

Tesis Doctoral

Desarrollo de caña de azúcar transgénica resistente al Sugarcane mosaic virus (SCMV) y al Sorghum mosaic virus (SrMV) por silenciamiento génico

Gómez, Maximiliano

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gómez, Maximiliano. (2012). Desarrollo de caña de azúcar transgénica resistente al Sugarcane mosaic virus (SCMV) y al Sorghum mosaic virus (SrMV) por silenciamiento génico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gómez, Maximiliano. "Desarrollo de caña de azúcar transgénica resistente al Sugarcane mosaic virus (SCMV) y al Sorghum mosaic virus (SrMV) por silenciamiento génico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Desarrollo de caña de azúcar transgénica resistente al *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y al *Sorghum mosaic virus* (SrMV) por silenciamiento génico

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Maximiliano Gómez

Director de Tesis: Dra. Mariana del Vas
Director asistente: Dr. Germán Serino
Consejero de estudios: Dr. Esteban Hopp

Lugar de trabajo:
Chacra Experimental Agrícola Santa Rosa, Salta

Buenos Aires, 2012

Desarrollo de caña de azúcar transgénica resistente al *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y al *Sorghum mosaic virus* (SrMV) por silenciamiento génico

Resumen:

El desarrollo de plantas transgénicas que explotan el mecanismo de silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico (SCMV y SrMV) representa una interesante estrategia alternativa a los métodos de mejoramiento genético clásico. Sin embargo hasta el momento dichas estrategias han sido implementadas en base al conocimiento de unas pocas secuencias virales, lo que incrementa la posibilidad de que la resistencia sea quebrada por variantes poco frecuentes del virus. Se desarrolló un protocolo simple, rápido y económico diseñado para obtener secuencias virales a partir de un gran número de hojas de caña sintomáticas. Utilizando dicho protocolo se analizó la estructura poblacional de los virus causales del mosaico de la caña de azúcar en la Argentina y las áreas cañeras limítrofes de Bolivia, Uruguay y Paraguay, incluyendo 103 sitios de muestreo. Se analizaron 567 muestras sintomáticas por RT-PCR (pertenecientes a 104 genotipos de caña de azúcar) amplificando un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV con iniciadores reportados en la literatura. Los productos de amplificación fueron secuenciados directamente. El análisis de las secuencias virales determinó que el principal agente causal de mosaico en la región es el SCMV, presente en 94% de las muestras. El SrMV estaba presente en solo 2,8% de las muestras, con bajos porcentajes de coinfección de los dos virus (0,5%). Las secuencias fueron analizadas filogenéticamente y clasificadas en cuatro grupos virales utilizando un valor de corte de 0,91 de identidad de secuencia, con un nuevo grupo viral (W) propuesto dentro de la clasificación del SCMV reportada en la literatura. Se diseñó un transgén de resistencia para desencadenar el silenciamiento génico contra todas las variantes virales encontradas en el muestreo realizado. Se seleccionaron tres fragmentos del genoma viral evolutivamente conservados: parte del gen P3 (función probables de anclaje a membrana del complejo de replicación) y dos fragmentos no homólogos del gen de la proteína de cápside, para ser clonados en direcciones opuestas a ambos lados de un intrón (construcción tipo horquilla), bajo la dirección del promotor del gen de la ubiquitina de maíz. Se obtuvieron plantas transgénicas de cinco variedades de caña de azúcar de interés comercial y fueron desafiadas con el SCMV en un ensayo de

inoculación artificial en invernáculo y en un ensayo a campo bajo condiciones naturales de infección en la Chacra Experimental (provincia de Salta). Resultados preliminares indican la ocurrencia de eventos resistentes a la infección con mosaico de cuatro variedades de caña. El análisis molecular de un grupo de eventos es consistente con una resistencia mediada por silenciamiento génico. Se planea la realización de ensayos a campo para confirmar el fenotipo de resistencia a mosaico e identificar eventos que conserven las características agronómicas del genotipo transformado.

Palabras claves: diversidad genética del mosaico, muestreo viral a gran escala, transformación de plantas, PTGS, ensayo en invernáculo y a campo.

Development of transgenic sugarcane resistant to *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) and *Sorghum mosaic virus* (SrMV) by gene silencing

Abstract:

Attractive alternatives to traditional resistance breeding in sugarcane against sugarcane and sorghum mosaic virus (SCMV and SrMV, respectively), both causal agents of mosaic disease, have derived from transgenic approaches exploiting gene silencing. Such approaches, however, have been implemented based upon relatively few available virus sequences, therefore it is possible that infrequent variants escape gene silencing and break resistance. We developed a simple, fast and economic protocol designed to obtain viral sequences from a large set of symptomatic sugarcane leaf samples. Using this protocol, we estimated the population structure of potyviruses causing sugarcane mosaic disease throughout the sugarcane growing area of Argentina and neighboring regions in Bolivia, Uruguay and Paraguay by analyzing sugarcane leaf samples showing mosaic symptoms from 103 locations, including commercial and experimental fields. A set of 567 samples from 104 sugarcane genotypes were extracted and analyzed for the presence of a genomic fragment including most of the SCMV and SrMV coat protein coding regions by RT-PCR using reported sets of primers. PCR products were directly sequenced using the same amplification primers. Sequence analysis demonstrated that SCMV is the predominant mosaic virus infecting sugarcane in the region, and is present in 94% of the samples. SrMV was present only in 2.8% of samples, with low (0.5%) coinfection rates. Sequences were subject to phylogenetic analysis and classified into four viral groups using a 0.91 nucleotide identity cutoff, and a new group (W) was proposed to be included in the SCMV classification previously reported. A resistance transgene was designed to trigger silencing mediated resistance against all virus variants found in the large scale survey. Three viral fragments: a P3 gene fragment and two non-overlapping fragments from the coat protein gene, were cloned in opposite directions separated by an intron in a hairpin construct, and placed under the maize UBI promoter.

Transgenic sugarcane plants belonging to 5 varieties were obtained and putative events were tested in the greenhouse with artificial inoculation and in a field trial at Chacra Experimental (Salta province) under natural infection conditions. Preliminary results indicate the occurrence of events from four sugarcane varieties that are resistant to mosaic infection. Preliminary molecular analysis are consistent with a resistance mechanism mediated by gene silencing. Further analysis are needed to identify resistant events that have a good agronomic performance as well.

Keywords: large scale viral sampling, mosaic genetic diversity, coat protein, plant transformation, PTGS, greenhouse and field performance.

Agradecimientos:

Quisiera agradecer especialmente a mi mujer y a mi familia por haberme apoyado todo este tiempo para concretar el gran esfuerzo que implica realizar un doctorado.

También quisiera agradecer a la Chacra Experimental y su staff por haberme dado la oportunidad de completar mi formación y crecer profesionalmente.

Finalmente, quiero agradecerles a los directores de mi Tesis por su guía y apoyo.

Publicaciones generadas a partir de este trabajo de Tesis:

1) Publicaciones originales en revistas internacionales con referato:

- GÓMEZ, M., RAGO, A. M. y SERINO, G. 2009. Rapid identification of viruses causing sugarcane mosaic by direct sequencing of RT-PCR products from crude extracts: A method for large scale virus surveys. *J Virol Methods*, 157, 188-194.

Asimismo, se está concluyendo la redacción de un manuscrito cuyo título es “Large Scale Mosaic Virus Survey in Sugarcane Reveals Considerable Genetic Variability; Implications for the Design of a Resistance Gene Mediated by RNA Silencing” y cuyos autores serán: Maximiliano Gómez., Alejandro Mario Rago, Mariana del Vas, Daniel Silhavy y Germán Serino.

2) Presentaciones en Congresos Internacionales:

- Gómez, M., Rago, A.M., del Vas M., Silhavy D. and Serino, G., 2011. Large scale mosaic virus survey in sugarcane reveals considerable genetic variability; implications for the design of a resistance gene mediated by RNA silencing. Presentación oral en el X Taller de Germoplasma y Mejoramiento y VII de Biología Molecular del ISSCT, Maceió, Brasil. 15 al 20 de Mayo 2011.
- Gómez, M., Rago, A. and Serino G. 2008. A survey of the causal agent of sugarcane mosaic in Argentina and neighboring regions. Presentación oral. Proceedings: ISSCT IX Plant Pathology and VI Molecular Biology Workshop, Cali, Colombia. 23 - 27 June, 2008. N° 17.

3) Presentaciones en Congresos Nacionales:

- Gómez, M., Rago, A.M., del Vas M., Silhavy D. and Serino, G., 2012. Desarrollo de caña de azúcar transgénica resistente al virus del mosaico. Presentación oral en el XVIII Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar. Organizado por la SATCA (Sociedad Argentina de Técnicos de la Caña de Azúcar), San Miguel de Tucumán, Argentina. 11 al 13 de Abril de 2012.
- Gómez, M., Rago, A.M. y Serino, G., 2008. Diagnóstico rápido de variantes del virus del mosaico de la caña de azúcar por secuenciación. Primer Congreso Argentino de Fitopatología, Córdoba, Argentina. Mayo de 2008. Libro de resúmenes pag 267, ISBN 978-987-24373-0-51.
- Gómez, M., Rago, A.M. y Serino, G., 2008. Los agentes causales del mosaico en Argentina y regiones cañeras limítrofes. XV Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar, Tucumán, Argentina, 2008.

