



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ESTIMACIÓN DE NIVELES DE RESISTENCIA AL VIRUS
DE LA HOJA AMARILLA (SCYLV) MEDIANTE LA
TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR) EN
VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR**

CAROLINA CARDOZO BURGOS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Departamento Ciencias Agrarias
Ciudad, Colombia
2017

**ESTIMACIÓN DE NIVELES DE RESISTENCIA AL VIRUS
DE LA HOJA AMARILLA (SCYLV) MEDIANTE LA
TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR) EN
VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR**

Carolina Cardozo Burgos

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de:

Doctorado en Ciencias Agrarias

Director (a):

Ph.D. Fitopatología, Carlos Ariel Ángel Calle

Codirector (a):

Ph.D. Fitopatología, Carlos Germán Muñoz Perea

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos - Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Departamento Ciencias Agrarias
Ciudad, Colombia
2017

Dedicatoria

Al Amor, que es mi Dios, a los ángeles, maestros de luz y maestros terrenales que acompañan mi caminar.

A mi hijo, mi amor a primera vista, mi maestro de vida, mi motor.

A mi esposo, mi compañero de viaje, mi gran amor, mi confidente.

A mis padres, mi guía, mi ejemplo, mi orgullo, mi amor incondicional.

A mi familia Cardozo y Burgos, por ser mi soporte en los momentos difíciles y en mis alegrías.

A mis amigos, por su apoyo, comprensión y sonrisas.

Caβμ

Agradecimientos

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias por el apoyo a través del financiamiento de mis estudios doctorales.

Al personal directivo, administrativo, profesional y técnico del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar en Colombia, por su apoyo incondicional en todo el proceso de generación y desarrollo de este proyecto de grado.

A mi director de tesis Carlos Ariel Ángel y mi co-director Carlos Germán Muñoz, por todo su apoyo y paciencia en estos cuatro años de aprendizaje.

Al Dr. Dimitre Mollov en el National Germplasm Resources Laboratory (Plant Pathology) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en Beltsville (Maryland, Estados Unidos), quien proporcionó la secuenciación de siguiente generación (NGS) para las muestras de las cuatro variedades de caña evaluadas

Al Dr. Carlos Ernesto Maldonado L., Investigador Científico de la Disciplina de Mejoramiento Genético del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFÉ), en Chinchiná (Caldas), quien colaboró en los análisis bioinformáticos de las secuencias para el ensamblaje y filogenia de los genomas de SCYLV

Resumen

La enfermedad de la hoja amarilla en caña de azúcar (SCYLV), es causada por el *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (SCYLV) el cual pertenece al género Polerovirus de la familia *Luteoviridae* y es una enfermedad limitante en países productores de este cultivo debido a la disminución de parámetros de desarrollo y por ende en la productividad (biomasa y sacarosa). La detección de esta enfermedad a edad temprana en semilleros, es necesaria para la toma de decisiones al momento del establecimiento de los cultivos comerciales; sin embargo, al contar con variedades asintomáticas al virus, se necesita el uso de herramientas de diagnóstico rápidas, confiables, de alta sensibilidad y cuantitativas. Este trabajo, a través de la técnica molecular RT-PCR en tiempo real vía cuantificación absoluta, desarrolló un modelo para la cuantificación del número de copias de la carga viral a partir de un fragmento del virus. Con este modelo, se logró establecer las curvas de progreso de la enfermedad a través del tiempo de cultivo en cuatro variedades comerciales de alta importancia en Colombia: CC 01-1940, CC 84-75, CC 85-92 y V 71-51 y se determinó su relación con variables de desarrollo y productividad. Adicional a esto, se compararon las metodologías actualmente empleadas en el país para el diagnóstico del SCYLV, demostrando el gran potencial de tiempo real. Finalmente, utilizando metodologías de secuenciación masiva, se determinaron los genomas del SCYLV presentes en estas variedades y se realizó el ensamblaje y comparación filogenética con la diversidad existente en otras regiones del mundo.

Palabras clave: SCYLV, Curvas de Progreso, tasa de acumulación, biomasa, sacarosa, análisis filogenético.

Abstract

Sugarcane Yellow Leaf Disease is caused by a virus with the same name (Sugarcane Yellow Leaf Virus, SCYLV), which belongs to the Polerovirus genus and Luteoviridae family. It is considered a limiting disease in many cane producing countries due to its negative impacts on crop development and diminishing yield and productivity (biomass and sugars). Detection of this disease at early stages, especially at nurseries, it is critical for decisions making about commercial cane crops establishment. However, because common occurrence of asymptomatic virus-diseased varieties, faster, reliable, highly sensitive, and as much as possible quantitative diagnostic techniques are required. In this study, by using the molecular technique Reverse Transcription - quantitative PCR (RT-qPCR) or real time PCR for absolute quantitation, a mathematical model was developed to quantify the number of copies for virus titer or viral load from a virus genome fragment. With this model, disease progress curves were established along the crop's time course and development in four commercial cane varieties with high past and current importance for this agroindustry in Colombia: CC 01-1940, CC 84-75, CC 85- 92 y V 71-51. In addition, the relationship of viral titer with plant development and productivity variables was also established. On the other hand, SCYLV diagnostic methods currently used in Colombia were compared, demonstrating the significant advantage, high sensitivity capability and potential for RT-qPCR usage. Finally, by using next generation sequencing technology, *de novo* genomes for SCYLV isolates obtained from these four varieties were obtained and assembled, and alignments and phylogenetic analysis indicated that they were different from SCYLV isolates from other countries.

