para visualizar según este marcador el tamaño de la banda del producto amplificado.

### 3.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio de histogramas de frecuencias debido a la naturaleza de las reacciones (productos de amplificación de la PCR) no hay variables medibles.

Para calcular la distribución de la enfermedad se calculó por el promedio ponderado.

$$X = \Sigma D \times A / \text{Sub total áreas}$$

**Donde:**

$\Sigma D$  = Distribución de la enfermedad.

A = Área muestreada por lote.

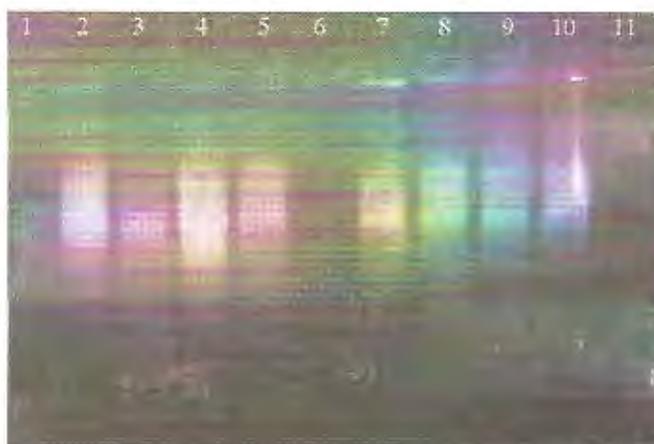
**Subtotal de Áreas** = Total de áreas muestreadas por cantero o ingenio.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Establecimiento y optimización de protocolos de extracción de ADN para caña de azúcar.

#### 4.1.1. Elección del Protocolo de extracción de ADN

En el proceso de elección del mejor protocolo de extracción de ADN se probó el método de Dellaporta *et al* (1983) modificado en el cual no se pudo observar una buena calidad ni cantidad de ADN (Figura 1).



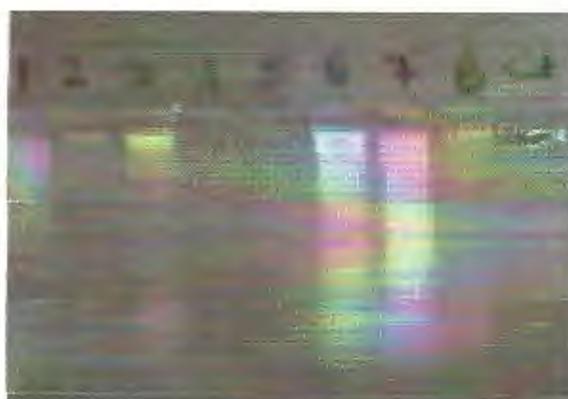
**FIGURA 1.** ADN extraído por el método de extracción Dellaporta *et al* (1983).CINCAE. 2003; pozos 1-3 Var. B76-78; pozos 4-6 Ragnar; pozos 7-10 1995:R45P78.

El protocolo de extracción de ADN Doyle & Doyle (1990) modificado por Aljanabi ha sido utilizado en la extracción de ADN para caña de azúcar en el que se ha obtenido un ADN libre de polisacáridos y polifenoles para lo cual se ajustaron volúmenes con el objeto de miniaturizar la muestra, se obtuvo un ADN de buena calidad, con una pequeña degradación. (Figura 2).



**FIGURA 2.** ADN extraído por el método de extracción Doyle & Doyle (1990) modificado por Aljanabi CINCAE, 2003; pozos 1-3 Var. 1995:R45P78; pozos 4-6 var. Ragnar.

Se probó además el protocolo de Jhingan (1992) y Dellaporta (1983) utilizado por Morillo (1999) en caña de azúcar. Con el que se obtuvo una buena calidad de ADN (Figura 3).



**FIGURA 3.** ADN extraído por el método de Jhingan (1992) y Dellaporta (1983) CINCAE, 2003; pozos 1-3 Var. 1995:R45P78; pozos 4-6 var. B76-78; pozos 7-9 var. Ragnar

Sin embargo los mejores resultados en cuanto a calidad y rendimiento de ADN se obtuvieron utilizando una combinación de ambos protocolos. Donde se reemplazó el mercaptoetanol por polyvinyl pyrrolidone (PVP), como agente antioxidante.

Se evaluaron diferentes concentraciones en los reactivos del buffer de extracción como Tris, EDTA, CTAB/CINa, ajustándose tiempos en el proceso de incubación de las

muestras, y de eliminación de contaminantes con la adición de CIA (cloroformo (isoamyl alcohol) donde se separaron dos fases y se liberaron proteínas, sales y restos celulares, finalmente se realizaron los lavados con alcoholes para la obtención del ADN, de acuerdo a lo establecido en cada uno de los protocolos antes mencionados (Figura 4)



**FIGURA 4.** ADN extraído por la combinación de protocolo de extracción de Doyle & Doyle (1990) modificado por Aljanabi (1992) y Dellaporta (1983) CINCAE. 2003; pozos 1-4 var. B76-78; pozos 5-9 var. Ragnar; pozos 13-17 var. 1995:R45P78.

Se seleccionó entonces un protocolo modificado por Doyle & Doyle (1990) el que se combinó con el protocolo de Morillo (1999) en el cual se modificaron volúmenes de CTAB 70  $\mu$ l y CINa 70  $\mu$ l que sirven para remover polisacáridos. Se adicionó además PVP (polyvinyl pyrrolidone) 200  $\mu$ l y sulfito de sodio (incluido en el buffer de extracción) que permiten prevenir la oxidación de compuestos fenólicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos el protocolo seleccionado se basó en la obtención de un ADN de buena calidad y cantidad, modificando volúmenes y miniaturizando la muestra en uno de los protocolos probados y como agentes antioxidantes esenciales para poder liberar el ADN se eligió PVP y sulfito de Na. (Doyle & Doyle, 1990) en lugar de  $\beta$ -Mercaptoetanol (Morillo, 1999), ya que este reactivo produce asfixia por inhalación, si no es manipulado con el cuidado necesario de acuerdo a experiencias obtenidas en el trabajo.

#### **4.1.2. Protocolo de extracción de ADN establecido.**

Buffer de extracción seleccionado contiene: sorbitol 140 Mm, Tris 220 Mm pH 8, EDTA 22 Mm, CINa 800 Mm, CTAB 1.6%, N-Lauryl Sarcosine 2% 0.06%  $\text{SO}_2\text{Na}$  200  $\mu$ l PVP 10% o adicionar 2  $\mu$ l de mercaptoetanol (opcional), 50  $\mu$ l CTAB. 10%, 50  $\mu$ l CLNa 0.7M.

## Proceso

### a) Lisis celular

Se maceran aproximadamente 100 mg de tejido (hojas) con nitrógeno líquido en un mortero, para pulverizar la muestra se coloca en un microtubo de 1.5 ml, al cual se adicionan 700  $\mu$ l de buffer de extracción y 200  $\mu$ l de PVP, se incuban las muestras a baño maría (65 °C) por 45 minutos.

En esta etapa se rompe las células (lisis) y se empieza a liberar el ADN (Figura 5).



FIGURA 5. Maceración del tejido con nitrógeno líquido. CINCAE, 2003.

### b) Eliminación de proteínas

Se adicionan 700  $\mu$ l de CIA (cloroformo-isoamyl-alcohol) a una relación de 24:1, se centrifugan las muestras a 14000 rpm por 5 minutos y se recupera luego la fase acuosa, este procedimiento se repite si se observan residuos o contaminantes (proteínas, sales, restos celulares). Luego de recuperar la fase acuosa se adicionan 50  $\mu$ l CTAB 10 %, 50  $\mu$ l de CINa 0.7 M y 400  $\mu$ l de CIA se recupera la fase acuosa y pasamos a la siguiente etapa (Figura 6).

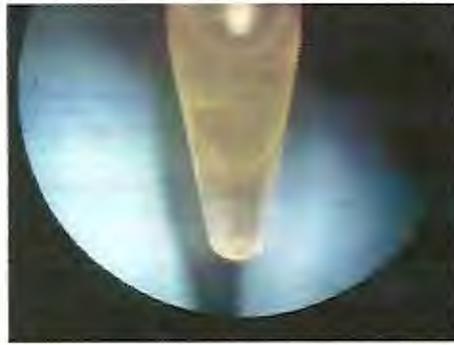


FIGURA 6. Separación de fases con cloroformo isoamyl alcohol (CIA) CINCAE, 2003.