Índice de Contenidos

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Agradecimientos.....	6
Publicaciones generadas a partir de esta Tesis.....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	11
Abreviaturas.....	14
Introducción.....	15
I.1. La caña de azúcar, origen, explotación comercial y mejoramiento genético.....	16
I.2. Enfermedades de la caña de azúcar; fúngicas, bacterianas y virales.....	20
I.3. Enfermedad del mosaico de la caña de azúcar.....	21
I.4. Mosaico causado por el SCMV y el SrMV.....	23
I.4.1. Hospedadores, importancia económica, áfidos vectores, epidemiología y sintomatología en caña de azúcar.....	23
I.4.2. Características moleculares del SCMV y del SrMV.....	27
I.4.3. Variabilidad genética y clasificación de aislamientos del SCMV y del SrMV.....	28
I.5. Protocolos rápidos para la obtención de secuencias de virus que infectan plantas...31	
I.6. Biotecnología aplicada a la caña de azúcar y desarrollo de plantas transgénicas...33	
I.6.1 Cultivo de caña de azúcar <i>in vitro</i>	34
I.6.2. Resistencia a virus mediada por silenciamiento génico.....	36
I.6.3. Antecedentes de caña de azúcar transgénica resistente o tolerante a virus.....	39
I.6.4. Evaluación de las plantas transgénicas con resistencia o tolerancia a virus.....	41
I.7. Objetivos de la presente Tesis.....	44
Capítulo I.....	46
Objetivos.....	47
I. Resultados.....	48
1.1. Determinación de las condiciones adecuadas para la preparación de la muestra y para conservar la estabilidad del mRNA viral.....	49
1.1.1. Determinación de la posición óptima de muestreo a lo largo de la hoja +1 para la detección viral por RT-PCR.....	49
1.1.2. Almacenamiento de las muestras de hoja de caña.....	50
1.1.3. Determinación de las condiciones adecuadas para el almacenamiento del extracto de hojas de caña para la detección viral por RT-PCR.....	51
1.2. Determinación de las condiciones que afectan la reacción de RT-PCR del SCMV.....	52
1.2.1. Buffer de RT-PCR.....	52
1.2.2. Condiciones de la reacción de RT-PCR.....	53
1.3. Límite de detección de la RT-PCR.....	55
1.4. Secuenciación directa de productos de la RT-PCR.....	56
I. Discusión y Conclusiones.....	57

Capítulo II.....	62
Objetivos.....	63
II. Resultados.....	64
2.1. Muestreo a gran escala de caña de azúcar con síntomas de mosaico.....	64
2.2. Diagnóstico del SCMV y del SrMV por RT-PCR.....	66
2.3. RT-PCR con iniciadores para SCSMV.....	67
2.4. Secuenciación de los productos de la RT-PCR del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV.....	68
2.5. Construcción de matrices de identidad como primera herramienta de análisis de las secuencias obtenidas.....	69
2.6. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV.....	70
2.6.1. Construcción de un árbol filogenético a partir del gen de la proteína de cápside del SrMV.....	71
2.6.2. Construcción de un árbol filogenético a partir del gen de la proteína de cápside del SCMV.....	72
2.7. Estructura poblacional de los virus del mosaico en las regiones muestreadas.....	75
2.8. Secuenciación de un fragmento del gen P3 del SCMV y del SrMV.....	76
2.9. Secuenciación del genoma completo de dos muestras del SCMV.....	79
II. Discusión y Conclusiones.....	83
Capítulo III.....	89
Objetivos.....	90
III. Resultados.....	91
3.1. Diseño de construcciones adecuadas para desencadenar silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico en plantas de caña transgénicas.....	91
3.2. Obtención de construcciones para desencadenar silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico.....	93
3.3. Transformación biolística de variedades de caña de azúcar susceptibles al mosaico.....	95
3.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de caña de azúcar.....	96
3.3.2. Transformación de callos de caña de azúcar por biobalística.....	96
3.3.3. Rusticación de plantines transgénicos putativos de caña de azúcar.....	101
3.4. Confirmación de la transgénesis de un subconjunto de eventos putativos regenerados.....	101
III. Discusión y Conclusiones.....	102
Capítulo IV.....	107
Objetivos.....	108
IV. Resultados.....	109
4.1. Evaluación del comportamiento de las líneas transgénicas obtenidas frente a la inoculación artificial con el SCMV en invernáculo.....	110
4.2. Evaluación del comportamiento de las líneas transgénicas obtenidas frente al SCMV bajo condiciones naturales de infección a campo.....	113
4.3. Confirmación de la transgénesis de un subconjunto de los eventos putativos a campo por PCR.....	119
4.4. Análisis de la expresión del casete de resistencia a virus por RT-PCR.....	121
4.5. Detección del ARN mensajero transcrito a partir del casete de resistencia	

a virus en cañas transgénicas por “Northern blot”.....	123
4.6. “Northern blot” para detectar ARN pequeños generados partir del casete de resistencia a virus en cañas transgénicas.....	123
IV. Discusión y Conclusiones.....	125
Conclusiones generales.....	130
Materiales y Métodos.....	135
1. Colección de muestras a campo.....	135
2. Extracción de ácidos nucleicos.....	135
3. Protocolo de RT-PCR de fragmentos del genoma viral.....	135
3.1. Amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y SrMV para diagnóstico.....	135
3.2. Amplificación de los genes HC-Pro y P3 del SCMV y del SrMV.....	136
3.3. Amplificación de los genes N1b y CP completos y de la región 3` UTR del SCMV.....	136
3.4. Amplificación del gen de la proteína de cápside de SCSMV.....	136
4. Protocolo rápido de extracción viral.....	136
5. Detección de SCMV por métodos serológicos.....	137
6. Secuenciación.....	137
6.1. Secuenciación de los productos de RT-PCR.....	137
6.2. Secuenciación del genoma completo de SCMV.....	137
7. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	138
8. Clonado de un transgén de resistencia al mosaico.....	138
9. Cultivo de tejidos de caña de azúcar y transformación.....	141
9.1. Obtención de callos de caña para transformación biobalística.....	141
9.2. Transformación por biobalística.....	141
9.3. Expresión transitoria del gen reportero <i>uidA</i>	142
10. Caracterización molecular de los eventos de caña de azúcar transgénicos.....	142
10.1. Confirmación de la transgénesis por PCR.....	142
10.2. Confirmación de la expresión del casete de resistencia viral por RT-PCR en caña de azúcar transgénica.....	143
10.3. Análisis de la transcripción del casete de resistencia a virus mediante “Northern blot”.....	143
10.4. Detección de ARNs pequeños derivados del casete de resistencia viral por “Northern blot”.....	143
11. Inoculación artificial de plantas de caña de azúcar en invernáculo con SCMV.....	144
12. Evaluación a campo de la resistencia a mosaico de las plantas transgénicas obtenidas.....	144
Bibliografía.....	145
Apéndice I.....	158

Índice de Tablas

Tabla I.1. Enfermedades virales que resultan en síntomas de mosaico en caña de azúcar.....	23
Tabla I.2. Genes identificados en el genoma viral de SCMV y SrMV y su probable función	28
Tabla 2.1. Distribución geográfica de muestras de hoja de caña de azúcar con síntomas de mosaico.....	66
Tabla 2.2. Resultados de amplificaciones por RT-PCR para el SCMV, el SrMV e iniciadores degenerados para potyvirus que infectan poáceas.....	67
Tabla 2.3. Matriz de identidad de un fragmento del gen P3 del SCMV a partir de un grupo seleccionado de muestras.....	77
Tabla 2.4. Secuencias aminoacídicas deducidas y posición de corte proteolítico en dos genomas completos del SCMV: ARG-1662 y ARG-915.....	80
Tabla 2.5. Dominios consenso y función putativa presentes en dos muestras de SCMV: ARG-1662 y ARG-915	80
Tabla 3.1. Fragmento viral seleccionado para ser clonado en la construcción de resistencia a virus.....	92
Tabla 3.2. Principales características de los plásmidos de transformación obtenidos...	95
Tabla 3.3. Resumen de los experimentos de transformación de cinco variedades de caña de azúcar con el plásmido pUBI VIR3 NptII.....	100
Tabla 3.4. Número de eventos y plantines rusticados y porcentaje de supervivencia para cinco variedades de caña de azúcar transformadas	100
Tabla 3.5. Análisis por PCR de plantines transgénicos putativos transformados con la construcción pUBI VIR3 NptII.....	102
Tabla 4.1. Porcentaje de adopción de las variedades de caña seleccionadas para ser transformadas y respuesta ante el mosaico.....	109
Tabla 4.2. Resultado del ensayo de inoculación artificial de plantas transgénicas.....	111
Tabla 4.3. Resultado de la evaluación visual de sintomatología de mosaico a los 140 días posplantación del ensayo a campo	116
Tabla 4.4. Intervalos de confianza al 95% para la proporción de plantas sanas en controles no transgénicos del ensayo de infección natural a campo.....	118
Tabla 4.5. Evaluación estadística de los eventos según su comportamiento con respecto a los controles no transgénicos en el ensayo de infección natural a campo...	119
Tabla M.1. Iniciadores para RT-PCR y secuenciación.....	139
Tabla A.1. Descripción de las muestras de caña de azúcar con sintomatología de mosaico colectadas en la campaña 2007-2008 y de las secuencias virales derivadas de las mismas.....	159

Índice de Figuras

Fig. I.1. Esquema de la propagación de caña de azúcar.....	17
Fig. I.2. Área de producción de caña de azúcar en el Noroeste Argentino.....	18
Fig. I.3. Árbol filogenético de la familia <i>Potyviridae</i>	22
Fig. I.4. Hoja con síntomas de mosaico, áfido vector, partículas virales,	

esquema del genoma del SCMV y sitios de proteólisis.....	26
Fig. I.5. Esquema del mecanismo de silenciamiento génico	37
Fig. 1.1. Optimización de posición de muestreo para la detección de SCMV en hoja...	50
Fig. 1.2. Análisis de la estabilidad de extractos de muestras de hoja de caña luego de almacenamiento a 4°C.....	51
Fig. 1.3. Análisis de la estabilidad de los extractos almacenados a -20°C.....	52
Fig. 1.4. Requerimiento de un inhibidor de RNAsas para la amplificación por RT-PCR.....	53
Fig. 1.5. Prueba del protocolo de amplificación por RT-PCR de muestras de campo.....	55
Fig. 1.6. Dilución seriada para establecer el límite de detección de la RT-PCR.....	56
Fig. 1.7. Calidad de las secuencias obtenidas con los iniciadores de secuenciación del gen de la proteína de cápside de SCMV.....	57
Fig. 1.8. Esquema del protocolo de análisis final para muestras de hoja de caña de azúcar infectadas con el SCMV o el SrMV.....	61
Figura 2.1. Mapa indicando la posición geográfica de los sitios de muestreo.....	65
Fig. 2.2. Árbol filogenético a partir del gen CP de muestras de SrMV colectadas en este estudio y su distribución geográfica.....	71
Fig. 2.3. Árbol filogenético a partir del gen CP de un set representativo de muestras del SCMV colectadas en este estudio.....	73
Fig. 2.4. Árbol filogenético sin raíz de la secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen CP de todas las secuencias del SCMV colectadas en este estudio.....	74
Fig. 2.5. Relación entre la identidad de secuencia aa y nt para el gen CP en 207.936 comparaciones de a pares de las sec. del SCMV y SrMV obtenidas.....	76
Fig. 2.6. Gráfico de entropía a partir de la secuencia nucleotídica de los doce genomas completos de SCMV disponibles en Genbank	77
Fig. 2.7. Árbol filogenético a partir de un fragmento de la sec. nt del gen P3 de un set representativo de muestras colectadas en éste estudio.....	78
Fig. 2.8. Comparación del genoma completo de la muestra ARG-915 (SCMV-W) con todos los genomas completos de SCMV disponibles en GenBank	82
Fig. 2.9. Árbol filogenético del genoma completo de los SCMV secuenciados en este estudio y de todos los genomas completos de SCMV disponibles en Genbank.....	83
Fig. 3.1. Diagrama del plásmido pUBI VIR3 NptII.....	94
Fig. 3.2. Esquema de cultivo <i>in vitro</i> y transformación de caña de azúcar.....	97
Fig. 3.3. Transformación transitoria de callos de caña de azúcar con el gen <i>uidA</i>	98
Fig. 3.4. Control de regeneración de la variedad NA 97-3463.....	101
Fig. 4.1. Esquema de rusticación de plantines de caña de azúcar, inoculación con extracto infectivo de SCMV y diagnóstico serológico	112
Fig. 4.2. Esquema del ensayo a campo para evaluar el desempeño de los eventos bajo condiciones naturales de infección.....	113
Fig. 4.3. Imágenes del ensayo a campo.....	114
Fig. 4.4. Resultados de la infección en el ensayo a campo de caña de azúcar transgénica bajo condiciones naturales de infección.....	117
Fig. 4.5. Análisis de los posibles eventos transgénicos de caña de azúcar por PCR.....	120
Fig. 4.6. Análisis de la expresión del casete de resistencia a virus en eventos transgénicos de caña por RT-PCR.....	121