Keywords: Sugarcane, SCYLV, disease progress, virus accumulation, biomass, sugars, genomes, phylogeny.

Introducción

El cultivo de la caña de azúcar es un renglón de gran importancia para la economía colombiana, el cual se desarrolla intensamente en el valle geográfico del río Cauca por 15 ingenios ubicados desde el Departamento del Cauca hasta Risaralda con aproximadamente 232.070 ha con una producción de 15,5 toneladas de azúcar por hectárea (Asocaña, 2016). Otros subproductos como el bioetanol, reportó 456.403 millones de litros y en la cogeneración se indica el aumento de 114MW en el 2009 a 237MW para el año 2015 (Asocaña, 2016).

El Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia – Cenicaña, como ente de investigación y desarrollo tecnológico asociado al Sector Azucarero Colombiano, ha enfocado esfuerzos significativos en la generación de variedades altamente productivas para las diferentes zonas agroecológicas que se encuentran en la región, específicamente, variedades resistentes a las principales enfermedades de mayor importancia económica, como la roya café, la roya naranja, el carbón y el virus del mosaico. Adicionalmente se evalúan el raquitismo de la soca, la escaldadura de la hoja y el virus de la hoja amarilla, entre otros.

El virus de la hoja amarilla (SCYLV), se ha convertido desde 1998 hasta la actualidad, en una de las enfermedades con mayor potencial de impacto no solo para Colombia, sino también para todos los países cultivadores de caña de azúcar. Por tal razón, además de realizar investigaciones sobre su diagnóstico y manejo preventivo en los lotes comerciales y de semilleros, Cenicaña ha incrementado sus esfuerzos para la búsqueda de información que permita evaluar y mostrar el comportamiento del agente causal en el tiempo y su relación con la productividad de las variedades de caña de azúcar establecidas por la industria, con miras a incorporar elementos de resistencia genética en el desarrollo de las variedades CC (Cenicaña- Colombia).

La técnica de la PCR en tiempo real, además de lograr un diagnóstico rápido, confiable, altamente sensible y específico, ha permitido dilucidar el comportamiento de diferentes patógenos entre ellos los de tipo viral en animales y plantas, y su cuantificación relativa y absoluta en la dinámica en la acumulación a través del tiempo.

Por medio de este trabajo, se usó la herramienta de cuantificación absoluta de la RT PCR en tiempo real, para generar un modelo de cuantificación de la carga viral. Con este modelo, se realizaron las curvas de progreso de virus causante de la enfermedad SCYLV y se calcularon las tasas de acumulación en el tiempo, para las variedades CC01-1940, CC84-75, CC85-92 y V71-51 de alta importancia histórica y actual para Colombia. Con las curvas de progreso, se pudo determinar la acumulación del patógeno en las distintas etapas de desarrollo fenológico del cultivo desde su siembra hasta la producción de semilla vegetativa y la cosecha para fines industriales, y se estableció la relación entre la carga viral con variables de crecimiento como población de tallos y altura, y también se analizó la posible relación entre con las variables de productividad biomasa, contenido de sacarosa (% caña), grados Brix y porcentaje de fibra.

Se encontró, que el patógeno, tuvo un comportamiento diferente en cada una de las variedades con algunas similitudes en la etapa de crecimiento rápido de la planta, donde se encontró el mayor pico de concentración para las variedades CC 01-1940 y V 71-51, que fueron las variedades con mayor título viral para los tres ensayos evaluados. Así mismo se encontró que las variedades CC 84-75 y CC 85-92, presentaron bajas concentraciones del virus, el cual se mantenía a través del tiempo. Para las variables de crecimiento (población y altura), en general, las plantas sanas presentaron mayor longitud y número de tallos en plantas sanas, con algunas excepciones. Las variables de productividad, no mostraron diferencias estadísticas; sin embargo, la variable biomasa (kg), fue inferior en plantas infectadas con SCYLV.

Con el soporte de la técnica next generation sequencing, se pudo comprobar la amplia diversidad genética de este virus en las muestras evaluadas, determinado cuatro genomas totalmente diferentes para cada una de las variedades CC 85-92, CC 84-75, CC 01.1940 y V 71-51, con tamaños de 5.827nt, 5.861nt, 5.856nt y 5.858nt respectivamente, siendo los primeros genomas completos de SCYLV para Colombia.

Finalmente, entre las tres técnicas de diagnóstico evaluadas, se encontró que de 19 muestras diagnosticadas como positivas a PCR en tiempo real, solo 9 fueron positivas

para TBIA y 1 para RT – PCR a una concentración de 10ng/reacción, mostrando la alta sensibilidad y confiabilidad de la técnica.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se cumple la hipótesis nula del objetivo general, dado que el comportamiento de cada variedad fue diferente, por lo tanto se obtuvo cuatro modelos importantes para la evaluación de germoplasma en los procesos de mejoramiento genético.