#### c) Precipitación y conservación ADN

Con la finalidad de precipitar el ADN, al volumen recuperado se adiciona isopropanol y se almacena a menos 20 °C por una noche, al día siguiente se centrifuga y se descarta el alcohol para quedar solo con el pellet de ADN, al cual se le realizan lavados con etanol del 90 y 70 %, los tubos vacíos se dejan secar al ambiente, el ADN es resuspendido en 50 µl de TE 01X (1 mM Tris pH 8, 0.1 mM EDTA) (reactivo utilizado para la conservación del ADN) luego se realiza un tratamiento con Rnasa (10 mg/ml) a baño maría 65 °C por 10 minutos, para finalmente almacenar a menos 20 °C (Figura 7)



FIGURA 7. Precipitación de ADN en isopropanol a -20 °C. CINCAE, 2003.

#### 4.1.3. Análisis de varianza protocolos de extracción de ADN evaluados

Para el análisis experimental de este bioensayo se utilizó el Diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos (protocolos de extracción de ADN) y 4 repeticiones cada uno. Los datos previos a la ANDEVA fueron transformados a Log<sub>10</sub> y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

Según el análisis de varianzas (Cuadro 4) existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos (protocolos de extracción de ADN), sobresaliendo la metodología de combinación de protocolos de Doyle & Doyle (1990) y E. Morillo (1999), de acuerdo a la comparación de medias (Duncan  $<0.05$ ), con 46.25 ng/ $\mu$ l de ADN (Anexo 8).

## **4.2 Establecimiento y optimización de PCR y Nested -PCR para la detección del virus baciliforme de la caña de azúcar ScBV.**

### **4.2.1 Optimización de la PCR**

Seguendo el protocolo de amplificación de Braithwaite (1995) se realizaron las pruebas de amplificación la que se mostraron reacciones inespecíficas, donde el tamaño de producto de amplificación obtenido no fue el esperado de 221 pb (pares de bases) lo que se comparado con el marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder promega) e hibridaciones no específicas en el mismo producto amplificado o simplemente no se mostraba reacciones en ciertas muestras, por lo que fue necesario hacer una revisión y ajustes, tanto en los reactivos usados en el mix de PCR y el protocolo de amplificación que último fue modificado.

De acuerdo con Boulo (2002) se pueden reducir los tiempos establecidos para optimizar la amplificación de ADN, en las condiciones de la PCR como: predesnaturalización, elongación y extensión final. Con el propósito de optimizar metodologías sin influir en el producto final de amplificación.

En el trabajo ajustando tiempos en los diferentes procesos, mencionados anteriormente siendo establecido para la pre desnaturalización 4 min, elongación 45 seg y para extensión final 5 min lo que se detalla en un cuadro comparativo a continuación.

**Cuadro 4. Protocolo de amplificación de ADN. CINCAE, 2003.**

| Descripción de procesos | Braithwaite (1995) |        | Establecido |        |            |        |
|-------------------------|--------------------|--------|-------------|--------|------------|--------|
|                         | PCR                |        | Simple PCR  |        | Nested PCR |        |
|                         | Temp.              | Tiempo | Temp.       | Tiempo | Temp.      | Tiempo |
| Pre desnaturalización   | 94° C.             | 7 min  | 94° C.      | 4 min  | 94° C.     | 7 min  |
| <b>3 CICLOS</b>         |                    |        |             |        |            |        |
| Desnaturalización       | 94° C.             | 30 seg | 94° C.      | 30 seg | 94° C.     | 30 seg |
| Hibridación             | 50° C.             | 30 seg | 50° C.      | 30 seg | 45° C.     | 30 seg |
| Elongación              | 72° C.             | 1 min  | 72° C.      | 45 seg | 72° C.     | 45 seg |
| <b>37 CICLOS</b>        |                    |        |             |        |            |        |
| Desnaturalización       | 94° C.             | 30 seg | 94° C.      | 30 seg | 94° C.     | 30 seg |
| Hibridación             | 50° C.             | 30 seg | 50° C.      | 30 seg | 45° C.     | 30 seg |
| Elongación              | 72° C.             | 1 min  | 72° C.      | 45 seg | 72° C.     | 45 seg |
| Extensión final         | 72° C.             | 7 min  | 72° C.      | 5 min  | 72° C.     | 5 min  |
| Conservación            | 4° C.              |        | 4° C.       |        | 4° C.      |        |

#### 4.2.2 Establecimiento de la NESTED PCR

##### a.) Diseño de iniciadores internos.

Una vez establecida la simple PCR se tomó la decisión de aumentar la sensibilidad de la reacción debido a lo mencionado anteriormente, la naturaleza del virus en estudio también se presenta asintomática y la necesidad de detectarlo en un diagnóstico temprano principalmente en variedades de cuarentena y bancos de germoplasma se diseñó primers internos. A partir de la secuencia del primer producto de amplificación de los primers externos se seleccionaron secuencias para el diseño de primers internos desde la posición 5612 para el primers sentido (forward) y la posición 5758 para el primers antisentido siguiendo el patrón de todo el genoma del virus baciliforme de la caña de azúcar ScBV (Anexo 9).

Para la selección de primers internos fueron considerados los siguientes criterios:

- Longitud de los primer 18-30 bases
- Temperatura de hibridación ( $T_m$ ) de los primer de 55-72°C
- Porcentaje contenido entre G-C (40-60 %)
- Que no formen dímeros (para determinar si existe unión o hibridación del iniciador con secuencia blanco)
- Que no formen Hairpins (unión o hibridación entre regiones de la misma secuencia analizada. Anexo 10).
- Diferencia de temperatura de hibridación entre primers sentido y antisentido  $\leq 5$  °C
- Para el análisis de la secuencia del ScBV, se utilizaron dos programas (disponibles en el Internet).

El **BLAST**, programa para el análisis completo de la secuencia del ScBV. el cual nos permitió realizar la alineación de las secuencias del BSV y ScBV, para buscar similitudes en ambas secuencias disponible en ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

2. **Vector NTI**, en este programa se analizaron Dímeros (para determinar si existía unión o hibridación en una o ambas secuencias analizadas) y hairpin (unión o hibridación entre regiones de la misma secuencia analizada). Disponible ([www.basic.nwu.edu/biotools/Primers3.html](http://www.basic.nwu.edu/biotools/Primers3.html))

**Cuadro 5. Primers diseñados Nested PCR. C. AZUL 2002.**

| Primers | Posición | Secuencia               | Región amplificada    | Tamaño |
|---------|----------|-------------------------|-----------------------|--------|
| ScBVIF5 | 5,612    | GTT TCA TCA AGT CGC CAT | Reverse transcriptasa | 146 bp |
| ScBVF15 |          | GTT TCA TCA AGT CGC AAT |                       |        |
| ScBVIR5 | 5,758    | CCT CTG AAA CAC TKG TCC |                       |        |

Después de seleccionar las secuencias para el diseño de primers internos estos fueron sometidos a análisis en los programas BLAST en el cual se alinearon secuencias entre el ScBV y el BSV se determinó que existen homologías en ambas secuencias de acuerdo a Braithwaite (1995).

En el programa Vector NTI se analizaron dímeros y hairpin. Como resultados del análisis en el programa Vector NTI del análisis de primers dímeros estos no existieron, ya que no hubo hibridación entre la secuencia de los primers analizados.

Con respecto a la existencia de hairpin hubo resultados negativos ya que no se detectaron hibridaciones del mismo primers lo que dio válido un criterio para su selección.

#### **Protocolo de amplificación de la Nested PCR**

El protocolo seleccionado para la técnica de Nested PCR, fue utilizado el de Braithwaite (1995) difiriendo solo en la temperatura de hibridación de los primers las cuales se ajustaron tomando como referencia la temperatura media ( $T_m \pm 5^\circ \text{C}$ ) de acuerdo a lo indicado por el fabricante ya conocida según envío del fabricante (Integrated DNA). Se utilizaron tres temperaturas a 50, 47, y 45 °C.

Para la nested PCR se siguió el protocolo de amplificación establecido previamente para la simple PCR difiriendo en la temperatura de hibridación de los iniciadores los cuales se ajustaron tomando como referencia la temperatura media ( $T_m \pm 5^\circ \text{C}$ ) de 49 °C según

envío del fabricante integrated DNA en el que se probaron temperaturas de 53, 47 y 45 °C, siendo esta última la que mejor resultado se obtuvo en cuanto a la calidad del amplicón no se presentaron hibridaciones no específicas que cuando se probaron temperaturas superiores a 45 °C la cual se eligió como temperatura de hibridación de los iniciadores internos.

Al someter los primers y el ADN a procesos de ebullición y enfriamiento aumento la sensibilidad de la reacción, fue comprobado al intentar realizar una PCR normal con muestras ya amplificadas como positivas no se observaron bandas asociadas con el virus lo que coincide con (Braithwaite 1995).