Fig. 4.7. “Northern blot” de líneas transgénicas de caña que expresan la construcción pUBI VIR3 NptII.....	122
Fig. 4.8. “Northern blot” de ARN pequeños presentes en diversas líneas Transgénicas de caña.....	124

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CP	Proteína de cápside (“Coat protein”)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EST	Etiqueta de secuencia expresada (“expressed sequence tag”)
FDV	<i>Fiji disease virus</i>
kDa	Kilodalton
M	Molar
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura (“open reading frame”)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)
PM	Peso molecular
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional, “post-transcriptional gene silencing”
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (“Reverse transcription polymerase chain reaction”)
SCMV	<i>Sugarcane mosaic virus</i>
SCSMV	<i>Sugarcane streak mosaic virus</i>
SCYLV	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>
SrMV	<i>Sorghum mosaic virus</i>
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad
UTR	Región no traducida (“untranslated region”)
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

INTRODUCCIÓN

Introducción

I.1. La caña de azúcar, origen, explotación comercial y mejoramiento genético

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es el principal cultivo productor de azúcar (sacarosa) a nivel mundial y es cultivado en regiones tropicales y subtropicales. La caña de azúcar es un híbrido interespecífico de la familia *Gramineae*, tribu *Andropogonae* y se clasifica dentro del género *Saccharum*. El género está compuesto por seis especies, de las cuales solo dos crecen en estado salvaje, *S. spontaneum* y *S. robustum*, mientras que *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* y *S. edule* son o fueron cultivadas en distintas épocas. *S. spontaneum* es una especie altamente polimórfica, adaptable y fuente de resistencia a muchas enfermedades, que crece en los trópicos y subtropicos desde África hasta las Islas Salomón y Japón, siendo India su centro de origen y diversidad (Julien *et al.*, 1989).

S. officinarum es la especie domesticada del género, con tallos gruesos, jugosos y alto contenido de azúcar y se postula que derivó de la selección de “seedlings” (plantas derivadas de semillas) naturales de *S. robustum* realizado por los aborígenes de Nueva Guinea, su centro de diversidad (D’Hont *et al.*, 1993, Grivet *et al.*, 2004, Julien *et al.*, 1989). A los clones de *S. officinarum* se los conoce actualmente como cañas nobles, y junto con *S. spontaneum* son las dos especies que más contribuyeron al acervo genético de los cultivares modernos, conocidos como cañas híbridas. A causa de epidemias que afectaron a las cañas nobles, se realizaron las primeras hibridaciones artificiales entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* y *S. barberi* en Java y la India a principios del siglo XX. Las hibridaciones fueron seguidas por retrocruzas con *S. officinarum* como hembra para recuperar el alto contenido de azúcar (Roach y Daniels, 1987) propio de esta especie. Los cultivares modernos derivan esencialmente de la cruce de estos primeros híbridos en los que estuvieron involucrados un número pequeño de clones. Este proceso trajo como consecuencia que las variedades de caña actualmente utilizadas poseen un genoma complejo, aloploiploide, aneuploide, con números cromosómicos que varían entre 100 y 130, con aproximadamente 10% de los cromosomas que provienen de *S. spontaneum*, 10% de los cromosomas son

recombinantes y el resto de los cromosomas que provienen de *S. officinarum* (D'Hont *et al.*, 1996).

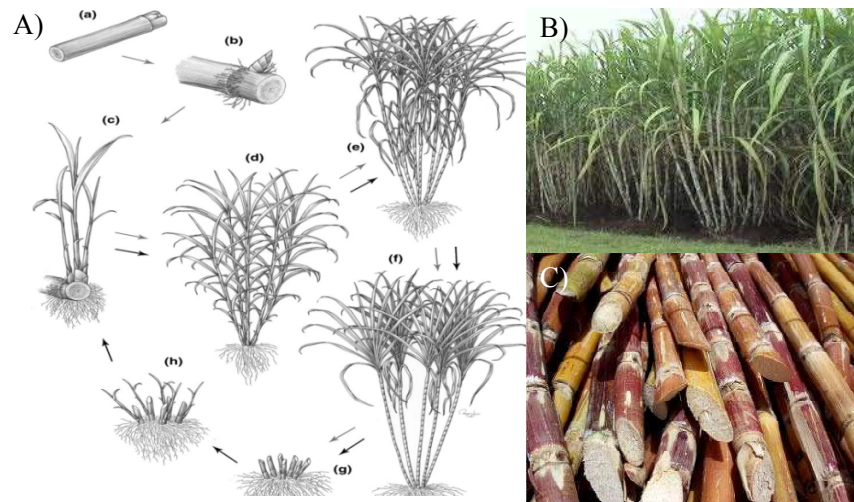


Fig. I.1. Esquema de la propagación de caña de azúcar (A). Las plantas se originan a partir de esquejes (trozos de tallos) (a-b-c) y se desarrollan para generar un cañaveral maduro (d-e-f). Luego de la cosecha (g) la cepa vuelve a producir tallos (h) y comienza el ciclo de crecimiento del cañaveral. Foto de un cañaveral maduro (B) y de tallos de caña cosechados manualmente (C).

La caña de azúcar es un cultivo semiperenne distribuido principalmente en los trópicos y en los subtropicos. En las explotaciones comerciales la caña es propagada por estacas o esquejes que se entierran y cuyas yemas, al brotar, dan lugar a tallos primarios. Las yemas en la base de los tallos primarios dan, a su vez, lugar a los tallos secundarios, que a su vez darán lugar a tallos terciarios, resultando en la formación de lo que se conoce como una cepa (Fig. I.1). El sistema radicular está formado por raíces superficiales, raíces de fijación y raíces cordones. El tallo está compuesto de nudos y entrenudos, con una hoja y una yema axilar dispuestas alternativamente a cada lado del nudo. En la punta del tallo se encuentra el meristema apical que se divide activamente para formar tallo y hojas y es conocido como cogollo. La hoja está formada por una vaina de forma tubular y el limbo, que tiene una nervadura central prominente y una lámina. La caña de azúcar es una planta C_4 en la cual la sacarosa producida por la fotosíntesis es transformada en almidón, que es temporalmente almacenado en la hoja y después reconvertido en azúcar para su migración al tallo donde es almacenado como sacarosa, especialmente en los tejidos maduros (Julien *et al.*, 1989). En las explotaciones comerciales el tallo es cosechado y procesado para extraer la sacarosa, que puede llegar a representar el 50% del peso seco, mientras que la fibra se usa para la obtención de energía o la producción de papel y las melazas son fermentadas para la

producción de etanol. Una vez cosechada, la parte subterránea de la planta (soca) tiene la capacidad de rebrotar, lo que permite varias cosechas anuales antes de que el deterioro de las socas resulte en la conveniencia de renovar el cañaveral plantando estacas nuevamente.

La caña de azúcar, cultivada entre los 30° de latitud norte y sur, ocupó una superficie a nivel mundial de 23,9 millones de hectáreas en 2010 y alcanzó una producción de 1711 millones de toneladas (<http://faostat.fao.org/site/>, fecha de ingreso 09/10/2012). El principal país productor de caña es Brasil, mientras que la Argentina es responsable del 1,5% de la producción mundial de azúcar (Anino y Iturregui, 2011). En la Argentina la producción de caña de azúcar está concentrada en tres provincias del NOA; Tucumán (71% de la superficie plantada), Jujuy (19%), Salta (9%) y el 1% restante se reparte entre Misiones y Santa Fe, totalizando unas 344.000 hectáreas en la campaña 2010-2011 (Fig. I.2). En la zafra 2011 la producción de caña en la Argentina rondó los 19,4 millones de toneladas y por su parte, la producción de azúcar cruda y refinada llegó a 2.035.000 toneladas, lo que permitió a la Argentina satisfacer el consumo interno y generar un saldo exportable de 192.000 toneladas (Anino y Iturregui, 2011). El bioetanol producido a partir de las melazas, un subproducto, o directamente a partir del jugo de la caña ha incrementado su importancia, especialmente luego de la sanción de la ley de biocombustibles en 2010 que establece un corte obligatorio con 5% de bioetanol de todas las naftas vendidas en el país. En el año 2010, las exportaciones del complejo azucarero resultaron en el ingreso de US\$ 170 millones.

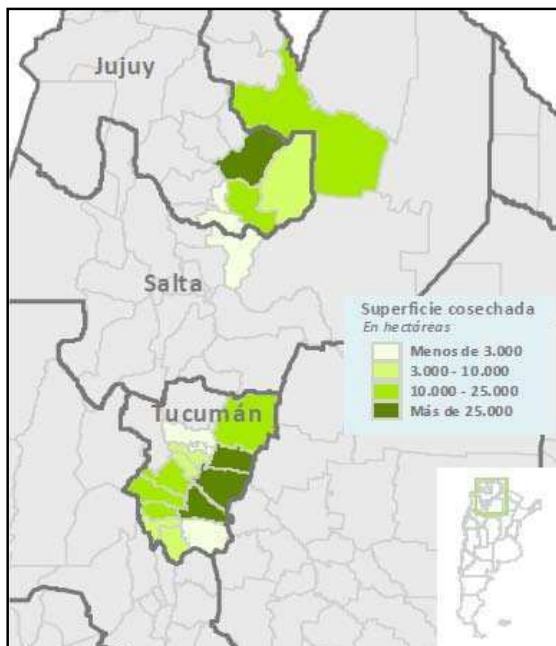


Fig. I.2. Área de producción de caña de azúcar en el Noroeste Argentino, discriminado por departamento y superficie cosechada, lo que representa el 99% de la producción Nacional.

El mejoramiento genético tradicional de caña de azúcar se realiza principalmente por medio de la cruce sexual de híbridos de *S. officinarum* y en menor medida por la cruces con clones dentro del género *Saccharum* seguidas de retrocruces con *S. officinarum* (Roach y Daniels, 1987). La caña florece naturalmente en zonas tropicales, pero en los subtrópicos puede inducirse la floración artificialmente y obtenerse semilla sexual en este cultivo. Un tallo puede ser inducido a la floración si se somete a un período de oscuridad de 11,5 a 12,5 horas, con fotoperíodo decreciente y una temperatura mínima de 18°C, una temperatura inferior a 32°C y un aporte suficiente de agua. La inflorescencia es un panícula plumosa con un elevado número de flores. La semilla sexual obtenida es germinada en multimacetas y transplantada a campo en donde comienza un ciclo de selección y multiplicación del material que demora habitualmente entre 10 y 12 años para la obtención de una nueva variedad de caña de azúcar. La Chacra Experimental Agrícola Santa Rosa es una asociación civil sin fines de lucro que lleva adelante un programa de mejoramiento genético de caña de azúcar que se inició en la década de 1960 con la selección a partir de semilla sexual importada, para luego incorporar la producción de semilla propia en la década del 80. Las variedades que produce la Chacra Experimental llevan la sigla “NA” por “Norte Argentino” y están particularmente adaptadas a las condiciones agroecológicas de las provincias de Salta y Jujuy (Ing. Agr. Ricardo Fernandez de Ullivarri, comunicación personal).

El mejoramiento genético tradicional ha sido exitoso en generar híbridos de uso comercial con mejoras en el rendimiento sacarino, en el rendimiento expresado en tonelaje por hectárea, la capacidad de soca y la resistencia a enfermedades y plagas. Sin embargo la base genética de la cuál derivan la mayor parte de las variedades modernas fueron establecidas a principios del siglo XX, por lo que algunos autores consideran que es estrecha, aunque otros consideran que su variabilidad genética no ha sido agotada (Roach y Daniels, 1987). Muchos genotipos elite desarrollados demuestran buenas características agronómicas y sanitarias pero conllevan ciertas deficiencias en su desempeño. Este es el caso para distintas enfermedades, en las que las variedades son adoptadas comercialmente a pesar de su susceptibilidad a un patógeno particular o son inicialmente resistentes a ese patógeno pero luego la resistencia es quebrada con el tiempo (Leverington, 1987). Un claro ejemplo de esto son variedades de caña de azúcar que al ser liberadas eran resistentes a la enfermedad del mosaico pero luego la resistencia se vió superada por el virus (Gonçalves *et al.*, 2007, Grisham y Pan, 2007). La biotecnología, a través de la ingeniería genética, ofrece herramientas para subsanar

las deficiencias sanitarias de variedades que han tenido o tienen importancia comercial, pero que han sido reemplazadas por otras variedades debido a su susceptibilidad (Ming *et al.*, 2006).

I.2. Enfermedades de la caña de azúcar; fúngicas, bacterianas y virales

La caña de azúcar se ve afectada por un gran número de patógenos que afectan la producción y la calidad fabril de la materia prima. La manifestación de diferentes patologías depende de las variedades cultivadas, su localización geográfica, la presión de inóculo, las condiciones climáticas, la fertilidad de los suelos y las prácticas agronómicas (laboreo, manejo de rastrojo, administración de nutrientes). Entre las enfermedades fúngicas sintomáticas más comunes en la Argentina se encuentran el carbón (agente causal *Ustilago scitaminea* H. & P. Sydow), la roya (agente causal *Puccinia melanocephala* H. & P. Sydow), el Pokkah Boeng (agente causal *Fusarium moniliforme* Sheldon) y la mancha parda (agente causal *Cercospora longipes* Butler) (Rago, 2008).

Entre las enfermedades bacterianas sintomáticas más comunes en la Argentina se encuentran la escaldadura de las hojas (agente causal *Xanthomonas albilineans* (Ashbi) Dowson), la estría roja (agente causal *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Manns) Willems) y el raquitismo de las socas (agente causal *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) (Rago, 2008).

Entre las enfermedades virales reportadas en la Argentina se encuentran el mosaico causada por el *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y el *Sorghum mosaic virus* (SrMV), pertenecientes al género *Potyvirus* de la familia *Potyviridae* (Fig I.3), que será descrita mas abajo. También se ha reportado la enfermedad causada por el *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV) del género *Badnavirus* (Lockhart y Autrey, 2000b) y el *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV, género *Polerovirus*, familia *Luteoviridae*) que es transmitido por áfidos y causa el síndrome del amarillamiento de la hoja (Rago, 2008). Otras enfermedades virales de importancia económica como la enfermedad de Fiji causada por el *Fiji disease virus* (FDV, género *Fijivirus*, familia *Reoviridae*) no han sido reportadas en la Argentina.

I.3. Enfermedad del mosaico de la caña de azúcar

Los síntomas de mosaico en la caña de azúcar (parches claros alternados con parches oscuros en la lámina de la hoja) están asociados a cuatro enfermedades virales (Tabla I.1). Entre estas enfermedades, el mosaico es el más estudiado y el de mayor distribución a nivel mundial. Se ha reportado en más de 70 países y es causada por dos especies de virus, el *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y el *Sorghum mosaic virus* (SrMV), pertenecientes al género *Potyvirus* de la familia *Potyviridae* (Fig I.3). Debido a su incidencia e importancia de los daños que causan en nuestro país, este trabajo de Tesis propuso el estudio de los agentes causales de esta enfermedad y el diseño de una estrategia de transgénesis para su control. A partir del apartado I.4 se tratarán diversos aspectos que atañen a estas dos especies virales.

La enfermedad denominada mosaico suave o “mild mosaic” es causada por el *Sugarcane mild mosaic virus* (SCMMV), el cual ha sido hallado en la naturaleza solo en infecciones mixtas con el *Sugarcane baciliform virus* (SCBV). Este virus solo ha sido reportado en Australia, Costa Rica, Malawi, Mauricio, Sudáfrica, Tailandia y EE.UU. (Lockhart y Autrey, 2000a). No existen datos de la importancia económica del SCMMV y además no se conoce cuál es su rol en las infecciones mixtas con SCBV (Rott *et al.*, 2008).

La enfermedad del mosaico estriado o “streak mosaic” es causada por el *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV, genero tentativo *Susmovirus*, familia *Potyviridae*). Inicialmente este virus fue clasificado como una cepa dentro del SCMV por la similitud de la sintomatología que provoca en caña, pero estudios posteriores y la secuenciación del genoma completo evidenció claras diferencias entre ambos (Fig. I.3). Como consecuencia, el SCSMV fue recientemente propuesto como parte del nuevo género *Susmovirus* de la familia *Potyviridae* (Xu *et al.*, 2010). Se ha reportado su presencia en varios países asiáticos, incluyendo Bangladesh, India, Pakistán, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam y China (Chatenet *et al.*, 2005). Al inicio de la presente Tesis no se había reportado la presencia de la enfermedad en Sudamérica, y en el trabajo de Perera y colaboradores (2009) se indicaba que dicho virus no estaba presente en 76 muestras con sintomatología de mosaico colectadas en Argentina, principalmente en Tucumán. Sin embargo, recientemente Sawasaki y colaboradores (2012) reportaron la presencia de un aislamiento viral en Brasil con alta homología de secuencia con el SCSMV. La importancia económica del SCSMV es difícil de estimar ya que fue diferenciado

recientemente del SCMV, aunque la incidencia del mosaico/”streak mosaic” en ciertas regiones de India es cercana al 100%, con pérdidas en la producción estimadas en 10 a 15% (Rott *et al.*, 2008).

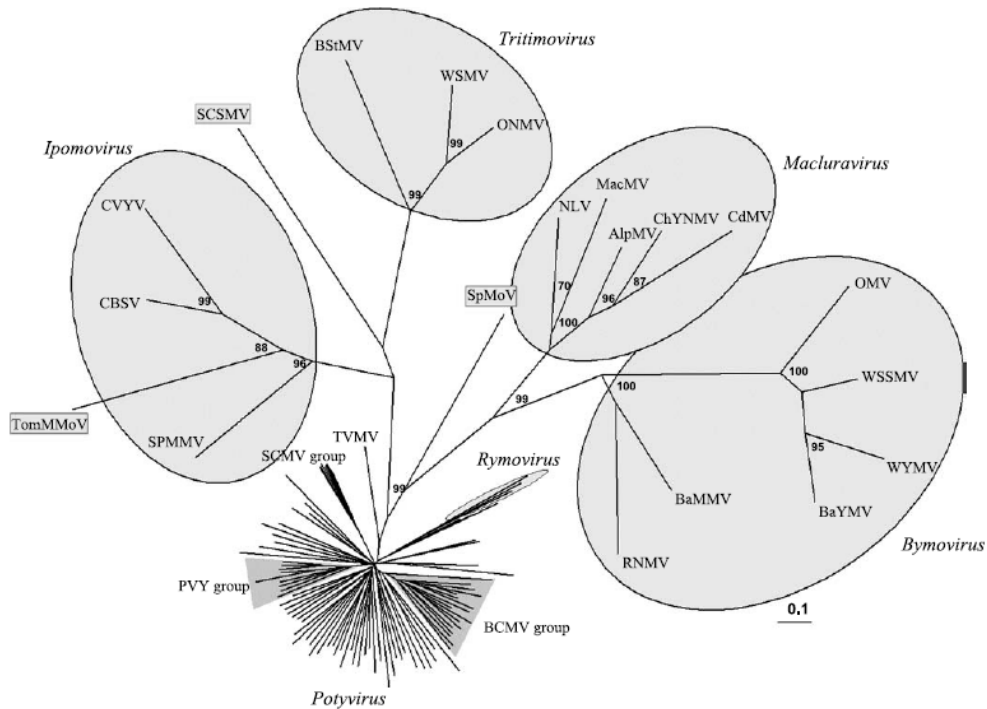


Fig. I.3. Árbol filogenético de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína de cápside de la familia *Potyviridae* obtenido por el método de “Neighbour Joining”. Los valores de Bootstrap están indicados en las bifurcaciones solo cuando son ≥ 70 . Se encuentran recuadrados los tres virus no asignados a ninguna familia (SCSMV, *Sugarcane streak mosaic virus*; SpMoV, *Spartina mottle virus*; TomMMoV, *Tomato mild mottle virus*). Reproducido de Adams y otros, 2004.

La enfermedad del mosaico estriado o “striae mosaic” fue descrita inicialmente en 1961 en Australia. El agente causal no ha sido determinado claramente. Sin embargo, hojas con sintomatología de la enfermedad presentaban partículas virales flexuosas que fueron denominadas *Sugarcane striate mosaic associated virus* (SCSMaV). La secuenciación del genoma completo del SCSMaV lo ubica dentro de la familia *Betaflexiviridae* (King *et al.*, 2011). La enfermedad tiene una distribución restringida a algunos distritos productores de caña en Australia, por lo que es de poca importancia económica (Rott *et al.*, 2008).

Tabla I.1. Enfermedades virales que resultan en síntomas de mosaico en caña de azúcar.