#### 4.2. 3Validación de la técnica de PCR

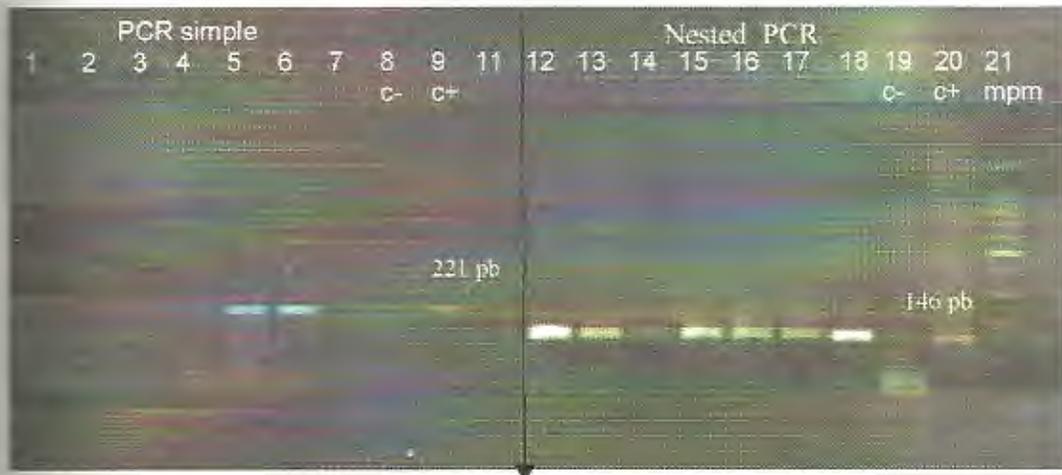
##### a) Prueba de sensibilidad entre la simple PCR y nested PCR

Para comparar y determinar la sensibilidad de la PCR, se realizó una prueba seleccionando la variedad 1995: R45-P78 de la cuarentena cerrada del CINCAE, infectada con el virus Baciliforme ScBV y una muestra sana de la variedad Ragnar; las cuales fueron confrontadas desde una relación 1/20 (enferma/sanas) o 5 por ciento hasta el 100 % de hojas infectadas del ScBV (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Relación de las muestras evaluadas en la prueba de sensibilidad. CINCAE, 2003.**

| Muestra | Cantidad (%) |      | Relación      |
|---------|--------------|------|---------------|
|         | Enfermas     | Sana | Enferma/total |
| 1       | 5            | 95   | 1/19          |
| 2       | 10           | 90   | 2/18          |
| 3       | 20           | 80   | 4/16          |
| 4       | 40           | 60   | 8/14          |
| 5       | 80           | 20   | 16/4          |
| 6       | 100          | 0    | 20            |

Del bioensayo planteado para la comparación de simple y nested PCR La simple PCR detecto el virus desde el 40 % de infección La Nested PCR desde el 5 % de infección, lo que comprueba la sensibilidad al detectar el virus en concentraciones bajas (Figura 8).



**FIGURA 8.** Aumento de sensibilidad en la nested PCR con un patrón MPM (marcador de peso molecular de 100 pb) lo que nos indica el tamaño de la banda de 221 pb para la simple PCR y de 146 pb para la nested PCR, CINCAE, 2003.

#### **4.3. Diagnóstico y detección del ScBV en variedades de cuarentena cerrada, colección universal CINCAE, Vitro plantas para semilleros fundación y semilleros de Ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal.**

##### **4.3.1. Diagnostico en Cuarentena Cerrada estación Bullcay- Cuenca**

Del diagnostico realizado en cuarentena cerrada de 108 variedades evaluadas 20 resultaron positivas, comprobándose la presencia del virus baciliforme en cañas nobles e híbridos comerciales, provenientes de Australia, Brasil, Colombia y USA (Figura 11 y Cuadro 7).

Por origen de importación las variedades provenientes de Corpesucar fueron las que más alta distribución del virus presentaron como lo indican las Figuras 9 y 10.



**FIGURA 9.** Pozo 2 variedades 1995:R55-PO4 muestra positiva pozo 23, 26 (1995: R45-P78) usadas como control positivo.



**FIGURA 10.** Variedades de cuarentena cerrada positivas para el virus baciliforme ScBV pozo 9 var PR 1152, pozo 19 positivo leve var HM661, pozo 28 var SS66-001(CATO). CINCAE, 2003

**Cuadro 7. Distribución del ScBV en variedades de cuarentena cerrada por origen de importación. CINCAE, 2003.**

| Origen de importación | Año de importación | Número de variedades | Reacción positiva | Distribución (%) |
|-----------------------|--------------------|----------------------|-------------------|------------------|
| Australia (BSES)      | 2002-2003          | 5                    | 0                 | 0.00             |
| Brasil (Corpesucar)   | 2002-2003          | 34                   | 8                 | 23.53            |
| Colombia (Cenicaña)   | 2002               | 8                    | 1                 | 12.50            |
| USA (USDA)            | 2003               | 61                   | 11                | 18.03            |
| <b>Total</b>          |                    | <b>108</b>           | <b>20</b>         | <b>18.52</b>     |

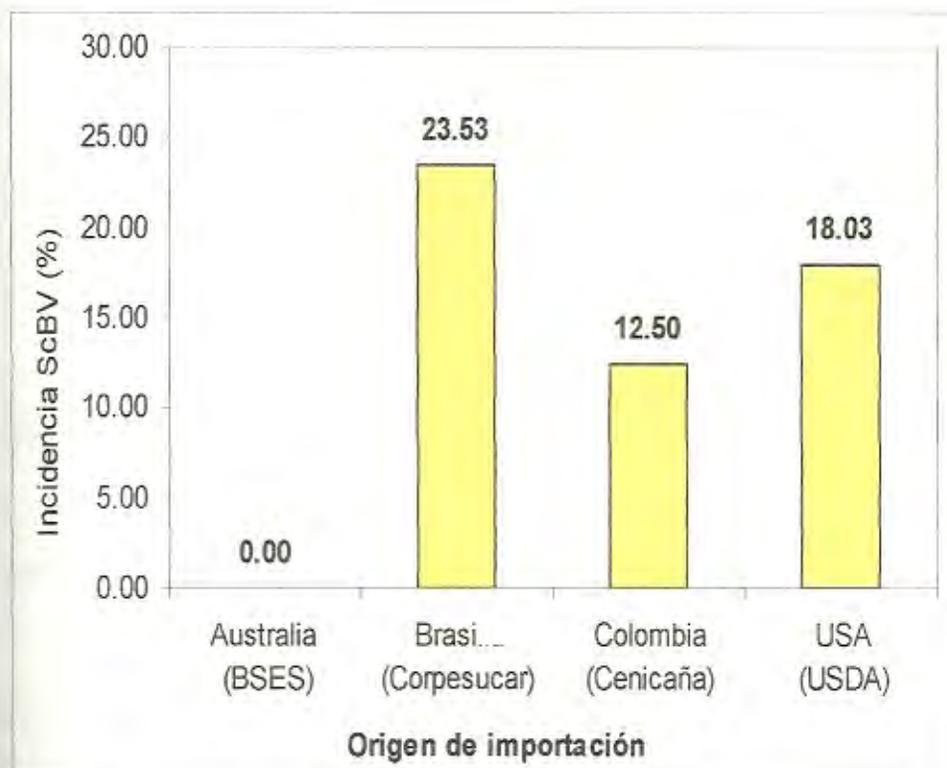


FIGURA 11. Incidencia del virus baciliforme ScBV en cuarentena cerrada. CINCAE, 2003

#### 4.3.2 Diagnóstico en Lotes comerciales de los Ingenios San Carlos y Valdez

De acuerdo al diagnóstico del virus Baciliforme en lotes comerciales se presentó una baja distribución de la enfermedad, detectándose en el ingenio Valdez en las variedades B7678 En un 10 y en Ragnar en un 20 por ciento, presentándose en San Carlos en la variedad Ragnar en un 0.7 por ciento (cuadro 8).

**Cuadro 8. Variedades evaluadas en lotes comerciales de los Ingenios San Carlos y Valdez. CINCAE, 2003.**

| INGENIO              | Variedad | área  | N de muestra | Reacción + | Incidencia | X. ponderado /área |
|----------------------|----------|-------|--------------|------------|------------|--------------------|
| San Carlos           | CR74250  | 21.7  | 15           | 0          | 0          | 0.0                |
|                      | PR671070 | 48.3  | 15           | 0          | 0          | 0.0                |
|                      | CC8592   | 13.8  | 10           | 0          | 0          | 0.0                |
|                      | B76-78   | 38.8  | 15           | 0          | 0          | 0.0                |
|                      | Ragnar   | 10.3  | 15           | 1          | 0.7        | 0.0                |
| Subtotal             |          | 133.1 | 70           | 0          | 0.14       |                    |
| Total de X ponderado |          |       |              |            |            | 0.0                |
| X ponderado          |          |       |              |            |            | 0.0                |
| Valdez               | B7678    | 53.2  | 10           | 1          | 10         | 2.5                |
|                      | Ragnar   | 26.6  | 10           | 2          | 20         | 2.5                |
| subtotal             |          | 79.2  | 20           | 3          | 30         |                    |
| Total de áreas       |          | 212.4 |              |            |            |                    |
| Total de X ponderado |          |       |              |            |            | 5.0                |
| X ponderado          |          |       |              |            |            | 2.5                |

#### 4.3.3. Diagnóstico de 15 variedades de la colección Universal del CINCAE

El virus fue detectado en las variedades POJ3016 y NCO310 de la quince registradas como susceptibles al virus de la colección universal del CINCAE.

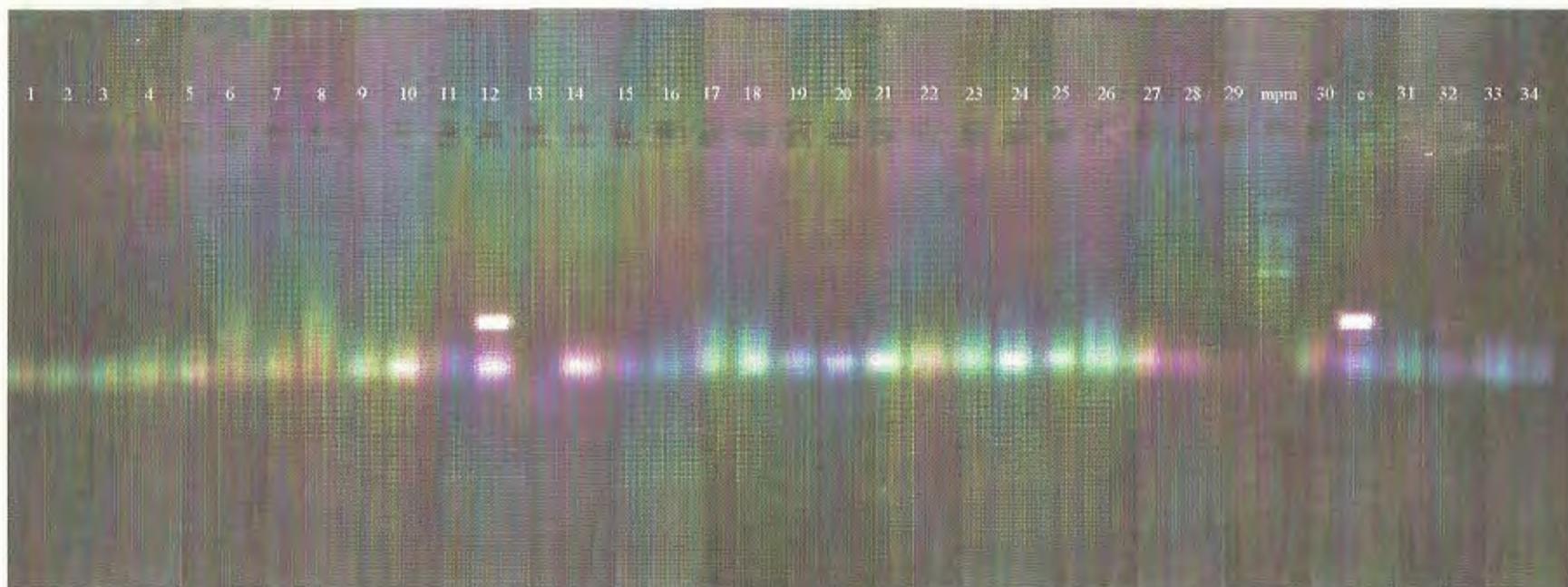
Este resultado demuestra que el virus había sido introducido previamente aunque en un nivel bajo esta presente. (figura 12).



**FIGURA 12.** Análisis de PCR (14 variedades) de la colección universal del CINCAE; muestras positivas en pozo 6 variedades POJ 3016 y pozo 7 variedad NCO310. CINCAE, 2003.

#### **4.3.4 Diagnóstico en semilleros de los Ingenios**

Cabe indicar que luego de evaluar las 450 hectáreas de los semilleros de los Ingenios, el virus fue detectado en la variedad Ragnar distribuida en el 15 por ciento de los lotes en 127.9 hectáreas evaluadas del ingenio Valdez (Cuadro 9) Confirmando que el virus se encuentra distribuido en el área y canteros comerciales aunque los resultados no arrojen una distribución mayor debido a la área de cultivo y de preferencia en la variedad con más superficie sembrada tanto en semilleros (Figura 13).



**FIGURA 13.** Diagnóstico del virus ScBV en semilleros básicos y comerciales del ingenio Valdez pozo 12 variedad positiva ragnar. CINCAE. 2003  
Variedades analizadas B76-78 y Ragnar.

**Cuadro 9. Diagnostico en Semilleros de los Ingenios La troncal. Valdez, San Carlos.**

| Ingenio    | Variedad | Muestras | Has   | PCR | N PCR | Distribución | X. ponderado por área |
|------------|----------|----------|-------|-----|-------|--------------|-----------------------|
| SAN CARLOS | CC8592   | 24       | 72.3  | 0   | 0     | 0            | 0                     |
|            | CR74250  | 24       | 108.8 | 0   | 0     | 0            | 0                     |
|            | RAGNAR   | 18       | 73.1  | 0   | 0     | 0            | 0                     |
| Subtotal   |          | 66       | 254.2 | 0   | 0     | 0            | 0                     |

**Total de X ponderado** 0

**X ponderado** 0

|            |          |    |      |   |   |   |   |
|------------|----------|----|------|---|---|---|---|
| LA TRONCAL | B7678    | 6  | 41.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|            | RAGNAR   | 6  | 32.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|            | C8751    | 9  | 21.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|            | C7274    | 9  | 10.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|            | OTRAS    | 12 | 3.9  | 0 | 0 | 0 | 0 |
|            | SUBTOTAL | 36 | 68   | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Total de X ponderado**

**X ponderado** 0 0 0 0

|          |        |     |       |   |   |     |      |
|----------|--------|-----|-------|---|---|-----|------|
| VALDEZ   | B7678  | 63  | 49.8  | 0 | 0 | 0   | 0    |
|          | RAGNAR | 60  | 78.1  | 3 | 9 | 15  | 2.60 |
|          |        | 123 | 127.9 | 3 | 9 | 9.2 | 2.61 |
| Subtotal |        | 225 | 450.1 |   |   |     |      |
| TOTAL    |        |     |       |   |   |     |      |

**Total de X ponderado** 5.21

**X ponderado** 1.74

#### 4.3.5 Diagnostico en vitroplantas

El virus fue detectado en vitroplantas del clon ECSP 98-127 y en variedades provenientes de cuarentena cerrada, estas fueron SS6001 HM661 y 1995:R45P78, el cual se mantuvo presente una vez de haber sido realizado el análisis de PCR antes y después del proceso de limpieza. Las variedades en mención presentaron bandas fuertes del virus en incluso la variedad SS6001 amplificó en la nested PCR el cual se mantuvo como se indicó anteriormente (Figura 14).

Coincidiendo así con Parmessur y Sauntally, 2004 debido a que el virus no fue eliminado mediante el uso de técnicas de termoterapia y cultivo de tejidos, y del agente antiviral Rivarina.

Es así que autores como Autrey *et al.*, 1990 y Egeskov *et al.*, 1994 en otros trabajos realizados mencionan que no se ha podido eliminar este virus mediante termoterapia y cultivo de tejidos.

Se puede indicar que el ScBV no está integrado al genoma, (Geijsskes, y Braithwaite., 2004) como sucede en el BSV (Banana Streak Virus).



**FIGURA 14.** Detección del ScBV por PCR en variedades de caña de azúcar de cuarentena cerrada y vitroplantas; de izquierda a derecha: pozos 2-3 y 11-12 variedad R45-P786; pozos 4-5 y 13-14 variedad HM661; pozos 6-7 y 15-16 variedad SS 6001; pozos 8-17 pcr control; pozo 10 control positivo; pozo 18 Mpm (100 bp).

#### 4.3.6. Diagnóstico en variedades inoculadas con mosaico ScMV (B74-132).

En muestras infectadas con el virus del mosaico de la caña (ScMV) también se encontró presente el ScBV, detectándose tanto en las variedades B74132 como en B7678, lo que puede indicar una asociación de ambos virus tal como lo registran (Lockhart y Autrey, 1999).

#### 4.3.7. Diagnóstico del virus del rayado del banano BSV

Empleando los primers diseñados para el diagnóstico del ScBV, en muestras de banano con síntomas de Banana Streak Virus (BSV), se obtuvo un producto de amplificación de 221 pb.

Este resultado concuerdan con Geijskes *et al*, 2000 quien indica la alta relación serológica y molecular que presentan ambos virus. Al emplear secuencias altamente conservadas en el ScBV, se evitan reacciones inespecíficas y por esta razón debido a la homología del genoma del ScBV y el BSV se lograron el mismo resultado de amplificación en ambos virus.



**Figura 15.** Diagnóstico de BSV Banana Streak Virus con primers para ScBV;

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones.