Enfermedad	Agente causal	Género	Familia
Mosaico (“Mosaic”)	<i>Sugarcane mosaic virus</i> (SCMV) y/o <i>Sorghum mosaic virus</i> (SrMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
Mosaico suave (“Mild mosaic”)	<i>Sugarcane mild mosaic virus</i> (SCMMV)	<i>Closterovirus*</i>	<i>Closteroviridae</i>
Mosaico estriado “Streak mosaic”	<i>Sugarcane streak mosaic virus</i> (SCSMV)	<i>Susmovirus*</i>	<i>Potyviridae</i>
“Striate mosaic”	<i>Sugarcane striate mosaic associated virus</i> (SCSMaV)	No asignado	<i>Flexiviridae</i>

(*) Géneros tentativos.

I.4. Mosaico causado por el SCMV y el SrMV

I.4.1. Hospedadores, importancia económica, áfidos vectores, epidemiología y sintomatología en caña de azúcar

El mosaico afecta a varios cultivos de importancia comercial como la caña de azúcar, el sorgo y el maíz y también se ha reportado la infección con SCMV de un gran número de pastos salvajes, incluyendo especies de los géneros *Arundinaria*, *Brachiaria*, *Cynodon*, *Dactyloctenium*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Erianthus*, *Panicum*, *Paspalum*, *Paspalidium*, *Pennisetum*, *Rhynchelytrum*, *Rottboelia*, *Setaria*, *Sorghum*, *Stenotaphrum*, *Tripsacum* y *Zea*. De las especies del género *Saccharum*, *S. officinarum* es la más susceptible, *S. barberi* y *S. robustum* son moderadamente susceptibles y *S. sinense* y *S. spontaneum* son resistentes (Koike y Gillaspie, 1989), por lo que estas últimas han sido utilizadas como fuente de resistencia en programas de mejoramiento genético. Esta diversidad de hospedantes determina la presencia de fuentes de inóculo en el agroecosistema, ya sea de cultivos comerciales o las malezas asociadas.

La enfermedad del mosaico se encuentra presente en casi la totalidad de los países en donde la explotación comercial de caña de azúcar es de importancia económica. Sin embargo, las pérdidas que ocasiona son más acentuadas en los subtrópicos que en las áreas tropicales. La enfermedad fue primero reconocida en 1892 en Java y para 1920 se había determinado la naturaleza viral del agente etiológico. Aunque su origen geográfico no está claro, probablemente sea Nueva Guinea y fue luego dispersado junto con las cañas nobles en la antigüedad (Koike y Gillaspie, 1989).

A mediados de la década de 1920 una epifítia de la enfermedad casi causó el colapso de la producción en Luisiana (EE.UU.), Puerto Rico, Cuba y Argentina. Los clones utilizados en la época, conocidos como cañas nobles, eran altamente susceptibles al mosaico (Fawcett, 1922) y tuvieron que ser reemplazados por variedades tolerantes o resistentes. Las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad varían ampliamente dependiendo de la región geográfica, la variedad de la caña, la cepa viral, la población de vectores y las prácticas agronómicas. En ensayos comparativos de rendimiento en los que se contrastan plantas sanas con plantas infectadas de la misma variedad, se han reportado pérdidas de hasta 30-40%, con un incremento de las pérdidas para socas de mayor edad (Koike y Gillaspie, 1989, Vázquez de Ramallo, 1967). La medida más eficaz para el control de la enfermedad es el uso de variedades resistentes. Alternativamente, la micropropagación de meristemas o yemas axilares produce material libre de virus que puede ser multiplicado a través de semilleros certificados para su uso comercial (Castagnaro *et al.*, 2011, Cheong *et al.*, 2012, Ramgareeb *et al.*, 2010, Sengar *et al.*, 2011) Aunque no se han reportado recientemente epidemias serias de esta enfermedad, todavía causa pérdidas importantes de germoplasma en los programas de mejoramiento genético (Grisham, 2000). Considerando lo anterior, la generación de plantas transgénicas expresando un transgén de resistencia al mosaico se convierte en una alternativa interesante para solucionar este problema sanitario en genotipos elite (Rott *et al.*, 2008).

La enfermedad es transmitida en la naturaleza por varias especies de áfidos en forma no persistente (Fig. I.4.B), con distinto grado de eficiencia dependiendo de la especie vector. En una actualización de la lista faunística de pulgones de la Argentina, Ortego y colaboradores (2004) reportaron la presencia de varias especies de áfidos caracterizadas como vectores de la enfermedad: *Aphis craccivora* (Koch), *Aphis gossypii* (Glover), *Hysteroneura setariae* (Thomas), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus), *Rhopalosiphum rufiabdominale* (Sasaki), *Schizaphis graminum* (Rondani), *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis), *Metopolophium dirhodum* (Walker), *Myzus (Nectarosiphon) persicae* (Sulzer), *Sitobion avenae* (Fabricius) y *Uroleucon ambrosiae* (Thomas) (Achon *et al.*, 2003, Figueredo *et al.*, 2004, Harborne, 1988, Koike y Gillaspie, 1989, Noone *et al.*, 1994, Singh *et al.*, 2004, Singh y Rao, 2009). Por otro lado, se ha reportado en Paraguay la presencia de los áfidos *R. maidis*, *R. padi*, *S. graminum*, *Myzus persicae*, y *S. avenae* vectores del mosaico (INIA, 1976). La diseminación del mosaico es más rápida cuando las

poblaciones de áfidos son mayores, cuando se plantan variedades susceptibles y hay abundantes fuentes de inóculo (Koike y Gillaspie, 1989). En la Argentina, los picos poblacionales de áfidos en los cañaverales de Tucumán se dan en febrero y marzo (M. Sc. Analia Salvatore, comunicación personal). Harborne (1988) reportó que en el estado de Natal (Sudáfrica), el cual se encuentra a la misma latitud que la provincia de Tucumán, los picos poblacionales de áfidos transmisores del SCMV se dan entre enero y febrero. La diseminación del mosaico es máxima cuando coinciden los picos en la población de áfidos con estadios jóvenes de la caña de azúcar (Bailey y Fox, 1980). Por lo tanto, se espera que la transmisión del mosaico sea máxima en las plantaciones de verano (Ing. Agr. Ricardo Fernández de Ullivarri, comunicación personal).

El virus del mosaico es transmitido en la plantación a partir de esquejes de cañas enfermas o por pulgones, pero no se ha reportado la transmisión a través de semilla sexual. La transmisión por pulgones es no circulativa y no persistente, por lo que el virus se asocia temporalmente con superficies del interior del estilete sin cruzar barreras celulares y se transmite inmediatamente después de su adquisición. Los áfidos tienen el hábito de trasladarse de planta en planta picando brevemente hasta que encuentran un hospedante adecuado, convirtiéndose en un efectivo vector de virus (Gibbs *et al.*, 2008). Este tipo de transmisión representa un gran desafío en cuanto al control y prevención de la enfermedad viral, haciendo inútil el uso de plaguicidas para controlar el vector y llegando incluso con su empleo a incrementar la dispersión de la enfermedad al favorecer un mayor desplazamiento de los pulgones en el cultivo (Martínez-García *et al.*, 2001). En cuanto a la interacción de las partículas virales con el vector, la hipótesis del “puente” es la más aceptada, que postula la interacción específica y reversible de la proteína viral HC-Pro tanto con la proteína de cápside del virión como con la cutícula del estilete del áfido, permitiendo su posterior inoculación en la planta (Martínez-García *et al.*, 2001, Syller, 2005).

El mosaico también puede ser transmitido mecánicamente utilizando una variedad de técnicas. Se ha descrito la transmisión exitosa al exponer a la planta a un extracto infeccioso luego de daño mecánico con agujas, abrasivos como arena o carborundo o con el uso de pistolas de aire a presión. La transmisión mecánica por implementos de campo como machetes y cosechadoras se considera despreciable. El extracto infectivo se prepara normalmente triturando hojas con síntomas de mosaico en buffer fosfato, sulfito de sodio o agua y filtrándolo con tela. Las condiciones de las plantas antes y después de la inoculación, incluyendo la fertilización, temperatura,

luminosidad y humedad del suelo, afectan al éxito de la transmisión del virus. La inoculación suele fallar en plantas sometidas a altas temperaturas y/o alta luminosidad (Koike y Gillaspie, 1989)

La enfermedad del mosaico se caracteriza por sus síntomas en la hoja, que se evidencian como un patrón de zonas más claras (cloróticas con menor contenido de clorofila) alternadas con zonas de color verde más oscuras (Fig. I.4.A). En general las zonas cloróticas tienen bordes difusos, pero dependiendo de las condiciones pueden tener bordes marcados y llegar a ser amarillos, rojos o necróticos en los casos más severos. La sintomatología depende de la variedad de caña, la cepa viral, las condiciones de crecimiento, la temperatura y la edad de la hoja. Los síntomas son más claros en las hojas jóvenes, particularmente en la base de las mismas y se suelen enmascarar en las hojas más maduras (Koike y Gillaspie, 1989).

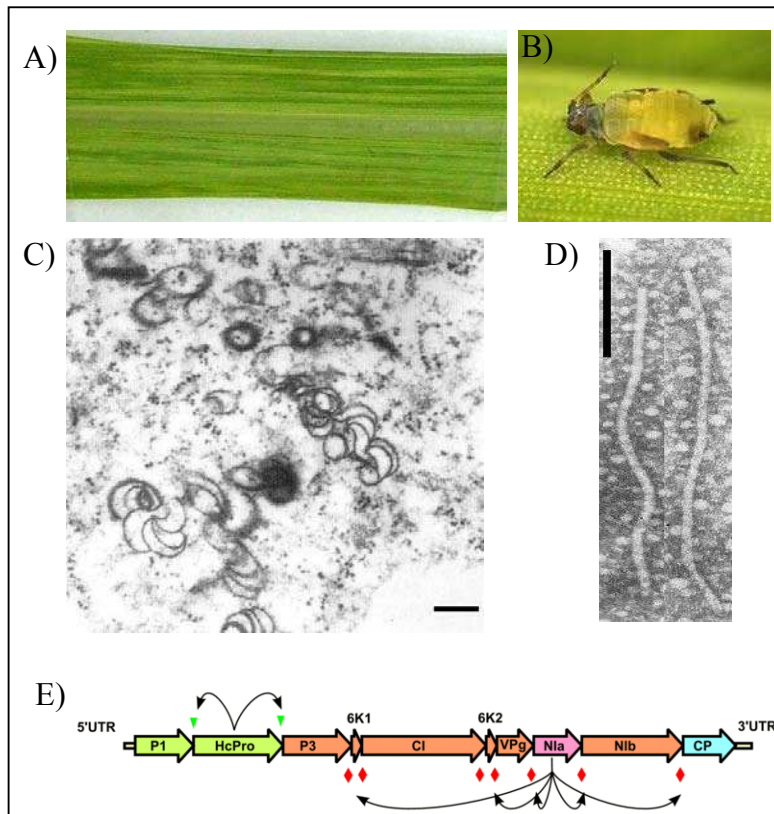


Fig. I.4. Hoja de caña de azúcar de la variedad NA 97-3463 con síntoma de mosaico mostrando un mosaico de manchas verde claras con menor contenido de clorofila y de manchas verde oscuras (A). *Rhopalosiphum maidis*, una de las especies de áfido vector de la enfermedad del mosaico (B). Partícula viral filamentososa y flexuosa de SCMV (D) e inclusiones cilíndricas tipo “pinwheel” características de la infección con potyvirus (C). Las barras representan 250 nm. Esquema del genoma monopartito de ARN positivo característico de los miembros del género *Potyvirus* al que pertenecen el SCMV y SrMV (E). El genoma es traducido en una poliproteína que es clivada autocatalíticamente por las proteasas Hc-Pro (triángulos verdes) y Nia-Pro (rombos colorados) en 10 polipéptidos maduros.