- La Nested –PCR aumentó la sensibilidad de la reacción, en un 16 por ciento.
- Se confirmó la presencia del ScBV en Ecuador mediante la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en cuarentena cerrada la colección Universal, lotes comerciales, en semilleros y en Vitro-plantas.
- Existe una baja distribución del ScBV en lotes comerciales y semilleros de los ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal.
- El ScBV ha sido introducido en germoplasma asintomático
- El ScBV no puede ser eliminado totalmente por termoterapia.
- Se confirmó la presencia del ScBV asociado con el virus del mosaico ScMV.

### 5.2. Recomendaciones

- Continuar con el diagnóstico temprano del ScBV en procesos de cuarentena, y así evitar su diseminación. Aún la distribución es baja en variedades comerciales, como ha sucedido con otras enfermedades introducidas. El ScBV se manifiesta de forma variable el que puede ser detectado aún en plantas asintomáticas y puede resultar más infectivo asociado con otros virus como el mosaico ScMV y mosaico suave ScMMV.
- Optimizar técnicas de eliminación de este virus por termoterapia y cultivo de meristemas, debido a que en algunos trabajos ya publicados no se lo ha podido erradicar por completo. Poco se ha discutido sobre las causas que no han hecho posible su eliminación. Es necesario recalcar que el ScBV no se encuentra integrado al genoma como sucede con el Banana Streak Virus (BSV) y podría ser una causa que sea difícil su eliminación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- AGRIOS, G. 1996.** Enfermedades de las plantas causadas por virus en Fitopatología. 2 ed. México. Editorial Limusa, S.A. pp. 658.
- BOUHIDA, M.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, NE. 1993.** An analysis of the complete sequence of a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice. *Journal of General Virology*. 74:15 - 22.
- BRAITTHWAITE, KS.; EGESKOV, NM.; SMITH, GR. 1995.** Detection of Sugarcane Bacilliform Virus Using the Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease*. 79 (8):792- 796.
- BOULO, V.; MIAHLE, E. 2002.** Optimización de la PCR. Concepto Azul. (comunicación personal)
- BUTTER, J. 2005.** Polymerase chain reaction. In: *Forensic DNA Typing, Biology Technology and Genetics of STR markers*. Second Edition. Elsevier.
- CHATENET, M.; DELAGE, C.; RIPOLLES, M.; IREY, M.; LOCKHART, BE.; ROTT, P. 2001.** Detection of sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease*. 85:1177-1180
- CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. 2001.** Plant Regeneration from Sugarcane Seed-derived Callus in Vitro Cellular and Developmental Biology. 37.
- COMSTOCK, JC.; PENA, M.; VEGA, J. 2002.** Report of Sugarcane yellow leaf virus in Ecuador, Guatemala, and Nicaragua. *Plant Disease*. 10. pp86-74

- SANCHEZ, A. VICTORIA, J. GARCÉS, F. y TABARES, G..** (24-26, 1997, CALI). 1997. Diagnóstico molecular del virus baciliforme de la caña de azúcar. (ScBV) en Colombia: Congreso memorias. Eds. Sanchez, A., Victoria J., Garcés, F. Tabares, G. Cali. Colombia. pp. 33-39.
- CRONJE, C.; TYMON, A.; BAILEY, R.** 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. *Annals of Applied Biology*. 133:177-186.
- CROUCH, JH., VUYLSTEKE, D. ORTIZ, R.** 1998. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa spp.*). *Electronic Journal of Biotechnology*. 1:1-12.
- CURTIS, H. BARNES, N.** 2001. DNA recombinante: las herramientas del oficio. En: *BIOLOGÍA*. 6<sup>a</sup> edición. pp. 417-442
- DAVIS, M.; ROTT P. ; ASTUA-MONGE, M.** 1998. Nested, multiplex PCR or detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* and *Xanthomonas albilineans* *In* sugarcane. Offered Papers Abstracts. Vol 3. 7th International Congress of Plant Pathology. Edinburgh, Scotland. International Society for Plant Pathology.
- DIEFFENBACH, C.; LOWE, T.; DVEKSLER, G.** 2003. General concepts of PCR primer design. *In*: PCR primer, a laboratory manual. Ed: Dieffenbach, C.; Dveksler, G. pp. 133-139.
- DIETZGEN, R.; THOMAS, J.; SMITH, G.** 1999. *PCR*-Based detection of viruses in banana and sugarcane. *Current Topics in Virology*. 1:105-118.
- FEGAN, M.; CROFT, BJ.; TEAKLE, DS.** 1998. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathology*. 47:495-504.

- FENAZUCAR, 1999.** Indicadores de la Agroindustria Azucarera. Consultado el 10 de mayo del 2002. Disponible en [www.sica.gov.ec/cadenas/azucar/docs/indicadores.htm](http://www.sica.gov.ec/cadenas/azucar/docs/indicadores.htm).
- GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH RG.; ABOUZID, A. 2000.** Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane *embryogenic callus*.- *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 36:37-40.
- GARCÉS, F. 2000.** Impacto de las enfermedades en la producción. CINCAE Carta informativa. Año 3. N°5. p. 9. El Triunfo-Ecuador.
- GELJSKES, K.; BRAITHWAITE, G.; SMITH, G.; DALE, J.; HARDING, M. 2004.** Sugarcane bacilliform virus encapsidates genome concatamers and does not appear to integrate into the *saccharum officinarum* genome. 149 (4). Consultado el 20 de Octubre del 2004. Disponible en [www.springerink.com/home/contribution.asp](http://www.springerink.com/home/contribution.asp).
- HADIDI, A.; KHETARPAL, RK.; KOJANEWA. 1998.** Plant virus disease control. Meristem Tip Culture and Tip Micrografting. The American phytopathological society pp348-350,369-370.
- IANNOO, N.; GRIVET, L.; SEGUIN, MP. 1999.** Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theor Appli Genet*. 99:171-184.
- HERMINIER, J.; BONFIGLIOLI, R.; DAIRE, X. 1999.** Oligodeoxynucleotides as probes for in situ hybridization with transmission electron microscopy to specifically localize phytoplasma in plant cells. *Mol Cell Probes*. 13:41-7.
- LOCKHART, B.; AUTREY, L. 1988.** Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. *Plant Disease*. 72:23-233.

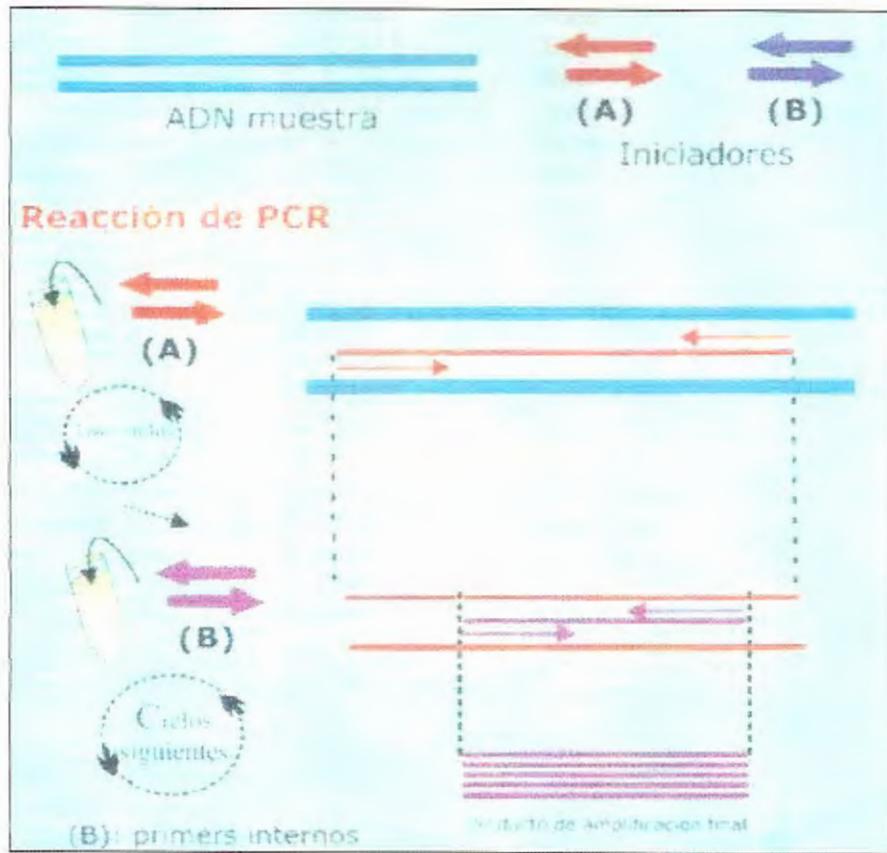
- ;----- 1999. Sugarcane Bacilliform Virus. *In*: Sugarcane Pathology. CIRAD, Ed. pp. 270-272.
- **LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, 1999.** Badnaviruses. *In*: Enciclopedia of Virology pp 1296-1300.
- ;----- 1993. Serological and Genomic Heterogeneity of Banana Streak Badnavirus: Implications for virus detection in Musa Germplasm. *In*: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests.- CIRAD.- Montpellier, France.- J Ganry (Eds.). pp. 105-119.
- McPHERSON, MJ.; MOLLER, SG. 2000.** Optimization PCR. *In*: PCR. - Bios Scientific Publisher Limited, pp. 67-87.
- MARTIN, RR.; DELANO, J.; LEVESQUE, CA. 2000.** Impacts of molecular diagnostic Technologies on plant disease Management. Annual Review of Phytopathology. 38:207-39.
- MULLER, E.; JACQUOT, E.; YOT P. 2001.** Early detection of cacao swollen shoot virus using the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods. 93:15-22.
- PAN, Y.; GRISHAM, M.; BURNER, D. 1999.** Development of Polymerase Chain Reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald. Plant Disease. 83:218-222.
- PARK, W.; RYU, K.; KIM, S. 1995.** Rapid Detection and Identification of Cucumber Mosaic Virus by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and restriction Analysis. Journal of Plant Biology. 38:267-274.

- PARMESSUR, Y.; SAUMTALLY, A. 2001.** Elimination of sugarcane yellow leaf virus and sugarcane bacilliform virus by tissue culture. Mauritius Sugar Industry Research Institute. 127-133. disponible en [www.gov.mu/portal/sites/ncb//moa/FARC](http://www.gov.mu/portal/sites/ncb//moa/FARC).
- PHILIP, R. 2000.** A guide to sugarcane disease. Tissue cultured plant exchange. Francia. CIRAD, ISSCT. p. 314.
- RAO, P.; FORD, R.; TOSICAND, M.; TEAKEE, D. 2001.** New virus and virus-like diseases of sugarcane. *In*: Sugarcane Pathology – Vol. II Virus and phytoplasma diseases. Science Publishers, Inc. pp. 6-11.
- REICHEL, H.; BENALCÁZAR, S.; MÚNERA, G.1996.** [Primer reporte del virus del rayado del banano (BSV) afectando plantaciones de plátano (Musa AAB Simmonds), Caña de azúcar (Sacharum officinarum) y achira (Canna edulis) en Colombia].- Revista Corpoica 1:35-39.
- SANCHEZ, A.; VICTORIA J.; GARCES F. 1997.** Diagnóstico molecular del virus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV) en Colombia.- *In*: Memorias del Cuarto Congreso de la Asociación Colombiana de Técnicos de la Cana de Azúcar, Cali, Sept. 24-26. 1:39-48.
- SCHENK, P.; SAGI, L.REMANS T. 1999.** A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Mol Biol.* 39:12-30.
- SHAMLOUL, A.; HADIDI, A. 1999.** Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization. *Journal of Virological Methods.* 80:145-55.
- THOMSON, KG.; DIETZGEN, RG, THOMAS, JE. 1996.** Detection of pineapple bacilliform virus using the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology.* 129:57-69.

- TZAFRIR, I.; AYALA-NAVARRETE, L.; LOCKHART, BE. 1997.** The N-terminal portion of the 216-kDa polyprotein of Commelina yellow mottle badnavirus is required for virus movement but not for replication. *Virology*. 232:359-68.
- VICTORIA, J.; VIVEROS, C.; CLIMACO.; CASSAROTT.; CALDERON, H. 1997.** Establecimiento de semilleros limpios, CEÑICANA. 50 p.
- VISWANATHAN, R.; ALEXANDER, KC.; GAR, ID. 1996.** Detection of sugarcane bacilliform virus *In* sugarcane germplasm. *Acta Virologica*. 40:5-8.
- VISWANATHAN, R.; BALAMURALIKRISHNAN, M.; PREMACHANDRAN, M. 1994.** Sugarcane bacilliform virus: symptoms, detection and distribution in the world germplasm collection at kannanore, India. *Proc. International Soc. Ingar cane Technologists*. 23: 340-352.
- WANG Z, COMSTOCK, J.; HATZILOUKAS, E. 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 Pathology*. 48:245-252.
- WONGKAEW, P.; HANBOONSONG, Y.; SIRITHORN, P. 1997.** Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. *Theoretical and Applied Genetics*. 95:660-663.
- ZHANG, LII.; BIRCH, RG.** The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. *PNAS*. 94:9984-9989.

## ANEXOS

Anexo 1. Esquema de la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)



Anexo 2. Variedades de Cuarentena cerrada

| Variedades de Cuarentena cerrada evaluadas para el diagnóstico del ScBV por PCR |                  |                     |                      |              |        |                      |    |
|---|------------------|---------------------|----------------------|--------------|--------|----------------------|----|
| Genero  | especie          | variedad            | origen               | simple       | nested | Observación síntomas |    |
| 1   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 892025            | Brasil       | -      | -                    | no |
| 2   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 832847            | Brasil       | -      | -                    | no |
| 3   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 85377             | Brasil       | -      | -                    | no |
| 4   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 87344             | Brasil       | -      | -                    | no |
| 5   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 845560            | Brasil       | -      | -                    | no |
| 6   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 87365             | Brasil       | -      | -                    | no |
| 7   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 86155             | Brasil       | -      | -                    | no |
| 8   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 855077            | Brasil       | -      | -                    | no |
| 9   | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 87396             | Brasil       | -      | -                    | no |
| 10  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | SP 841431            | Brasil       | -      | -                    | no |
| 11  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PR 1152              | Puerto Rico  | +      | +                    | // |
| 12  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PR 761006            | Puerto Rico  | -      | -                    | no |
| 13  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PR 803015            | Puerto Rico  | -      | -                    | no |
| 14  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PR 773070            | Puerto Rico  | -      | -                    | no |
| 15  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PR 773007            | Puerto Rico  | -      | -                    | no |
| 16  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | NG 77234             | Nueva Guinea | -      | -                    | no |
| 17  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PR 67245             | Puerto Rico  | -      | -                    | no |
| 18  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | B 78237              | Barbados     | -      | -                    | no |
| 19  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | F 134                |              | -      | -                    | no |
| 20  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | HM 661               |              | +      | +                    | si |
| 21  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | 1995:R45-P78         |              | +      | +                    | si |
| 22  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | Bamboo Amarilla      |              | -      | -                    | no |
| 23  | <i>Saccharum</i> | <i>sp</i>           | Yuetang 58-1291      |              | -      | -                    | no |
| 24  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | POJ 2946             | Java         | -      | +                    | no |
| 25  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | R 47 277             |              | -      | -                    | no |
| 26  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | BO 14                | Barbados     | -      | -                    | no |
| 27  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | PS 01                |              | -      | -                    | no |
| 28  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | IS 76-319            |              | -      | -                    | no |
| 29  | <i>Saccharum</i> | <i>spontaneum</i>   | SES 260              |              | -      | -                    | no |
| 30  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | B 49119              | Barbados     | -      | -                    | no |
| 31  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | Manjri Red           |              | -      | -                    | no |
| 32  | <i>Saccharum</i> | <i>sp</i>           | MOL 6068             |              | -      | -                    | no |
| 33  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | MIA 33155            | Nueva Guinea | -      | -                    | no |
| 34  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | NG 77-151            | Barbados     | -      | -                    | no |
| 35  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | B 46364              | Java         | -      | -                    | no |
| 36  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | POJ 2222             | Nueva Guinea | -      | -                    | no |
| 37  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | NG 51-105            | Hawai        | -      | -                    | no |
| 38  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | Hawaiian Original 52 |              | -      | +                    | no |
| 39  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | SS 66-001(CATO)      |              | +      | +                    | no |
| 40  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | UCW 54-63            |              | +      | -                    | no |
| 41  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | MPR 336              |              | -      | -                    | no |
| 42  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | 1995:R55-PO4         |              | -      | -                    | no |
| 43  | <i>Saccharum</i> | <i>hyb</i>          | fiji 28              | Fji          | -      | -                    | no |
| 44  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | NG 21-003            | Nueva Guinea | -      | -                    | no |
| 45  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | CO 1148              | India        | -      | -                    | no |
| 46  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | NC-30                |              | +      | -                    | no |
| 47  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i>          | CB 4176              | Barbados     | -      | -                    | no |
| 48  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | NG 28-083            | Nueva Guinea | -      | +                    | no |
| 49  | <i>Saccharum</i> | <i>officinarium</i> | Spaansch             |              | -      | +                    | no |