Luego de la inoculación, el virus establece una infección sistémica aunque los síntomas no se desarrollan en las hojas que estaban maduras previamente a la infección. La cantidad de días requeridos para la aparición de síntomas luego de la inoculación depende del genotipo de la planta, de la cepa viral y de las condiciones de crecimiento. Las plantas jóvenes y en rápido crecimiento son más susceptibles y pueden evidenciar síntomas a los 6-7 días, aunque dependiendo de las variables mencionadas la aparición de síntomas puede demorarse 30 días o más (Koike y Gillaspie, 1989). En las hojas con síntomas, las células de las áreas cloróticas muestran menor crecimiento, los cloroplastos son pequeños y escasos, los núcleos celulares son más conspicuos y los nucleolos más numerosos. Las hojas afectadas son más delgadas y muestran una reducción de la actividad fotosintética por unidad de área (Koike y Gillaspie, 1989).

I.4.2. Características moleculares del SCMV y del SrMV

Los virus SCMV y SrMV pertenecen al género *Potyvirus* el cual, al contener a más del 30% de los virus de plantas conocidos, es el género más numeroso de la familia *Potyviridae*. Las partículas virales son filamentosas y flexuosas, midiendo aproximadamente 750 nm de longitud y 13 nm de diámetro y se caracterizan por formar frecuentemente inclusiones cilíndricas denominadas “pinwheel” (Fig. I.4.C y D). El genoma viral está formado por una única molécula de ARN positivo simple cadena de unos 10 Kb de largo, que se encuentra poliadenilada y unida covalentemente a la proteína viral VPg en su extremo 3' (Fig I.4.E). El genoma contiene un único marco de lectura abierto que es traducido en una poliproteína. Debido a la actividad de proteasa autocatalítica de los genes NIa-Pro y HC-Pro y P1, la poliproteína es clivada dando lugar a unas 10 proteínas maduras (Adams *et al.*, 2004b). Recientemente se describió la presencia de un ORF adicional conservado en la familia *Potyviridae* que se denomina PIPO, se encuentra dentro del cistron del gen P3 en el marco de lectura +2 y cuya función es desconocida (Chung *et al.*, 2008). En la Tabla I.2 se describen los genes identificados y su función probable (Adams *et al.*, 2005).

Tabla I.2. Genes identificados en el genoma viral de SCMV y SrMV y su probable función (Adams *et al.*, 2005).

Gen	Peso molecular de la proteína (kDa)	Función probable
P1	32,4	Proteasa, determinante de rango de hospedador
HC-Pro	51,9	Transmisión por áfidos, supresión del silenciamiento génico, proteasa
P3	41,5	Anclaje a membrana del complejo de replicación
6K1	6,0	Desconocida
CI	71,4	“Cylindrical inclusion protein”, ARN helicasa, NTPasa, mov. entre células
6K2	5,5	Anclaje a la membrana del complejo de replicación
VPg	21,7	Unión covalente al extremo 5' del genoma viral, determinante de virulencia
NIa-pro	27,7	Proteasa
NIb	59,8	ARN polimerasa ARN dependiente
CP	29,8	Proteína de cápside, determinante de sintomatología y transmisión
PIPO	~ 25	Producto de fusión con proteína P3, función desconocida

I.4.3. Variabilidad genética y clasificación de aislamientos del SCMV y del SrMV

Los virus con genoma de ARN son conocidos por evolucionar rápidamente debido a una alta tasa de mutaciones, replicación rápida y tamaños poblacionales grandes (Chare y Holmes, 2006). Las mutaciones puntuales son producidas principalmente por la introducción de errores de copia por la ARN polimerasa viral dependiente de ARN, que no tiene actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores, o “proofreading”. Gibbs y colaboradores (2008) seleccionaron la región central y el extremo 3' del gen de la proteína de cápside de los potyvirus para inferir la tasa de mutación y reconstruir los eventos de especiación basados en evidencias históricas (epidemias virales, introducción de enfermedades a otros continentes, etc). Los investigadores llegaron a la conclusión de que la radiación inicial de los potyvirus ocurrió alrededor de 6600 años atrás, lo que coincide con el inicio de la agricultura. La tasa de mutación estimada para este grupo viral es de $1,15 \times 10^{-4}$ sustituciones nucleotídicas por sitio por año para el gen de la proteína de cápside (Gibbs *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha descrito la recombinación en los potyvirus como un mecanismo

evolutivo relativamente frecuente (Chare y Holmes, 2006). Existen varios reportes que dan cuenta de evidencias de señales de recombinación en distintos aislamientos del SCMV (Achon *et al.*, 2007, Padhi y Ramu, 2011, Zhong *et al.*, 2005).

A lo largo del tiempo se ha utilizado una gran variedad de técnicas para caracterizar aislamientos de los virus causales del mosaico. Inicialmente se utilizó la infección de hospedadores diferenciales como método de clasificación. En esta técnica se inocula artificialmente distintas variedades de caña o sorgo y se registran datos como el tipo y la severidad de síntomas, necrosis, decoloración de las vainas, detención del crecimiento, incidencia en la brotación, índice de infección y período de incubación (Vázquez de Ramallo, 1981). Esta metodología es muy laboriosa y lenta pero, al no contarse en la época con metodologías alternativas, permitió, durante buena parte del siglo pasado, estudiar al virus del mosaico. Summers describió en 1936 la presencia de las razas A, B, C y D del SCMV en Luisiana (EE.UU.), a las que en las décadas siguientes se agregaron las razas E, F, G, H, I, J y M. La prevalencia de las distintas razas del mosaico en lotes comerciales varió en el tiempo, posiblemente debido al recambio varietal de los cañaverales (Grisham y Pan, 2007, Koike y Gillaspie, 1989). La repetibilidad de los resultados obtenidos mediante esta metodología depende fuertemente del uso de los mismos hospedantes diferenciales y de las condiciones experimentales, lo cual muchas veces no se cumplía. Con el advenimiento de las técnicas moleculares tales como la detección por anticuerpos policlonales, secuenciación de proteínas, análisis de perfiles peptídicos de la proteína de cápside y la hibridación con sondas en la región 3' no codificante, se obtuvieron evidencias claras de que las distintas razas del SCMV descritas en realidad correspondían a cuatro especies virales: SCMV, SrMV, *Jhonsongras mosaic virus* (JGMV) y *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) (Shukla *et al.*, 1989, Shukla *et al.*, 1992). Estas cuatro especies virales conjuntamente con el *Zea mosaic virus* (ZeMV) y el *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) conforman el subgrupo "SCMV" del género *Potyvirus* (Gonçalves *et al.*, 2011), aunque cabe notar que solo el SCMV y el SrMV infectan caña de azúcar en condiciones naturales.

Yang y Mirkov (1997) secuenciaron el extremo 3' del genoma de un aislamiento correspondiente a las razas A, B, D y E del SCMV y a las razas SCH, SCI y SCM del SrMV y posteriormente desarrollaron un protocolo de RT-PCR que permite discriminar las dos especies virales mediante la utilización de iniciadores específicos para el gen de la proteína de cápside. Los productos de amplificación pueden ser digeridos con

enzimas de restricción para generar patrones de RFLP específicos de cada raza o pueden ser secuenciados. La secuenciación de fragmentos del genoma viral se convirtió paulatinamente en la herramienta de elección para el estudio de la variabilidad de los virus causales del mosaico de distintas partes del mundo y su posterior clasificación, aunque inicialmente el número de muestras virales analizadas era relativamente pequeño (Adams *et al.*, 2004b, Alegria *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2002). Esta metodología genera secuencias nucleotídicas que se pueden depositar en bancos de datos como GenBank y que son directamente comparables con otras secuencias de la misma región viral. Adams y colaboradores (2004b) establecieron criterios moleculares para diferenciar especies virales dentro de la familia *Potyviridae* realizando comparaciones de a pares de las identidades de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas (matrices de identidad) del genoma completo, de los 10 genes (excepto el gen PIPO) y las regiones UTR. Este trabajo estableció como criterio de separación entre especies una identidad nucleotídica menor al 76% y una identidad aminoacídica menor al 82% cuando se consideraba el ORF completo. Al estudiar la secuencia de la proteína de cápside de 1220 aislamientos, se estableció una identidad de secuencia de 76-77% como límite de demarcación de especies.

El análisis de la secuencia del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV se convirtió en la metodología más utilizada para el estudio y clasificación de los virus causales del mosaico. La herramienta más utilizada para clasificar a los aislamientos son los árboles filogenéticos, utilizando en la mayoría de los casos el algoritmo del Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y asignándole un valor de confianza a los agrupamientos por el método de “Bootstrap” (Felsenstein, 1985). Alegria y colaboradores (2003) clasificaron 86 aislamientos del SCMV en dos grupos monofiléticos; el grupo SCE conteniendo aislamientos que infectan caña de azúcar (con muestras provenientes de Australia, USA y África) y el grupo MZ (por “Maize”) que agrupa aislamientos que infectan maíz. Gemechu y colaboradores (2006) agregaron a esta clasificación el grupo “Sugarcane/maize” conteniendo muestras colectadas de caña de azúcar y maíz en Tailandia. Xu y colaboradores (2008) designaron al grupo “Sugarcane/maize” como grupo “Thailand” de acuerdo a su origen geográfico y agregaron los grupos “Brazil”, conteniendo aislamientos de ese país, y el grupo NSCE (por “Noble Sugarcane E”) conteniendo aislamientos del SCMV de cañas nobles colectados en China. Wang y colaboradores (2010) agregaron a la clasificación el grupo SO (por “*Saccharum officinarum*”) conteniendo aislamientos de cañas nobles

colectados en China y en Vietnam. Finalmente, Gao y colaboradores (2011), en una clasificación de diversos aislamientos de SCMV en base al gen de la proteína de cápside, conservaron los grupos MZ, NSCE, “Sugarcane/maize” y SO, sin embargo integraron en un solo grupo a los grupos SCE y Brasil.