Variedades de Cuarentena cerrada evaluadas para el diagnóstico del ScBV por PCR

|     | Genero           | especie    | variedad  | origen    | simple | nested | Observación<br>síntomas |
|-----|------------------|------------|-----------|-----------|--------|--------|-------------------------|
| 50  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP93-1634 | USA       | -      | -      | no                      |
| 51  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP92-1167 | USA       | -      | -      | no                      |
| 52  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP95-1569 | USA       | -      | -      | no                      |
| 53  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP97-1944 | USA       | +      | +      | no                      |
| 54  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-2059 | USA       | -      | -      | no                      |
| 55  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP98-1497 | USA       | -      | -      | no                      |
| 56  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-1528 | USA       | -      | +      | si                      |
| 57  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP92-1213 | USA       | -      | -      | no                      |
| 58  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-2203 | USA       | -      | +      | no                      |
| 59  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP96-1865 | USA       | -      | +      | no                      |
| 60  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-1340 | USA       | -      | -      | no                      |
| 61  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP97-1777 | USA       | -      | -      | no                      |
| 62  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP93-1309 | USA       | -      | +      | no                      |
| 63  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP95-1039 | USA       | -      | -      | no                      |
| 64  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-1607 | USA       | -      | -      | no                      |
| 65  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP97-1362 | USA       | -      | -      | no                      |
| 66  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP96-1602 | USA       | -      | -      | no                      |
| 67  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP98-1481 | USA       | -      | -      | no                      |
| 68  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-2095 | USA       | -      | -      | no                      |
| 69  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP96-1252 | USA       | -      | -      | no                      |
| 70  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP98-1335 | USA       | -      | -      | no                      |
| 71  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP96-1350 | USA       | -      | -      | no                      |
| 72  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP89-1509 | USA       | -      | +      | no                      |
| 73  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP97-1979 | USA       | -      | -      | no                      |
| 74  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP94-1100 | USA       | -      | -      | no                      |
| 75  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP97-1387 | USA       | -      | -      | no                      |
| 76  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP92-1666 | USA       | -      | -      | no                      |
| 77  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP92-1641 | USA       | -      | -      | no                      |
| 78  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP98-1417 | USA       | -      | -      | no                      |
| 79  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CP95-1570 | USA       | -      | -      | no                      |
| 80  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | DB75/19   | Demerara  | -      | -      | no                      |
| 81  | <i>Saccharum</i> |            | D 158/41  | Demerara  | -      | +      | no                      |
| 82  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | BT 74209  |           | -      | -      | no                      |
| 83  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP89-1115 | Brasil    | -      | -      | no                      |
| 84  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CR90-1015 |           | -      | +      | no                      |
| 85  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | CR87-220  |           | -      | -      | no                      |
| 86  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP90-1107 | Brasil    | -      | +      | no                      |
| 87  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | BJ75-04   | Barbados  | -      | -      | no                      |
| 88  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP90-3723 | Brasil    | -      | -      | no                      |
| 89  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | M442/51   |           | -      | -      | no                      |
| 90  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | NCo 376   | India     | -      | -      | no                      |
| 91  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | DB66/113  | Demerara  | -      | +      | no                      |
| 92  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | DB71/60   | Demerara  | -      | +      | no                      |
| 93  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | X94/200   |           | -      | -      | no                      |
| 94  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP90-1638 | Brasil    | -      | -      | no                      |
| 95  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | NA 56-26  |           | -      | -      | no                      |
| 96  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | V71-51    | Venezuela | -      | +      | no                      |
| 97  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP90-3414 | Brasil    | -      | +      | no                      |
| 98  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | DB 78/69  | Brasil    | -      | +      | no                      |
| 99  | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | Co 6806   | India     | -      | +      | no                      |
| 100 | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | MANA II   |           | -      | -      | no                      |

Variedades de Cuarentena cerrada evaluadas para el diagnóstico del ScBV por PCR

|     | Genero           | especie    | variedad  | origen    | simple | nested | Observación<br>sistemas |
|-----|------------------|------------|-----------|-----------|--------|--------|-------------------------|
| 101 | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | D84/15    |           | -      | -      | no                      |
| 102 | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP86-42   | Brasil    | -      | -      | no                      |
| 103 | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | N14       |           | -      | -      | no                      |
| 104 | <i>Saccharum</i> | <i>Hyb</i> | SP91-1049 | Brasil    | -      | +      | no                      |
| 105 | <i>Saccharum</i> | <i>spp</i> | Q 190     | Australia | -      | -      | no                      |
| 106 | <i>Saccharum</i> | <i>spp</i> | Q 198     | Australia | -      | -      | no                      |
| 107 | <i>Saccharum</i> | <i>spp</i> | Q 124     | Australia | -      | -      | no                      |
| 108 | <i>Saccharum</i> | <i>spp</i> | Q 201     | Australia | -      | -      | no                      |

**Anexo 3. Variedades (15) de la colección universal del CINCAE analizadas por PCR para el ScBV.**

| <b>Numero</b> | <b>Variedades</b> | <b>Reacción</b> |
|---------------|-------------------|-----------------|
| 1             | C1051-73          | -               |
| 2             | CC85-92           | -               |
| 3             | CP 73-1547        | -               |
| 4             | CP4410            | -               |
| 5             | CP57-603          | -               |
| 6             | CP63-588          | -               |
| 7             | CR61-01           | -               |
| 8             | H50-7209          | -               |
| 9             | H56-4848          | -               |
| 10            | Mex 57-473        | -               |
| 11            | MZC74-275         | -               |
| 12            | NCO310            | +               |
| 13            | PCGA              | +               |
| 14            | POJ30-16          | -               |
| 15            | PR10-13           | -               |

**Anexo 4.** Variedades de cultivo de tejidos analizadas por PCR

|  | Variedad     | Código | Simple | Necesos |
|--|--------------|--------|--------|---------|
| CINCAE   | Ecsp-98/499  | 4      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/425  | 3      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/392  |        | -      | -       |
|  | Ecsp-98/127  |        | -      | -       |
|  | Ecsp-98/168  | 3      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/149  |        | -      | -       |
|  | Ecsp-98/419  |        | -      | -       |
|  | Ecsp-98/169  |        | -      | -       |
|  | Ecsp-98/499  | A      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/169  | 1      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/168  | 2      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/169  | 2      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/168  | 3      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/425  | 4      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/499  | 6      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/392  | 7      | -      | -       |
|  | Ecsp-98/392  | 9      | -      | -       |
| Lote de incremento de semillas clones estado IV 1998 |              |        |        |         |
|  | RAGNAR       | A      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | B      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | C      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | D      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 9      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 3      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 11     | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 18     | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 22     | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 30     | -      | -       |
|  | RAGNAR       | W      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | X      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | K      | -      | -       |
|  | RAGNAR       | 33     | -      | -       |
|  | CC 85-92     |        | -      | -       |
|  | B 7678       |        | -      | -       |
| Cerrada  | PR 1152      |        | +      | +       |
|  | HM611        |        |        |         |
|  | 1995:R45-P78 |        | +      | +       |
|  | POJ 2946     |        |        |         |
|  | CP 97-1944   |        |        |         |
|  | CP 94-2203   |        |        |         |
|  | CP 96-1865   |        |        |         |
|  | SP 86155     |        |        |         |
|  | SP85-3877    |        |        |         |
|  | SP 841431    |        |        |         |
|  | SP845560     |        |        |         |
|  | SP87399      |        |        |         |
|  | SP855560     |        |        |         |
|  | SP873344     |        |        |         |

### Anexo 5. Extracción de ADN por el método de Dellaporta *etal* (1983), modificado.

1. Macerar el tejido joven en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco
2. Pesar 3 g por muestra y llevarla a tubos de centrifuga.
3. Añadir 7 ml de buffer de extracción previamente calentado a 65°C por media hora y mezclar con la espátula, asegurándose de que todo el tejido entre en contacto con el buffer.
4. Incubar en baño de agua a 60 °C, a 60 oscilaciones por min durante 30 minutos.
5. Adicionar un volumen de 7 ml de una mezcla de cloroformo: octanol en una relación 24:1 mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 4000 rpm por 5 min a 4°C, recuperar de nuevo la fase acuosa, tratar de no tocar la interfase.
7. Adicionar a cada muestra 1/10 (0.5 ml) de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 6/10(3 ml) de isopropanol a -20°C
8. Incubar a -20 °C mínimo durante dos horas, máximo toda la noche.
9. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 min; descartar el sobrenadante.
10. Agregar 3 ml de etanol al 70% a -20 °C y centrifugar a 10000 rpm durante 15 min.
11. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos en forma invertida sobre una toalla de papel hasta secar, los tubos se llevan a la campana de vacío hasta que se sequen por completo.
12. El precipitado se redisuelve en 0.5 ml de agua bidestilada-desionizada esteril y cada muestra se guarda en tubos ependorf.
13. Para degradar posible RNA que se tenga en las muestras se adicionan 0.5 ml de la enzima RNasa.

La visualización y cuantificación del ADN se hizo por electroforesis en un gel de azarosa al 1% utilizando el buffer TAE (TRIS acetato, EDTA pH 8), adicionando bromuro de etidio como colorante para observar en el transiluminador Fotodyne de luz ultravioleta.

#### Buffer de extracción

|          |  |
|----------|--|
| Tris-HCl | 150 mM                                 |
| EDTA     | 15 Mm                                  |
| CINa     | 1 M                                    |
| CTAB     | 1.5 %                                  |
| PVP      | 1 %* se agrega antes de usar el buffer |

## **Anexo 6. Protocolo de Extracción de ADN para caña de azúcar libre de polisacáridos y polifenoles.**

Por S.M. ALJANABI, L. FORGET and A. DOOKUN

Buffer lisis (200 mM Tris HCl, 50 mM, EDTA, 2.2 M ClNa, 2% CTAB, 0.06 % S<sub>0</sub>Na, pH 8.0

Fenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1)

6 M ClNa

10 % polyvinylpyrrolidone (PVP)

5 % N-Lauroyl-Sarcosine

20 % CTAB:

### **Procedimiento:**

1. Pesar alrededor de 2-4 g de tejido de caña de azúcar macerar con nitrógeno líquido
2. Adicionar 4 ml de de buffer lisis. adicionar 2 ml de 5% N-Lauryl-Sarcosine, 2 ml de 10 % PVP Y 2 ml de 20 % de CTAB. Mezclar.
3. Incubar por 30-60 min a 65°C a baño maría
4. Mezclar las muestras por inversión de 3 a 4 veces durante la incubación
5. Después de la incubación dejar a temperatura ambiente por unos minutos
6. Adicionar igual volumen de 25:24.1 de fenol cloroformo isoamyl alcohol, mezclar por inversión, centrifugar los tubos a 300 g por 10 min a 4°C.
7. Recuperar la fase acuosa y transferir a otro tubo.
8. Adicionar igual volumen isopropanol y 2 ml de ClNa 6 M
9. Incubar a -20 °C por una hora.
10. Centrifugar
11. Desechar el sobrenadante y adicionar 10 ml de etanol 70% centrifugar a bajas revoluciones
12. Repetir el paso anterior
13. Resuspender el ADN en 2 o 3 ml de TE (10 mM de Tris -HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

## Anexo 7. Extracción de ADN de caña de azúcar

Ref: Jhingan (1992) y Dellaporta(1983)

Por E. Morillo V

(INAP-Quito, 1999)

Se probaron los protocolos de Jhingan (1992) y Dellaporta(1983), los cuales se basan en la extracción con PotasioEtil Xantogenato y CTA., respectivamente. Además se probó la acción de dos agentes antioxidantes (metabisulfito de sodio y  $\beta$ -mercaptoetanol) y la extracción a partir del tejido foliar Fresco o seco. Los mejores resultados se obtuvieron combinando los dos protocolos.

### SOLUCIONES NECESARIAS

**CTAB 2X** (Para 100 ml)

**Buffer de lisis** (Sorbitol 140 mM, Tris -HCl 220 mM, EDTA 22 mM, ClNa 800 mM, CTAB. 1,6% Sarkosyl 1%)  $\beta$ -mercaptoetanol (se agrega justo antes de usar el buffer)

### Procedimiento

- 1- Sembrar esquejes de cada clon en el invernadero. A los quince días tomar entre 4 y 6 g de hojas y colocarlas en fundas plásticas con 50-60 g de silica gel por una semana.
- 2- Combinar en un tubo de 1.5 ml 100 mg de tejido seco macerado con un ml de CTAB. 2X y 10 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- 3- Incubar la muestra homogenizada a 55°C por 20 min centrifugarla a 14000 rpm por 20 min.
- 4- Transferir el sobrenadante (aprox.400  $\mu$ l) a un nuevo tubo conteniendo igual volumen de cloroformo; alcohol isoamilico 24:1(CIA) agitar y centrifugar a 14000 rpm por 2 min
- 5- Pipetear el sobrenadante teniendo cuidado de separar la interfase formada y combinarla en un nuevo tubo con un volumen de isopropanol.
- 6- Dejar precipitar el ADN por una noche a -20°C, y centrifugar a velocidad tope por 3 min.

- 7- Lavar dos veces el ADN con etanol 70% y secar el pellet a 37°C en una microestufa por 30 min o a TA por una hora.
- 8- Incubar el pellet por una hora a 65°C en 50 µl de buffer TE (Tris -HCl 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0) con 1 µl de Rnsa (10 µg/ml).
- 9- Almacenar a -20 °C la solución de ADN hasta su cuantificación.
- 10- Antes de cuantificar las soluciones, es conveniente centrifugarlas a 14000 rpm por 1 min .En este punto se puede observar precipitación de soluciones contaminantes como proteínas, si esto sucede retirar la solución de ADN a un nuevo tubo y cuantificar.

**Anexo 8. Modelo matemático y ANDEVA de las metodologías probadas en la extracción de ADN**

Modelo matemático:  $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

**Donde:**

- $Y_{ij}$  : Observación correspondiente a los tratamientos
- $\mu$  : Media de la población
- $T_i$  : Efecto del tratamiento sobre la media
- $E_{ij}$  : Error del efecto aleatorio

**ANDEVA**

| Fuente de variación      | Grados de libertad |    |
|--------------------------|--------------------|----|
| Tratamiento (protocolos) | t-1                | 3  |
| Error                    | t(r-1)             | 12 |
| Total                    | t x r -1           | 15 |

Análisis de varianza de las metodologías probadas en la extracción ADN

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | F - Calculada | Probabilidad |
|---------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------------|--------------|
| Tratamiento         | 3                  | 6.289             | 2.096          | 70.309        | **           |
| Error               | 12                 | 1.178             | 0.03           |               |              |
| Total               | 15                 | 8.078             |                |               |              |

\*\* diferencia altamente significativa

Coefficiente de variación: 14.16%

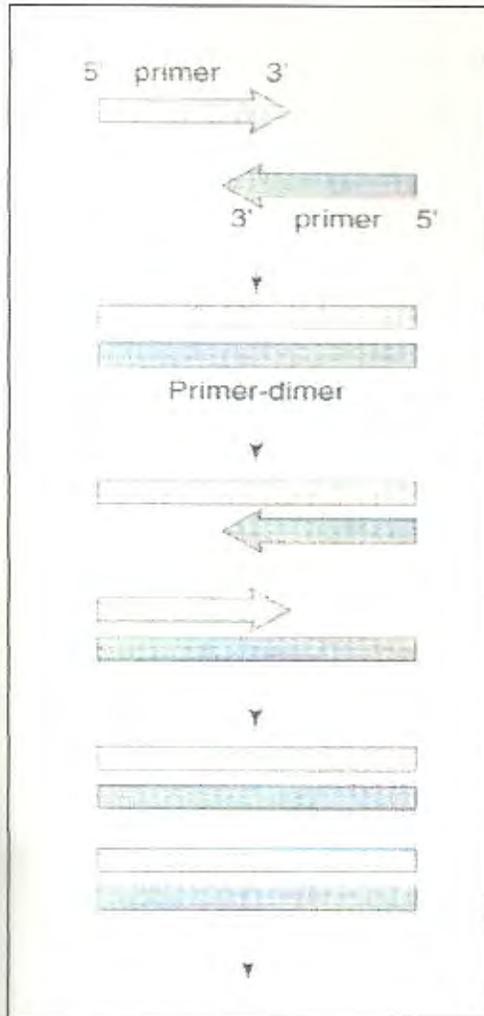
Comparación de medias de metodologías de extracción de ADN

| Metodología                         | Media * |
|-------------------------------------|---------|
| 4 Combinación de protocolos (2 y 3) | 46.25 a |
| 2 Doyle & Doyle, modificado (1990)  | 34.38 b |
| 3 E. Morillo V. (1999)              | 34.38 b |
| 1 Dellaporta (1983)                 | 7.19 c  |

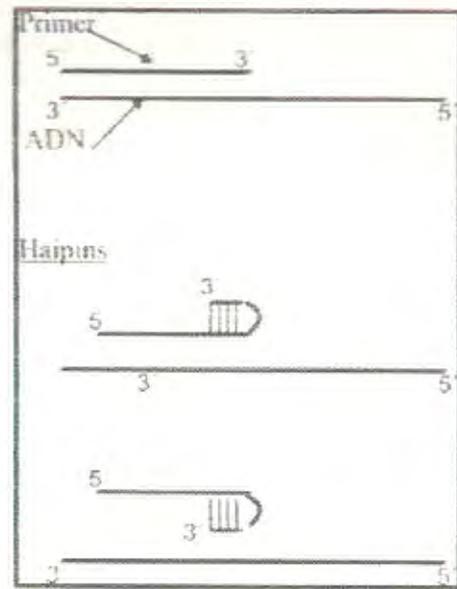
\* Duncan < 0.05

Anexo 9. Esquema de primer dimeros (A) y hairpin (B y C)

A)



B)



C)