Por otro lado, Gao y colaboradores (2011) clasificaron los 14 genomas completos del SCMV disponibles en Genbank en cuatro grupos, de los cuales el grupo III está integrado por el único aislamiento de SCMV colectado de caña de azúcar híbrida comercial disponible en ese momento (proveniente de Brisbane, Australia).

Los rangos de valores de identidad de secuencia entre muestras de un mismo estudio varían considerablemente entre las regiones muestreadas. Xu y colaboradores (2008) reportan para 33 muestras de SCMV colectadas de caña de azúcar en el sur de China un rango de 76,7 - 99,8% de identidad de secuencia nucleotídica para el gen CP. Gemechu y colaboradores (2006) reporta un rango de 98 - 99% de identidad para muestras de SCMV colectadas en caña de azúcar y maíz en Tailandia. Perera y colaboradores (2009) encontraron identidades nucleotídicas para el mismo virus entre 0,959 y 0,999 en 35 muestras colectadas en Tucumán.

En cuanto al SrMV, hay disponibles en GenBank un número de secuencias nucleotídicas significativamente más pequeño comparado con el SCMV. En base a la secuencia del gen de la proteína de cápside, Gao y colaboradores (2011) clasificaron 22 aislamientos del SrMV en dos grupos monofiléticos; el grupo NS (por “Noble Sugarcane”) que agrupa a aislamientos colectados de cañas nobles y el grupo HS (por “Hybrid Sugarcane”) que agrupa aislamientos colectados de cañas híbridas. Chen y colaboradores (2002) reportaron rangos de identidad nucleotídica > 93% para cinco muestras de SrMV colectadas en China.

Algunos autores reportan una asociación entre el origen geográfico y la clasificación filogenética de los aislamientos (Alegria *et al.*, 2003, Viswanathan *et al.*, 2009). Esto generalmente se cumple cuando se analizan pocos aislamientos por región geográfica y dicha asociación puede desaparecer al incluir un número grande y más diverso de secuencias nucleotídicas (Achon *et al.*, 2007, Gao *et al.*, 2011).

I.5. Protocolos rápidos para la obtención de secuencias de virus que infectan plantas

Como se ha discutido mas arriba, la secuenciación del genoma o de un fragmento de los virus bajo estudio se ha convertido en la herramienta de elección para su caracterización y clasificación (Adams, 2005, Adams *et al.*, 2004b). Para la obtención de secuencias virales a partir de plantas de caña infectada con mosaico, normalmente se requiere de: 1) una purificación de ácidos nucleicos a partir de tejido de hoja con “kits” comerciales o protocolos caseros, 2) amplificación por RT-PCR, separada en síntesis de cDNA y PCR o ambas en un solo paso, 3) secuenciación del producto de amplificación, ya sea directamente o clonado en un plásmido vector. Este esquema de procesamiento puede ser costoso e insumir mucho tiempo, especialmente cuando se utilizan “kits” comerciales y se desea analizar un número grande de muestras infectadas. En siete estudios publicados para la obtención de secuencias nucleotídicas del SCMV y/o del SrMV a partir de caña de azúcar, todos utilizan algún “kit” comercial o protocolo estándar para extracción de ácidos nucleicos, en tres estudios simplifican la síntesis de cDNA y PCR realizándola en un solo paso y en todos los casos, excepto en un trabajo, clonan el producto de amplificación previo a la secuenciación (Alegria *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2002, Gao *et al.*, 2011, Gemechu *et al.*, 2006, Perera *et al.*, 2009, Xu *et al.*, 2008, Yang y Mirkov, 1997). Este protocolo de trabajo resulta poco práctico cuando se desea analizar cientos de muestras virales.

Se han reportado protocolos para amplificar secuencias virales a partir de extractos simples de muestras de varias especies vegetales (Berthomieu y Meyer, 1991, Thomson y Dietzgen, 1995) que pueden simplificar los estudios epidemiológicos en los que se desea analizar un gran número de muestras. Al momento de comenzar esta Tesis no se había reportado el uso de un protocolo rápido de extracción de ácidos nucleicos en caña de azúcar. Thomson y Dietzgen (1995) reportaron un protocolo para la detección de virus de banana, zapallito y lechuga, que incluye dos virus con genoma de ARN, el *Zucchini yellow mosaic virus* y el *Lettuce necrotic yellows virus*. Dicho protocolo resulta particularmente atractivo para adaptarlo a la caña de azúcar por su simplicidad, el bajo costo de los reactivos y la posibilidad de utilizar material plástico descartable, lo que minimiza la probabilidad de contaminación cruzada. Sin embargo es importante evaluar en estos protocolos la estabilidad de los extractos crudos de hoja y el límite de detección para asegurar una adecuada sensibilidad y determinar la ventana de tiempo disponible entre la toma de muestra en el campo, la preparación del extracto y su análisis por RT-PCR.

Otro desarrollo que simplifica el proceso de detección de muestras infectadas con virus vegetales cuyo genoma está constituido por ARN se focaliza en la reducción del manipuleo de las muestras y la disminución de la probabilidad de contaminación cruzada mediante la síntesis de cDNA viral y posterior amplificación por PCR en un solo tubo y en forma consecutiva. Alegría y colaboradores (2003) reportaron el uso de un protocolo optimizado respecto del publicado por Yang y Mirkov (1997) para la detección del SCMV y del SrMV utilizando una RT-PCR de un solo paso con iniciadores específicos para cada especie.

Para evitar el paso de clonado de los productos amplificados por PCR previo a su posterior secuenciación, se ha reportado la secuenciación directa del producto de RT-PCR de virus de tomate (Navas-Castillo *et al.*, 2000), vainilla (Grisoni *et al.*, 2006) y caña de azúcar (Xu *et al.*, 2008), entre otros. De esta manera se minimiza la manipulación de las muestras amplificadas y se obtiene información de secuencia del producto amplificado exceptuando los extremos 5' y 3' del mismo, si se utilizan para secuenciar los mismos iniciadores de la PCR. Esta alternativa resulta atractiva cuando se desea secuenciar un número grande de muestras virales evitando el clonado de los productos amplificados y es suficiente para el análisis la secuencia de la región central del producto.

I.6. Biotecnología aplicada a la caña de azúcar y desarrollo de plantas transgénicas

La biotecnología y la biología molecular ofrecen una serie de herramientas útiles para el mejoramiento genético vegetal y el diagnóstico de enfermedades. Entre dichas herramientas se encuentran: 1) el cultivo de tejidos para la rápida propagación de material sano, 2) la introducción de genes nuevos en cultivares comerciales a través del desarrollo de plantas transgénicas, 3) el diagnóstico molecular de patógenos de la caña, 4) el desarrollo de mapas genéticos y mejoramiento asistido con marcadores moleculares, 5) la identificación varietal 6) el testeo molecular de la variación somaclonal y 7) la comprensión de las bases moleculares de caracteres de interés agronómico, en particular de la acumulación de azúcar en los tallos y de otros caracteres, estudios potenciados actualmente por las herramientas de la genómica, transcryptómica, proteómica y metabolómica, (Sengar *et al.*, 2011, Souza *et al.*, 2011, Tiwari *et al.*, 2010). Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos y recursos se

encuentran en este momento destinados al desarrollo de caña de azúcar transgénica para distintos caracteres y al desarrollo de marcadores moleculares (Tiwari *et al.*, 2010). A su vez, el proyecto de secuenciación del genoma de la caña de azúcar se encuentra en sus primeros estadios de avance (Souza *et al.*, 2011).

Bower y Birch reportaron en 1992 el desarrollo de las primeras caña de azúcar transgénicas utilizando un cañón génico del tipo “Particle inflow gun”. Dichas plantas expresan el gen selectivo neomicina fosfotransferasa (NptII) que confiere resistencia al antibiótico geneticina, utilizado como marcador para la selección de callos resistentes a este antibiótico en el proceso de transformación. Mas adelante se reportó la obtención de cañas transgénicas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vector de la transformación (Arencibia *et al.*, 1998, Elliott *et al.*, 1998, Enríquez-Obregón *et al.*, 1998, Manickavasagam *et al.*, 2004). La utilización de plásmidos super-binarios, cepas altamente virulentas de *A. tumefaciens* y el tipo de explanto a transformar resultaron de importancia para el éxito en la transformación (Arencibia *et al.*, 1998). A partir del desarrollo de éstas técnicas de transformación se ha reportado la obtención de cañas de azúcar transgénicas para un número creciente de caracteres agronómicos de interés tales como tolerancia a distintos herbicidas (Enríquez-Obregón *et al.*, 1998, Gallo-Meagher y Irvine, 1996, Leibbrandt y Snyman, 2003, Manickavasagam *et al.*, 2004, Spedaletti *et al.*, 2008), resistencia al ataque de insectos (Arencibia *et al.*, 1997, Falco y Silva-Filho, 2003, Srikanth *et al.*, 2011, Weng *et al.*, 2011, Weng *et al.*, 2006), ingeniería metabólica y producción de biomoléculas de alto valor comercial (Basnayake *et al.*, 2012, Groenewald y Botha, 2001, Hamerli y Birch, 2011, Ma *et al.*, 2000, McQualter *et al.*, 2005, Vickers *et al.*, 2005a, Wang *et al.*, 2005), resistencia a enfermedades bacterianas (Zhang *et al.*, 1999), resistencia a estrés abiótico (Molinari *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2006) y resistencia a enfermedades virales (Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009, Glynn *et al.*, 2010, Ingelbrecht *et al.*, 1999, Joyce *et al.*, 1998, McQualter *et al.*, 2004, Sooknandan *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2011). Debido a su relación con los objetivos de este trabajo de Tesis, se desarrollan a continuación los antecedentes específicos de cultivo de caña *in vitro* y en la obtención de caña transgénica con resistencia a virus.

1.6.1 Cultivo de caña de azúcar *in vitro*

Los protocolos de transformación de caña de azúcar actuales implican una etapa de cultivo *in vitro*, la cual puede resultar determinante para el éxito de la

transformación. Se ha reportado la transformación exitosa a partir de una variedad limitada de tejidos, incluyendo protoplastos aislados, callos (tejido totipotencial generado a partir de la región meristemática apical o de la inflorescencia inmadura), y secciones de hojas inmaduras (Lakshmanan, 2006, Snyman *et al.*, 2006, Taparia *et al.*, 2012). En la actualidad la mayoría de los protocolos se basan en la transformación de callos embriogénicos (Lakshmanan, 2006). Los diferentes genotipos de caña de azúcar varían notablemente en su capacidad de producir callos competentes para la transformación y en la capacidad de regenerar plantas a partir de los mismos. Se observan básicamente tres tipos de callos: callos blancos, compactos y globulares capaces de regenerar una planta (embriogénicos); callos friables no morfogénicos y callos nodulares y mucilaginosos que se puede convertir en los otros dos tipos de callos (Chen *et al.*, 1988). En resultados previos del laboratorio de Biotecnología de la Chacra Experimental, se pudieron transformar exitosamente más de 10 genotipos de caña de azúcar a partir de explantos de callo, aunque la eficiencia varió ampliamente entre variedades y requirió de modificaciones en los medios de cultivo para transformar ciertas variedades recalcitrantes (Lic. Yamila Spedaletti, comunicación personal). Basnayake y colaboradores (2011) reportaron que de 16 genotipos de caña de azúcar utilizados en Australia, 12 resultaron adecuados para el cultivo *in vitro* y transformación por biobalística con un protocolo estándar. Por otro lado, tres genotipos requirieron de la modificación en la concentración de 2,4-D y geneticina en los medios de cultivo y/o la modificación en la intensidad de la luz durante la regeneración, mientras que una variedad resultó recalcitrante al cultivo *in vitro*. Se ha reportado un rango amplio de eficiencias de transformación, desde la imposibilidad de transformar un genotipo de caña hasta la obtención de varios eventos regenerados por placa bombardeada (Basnayake *et al.*, 2011, Bower y Birch, 1992, Kim *et al.*, 2011).

Desde hace tiempo se conoce que el cultivo *in vitro* y/o la transformación de la caña de azúcar da origen a diferencias fenotípicas en un porcentaje de las plantas regeneradas, fenómeno que se conoce como variación somaclonal y que genera cambios genéticos detectables por técnicas como AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA”) o SSR (“Simple Sequence Repeats”) (Arencibia *et al.*, 1999, Carmona *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009). Varios factores como el tiempo de cultivo *in vitro*, la composición del medio de cultivo, la vía de regeneración (organogénesis o morfogénesis) y las diferencias genéticas entre variedades podrían influir en este fenómeno. Varios grupos de

investigación realizan esfuerzos para el desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* y transformación que reduzcan los efectos negativos de la variación somaclonal y la producción de plantas fuera de tipo (Lakshmanan *et al.*, 2006, Taparia *et al.*, 2012, Watt *et al.*, 2010). Un resultado indeseable de este fenómeno es que un porcentaje de los eventos plantados a campo muestran características agronómicas y fenotípicas distintas a las de la variedad transformada, lo que requiere de un protocolo de selección de eventos que conserven las características deseadas y además expresen el transgén adecuadamente (Vickers *et al.*, 2005b). En desarrollos previos de la Chacra Experimental se observó en cañas transgénicas un mayor macollage con tallos mas finos y mas cortos, fenotipo que ha sido reportado también por otros investigadores (Basnayake *et al.*, 2012). A pesar de esto, la variación somaclonal puede ser considerada una fuente de variabilidad genética con el potencial de generar variantes somaclonales con características agronómicas mejoradas, o inclusive con una mayor resistencia a la enfermedad del mosaico (Tiwari *et al.*, 2010).

1.6.2. Resistencia a virus mediada por silenciamiento génico

Sanford y Johnston (1985) propusieron que la expresión de ciertos genes del patógeno en un hospedante alteraría el balance normal de los componentes virales y predijeron que esto conduciría al impedimento de la replicación o del movimiento del virus dentro de la planta más allá de la primera célula infectada . Esta estrategia recibió el nombre de resistencia derivada del patógeno y resultó en el desarrollo de los primeros transgenes exitosos que conferían resistencia a virus. Para ello, típicamente se expresaba en plantas transgénicas la proteína de cápside del virus, el gen de la replicasa o de la proteína de movimiento y se observaban fenotipos de inmunidad, de retraso en la aparición de síntomas o la atenuación de los mismos (Prins *et al.*, 2008). Sin embargo se observó que en algunos casos no era necesaria la acumulación de proteína viral para obtener el fenotipo de resistencia y que la expresión de otras regiones virales, inclusive en versiones no traducibles, eran también efectivas, con lo que se denominó a este fenómeno “resistencia mediada por ARN”. Las plantas que muestran este tipo de resistencia presentan un fenotipo de inmunidad que se caracteriza porque no hay replicación viral detectable, no hay diseminación viral dentro de la planta y no hay síntomas debidos a la enfermedad o muestran un fenotipo de recuperación que se caracteriza por una infección inicial (con producción de síntomas) seguida por un crecimiento posterior resistente a la infección y asintomático (del Vas *et al.*, 2008).

Estudios posteriores establecieron que el mecanismo molecular subyacente observado en plantas transgénicas resistentes a virus mediada por ARN se engloba en un mecanismo evolutivamente conservado que fue denominado Silenciamiento Genético Post Transcripcional en plantas (PTGS en inglés), interferencia de ARN en animales (RNAi en inglés) o más generalmente silenciamiento mediado por ARN o silenciamiento génico (Fig. I.5). El mecanismo de silenciamiento génico cumple roles en la regulación de la expresión génica, el control de elementos genéticos móviles, la metilación y remodelación de la cromatina y la defensa de la planta contra virus y otros patógenos (Eamens *et al.*, 2008). En todos los casos se produce una cascada de reacciones desencadenadas por la presencia de ARN doble cadena, que es procesado en duplexes de RNA de 21 a 24 pb llamados siARN (“small interfering RNA” en inglés) por la enzima RNasa III Dicer y sus homólogos. Una de las dos hebras del los siARNs es incorporada al complejo RISC (“RNA-induced silencing complex” en inglés), que está compuesto por varias subunidades y dirige la degradación de moléculas de ARN que tengan suficiente identidad de secuencia con el siARN (Dunoyer *et al.*, 2010a, Voinnet, 2005). Las moléculas de siARN generadas a partir del ARN doble cadena representan un indicio claro de que se ha desencadenado el silenciamiento génico y pueden ser detectadas por Northern Blot o secuenciación.

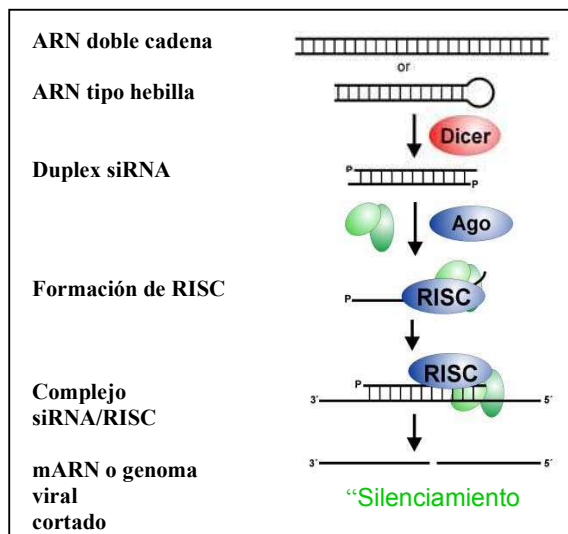


Fig. I.5. Esquema del mecanismo de silenciamiento génico disparado por la presencia de ARN doble cadena. La enzima Dicer o sus homólogos cortan en ARN doble cadena en duplex de siRNA. Se forma el complejo RISC que carga una de las dos hebras del siRNA y degrada todo ARN con suficiente identidad de secuencia con el siRNA.

Una evidencia temprana del rol del silenciamiento génico en la defensa contra virus fue el descubrimiento de que prácticamente todos los virus vegetales codifican para supresores del silenciamiento, tales como la proteína HcPro codificada por los

potyvirus, que funcionan como factores de patogenicidad (del Vas *et al.*, 2008). El estudio de las bases moleculares del silenciamiento génico ha revelado un sistema altamente complejo en el que están involucrados ARNs pequeños de distinto tamaño y origen, familias de genes con funciones diferenciadas o parcialmente superpuestas y una elaborada interacción entre factores celulares y virales durante el establecimiento de la infección en una planta hospedante (Eamens *et al.*, 2008, Voinnet, 2005).

El descubrimiento y comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes al silenciamiento génico ha permitido el desarrollo de herramientas biotecnológicas que lo explotan. La posibilidad de silenciar uno o más genes endógenos en forma específica ha permitido el estudio de la función de una gran cantidad de genes en distintos organismos (Waterhouse y Helliwell, 2003). Wesley y colaboradores (2001) analizaron distintas conformaciones en las que podía clonarse un fragmento desencadenador del silenciamiento y encontraron que las eficiencias más altas de silenciamiento en plantas transgénicas (promedio 90%) se obtenían cuando el fragmento era clonado en dirección sentido y antisentido a ambos lados de un intrón, construcciones denominadas tipo horquilla o “hairpin” en inglés. Este tipo de construcciones fue utilizada para desarrollar transgenes de resistencia a virus, obteniéndose hasta un 90% de plantas transgénicas resistentes a virus, contra un 5-20% obtenido mediante la expresión de construcciones sentido o antisentido (Prins *et al.*, 2008). Mediante la expresión de horquillas que contienen secuencias del virus que se desea controlar en plantas transgénicas, el complejo RISC es cargado con siRNA específicos del virus de manera previa a la infección. Cuando se produce la inoculación con un número limitado de moléculas virales, éstas serían rápidamente degradadas por la maquinaria de silenciamiento antes de que se puedan expresar los genes virales, incluyendo los que codifican para supresores del silenciamiento (Prins *et al.*, 2008). Existen numerosos ejemplos de plantas resistentes a virus desarrolladas con esta tecnología, como papaya resistente al *Papaya ringspot virus* (Ferreira *et al.*, 2002), papas resistentes al *Potato leaf roll virus* y *Potato virus Y* (Bravo-Almonacid *et al.*, 2012) o cebada resistente al *Barley yellow dwarf virus*, con varios desarrollos explotados a escala comercial (Eamens *et al.*, 2008). Inclusive, Bucher y colaboradores (2006) demostraron que se podía obtener resistencia simultánea a cuatro tospovirus distintos en tomate utilizando fragmentos no homólogos correspondientes al gen N de los cuatro virus blanco en una construcción tipo horquilla. Esta estrategia permite sortear la desventaja de las tecnologías de silenciamiento de ARN que no serían efectivas contra virus cuya secuencia difiera en más de un 10%

respecto del transgén (Harrison, 2002). En caña de azúcar, Ingelbrecht y colaboradores (1999) reportaron que cañas transgénicas para el gen de la proteína de cápside del SrMV raza SCH mostraba niveles decrecientes de resistencia a medida que la identidad de secuencia del transgén disminuía con la correspondiente secuencia del SrMV infectante, hasta llegar a ser completamente susceptible al SCMV raza D con la que comparte una identidad de secuencia de 0,75. En este sentido, Prins y colaboradores recomiendan tener un buen conocimiento de la diversidad genética del virus contra el cual se busca resistencia, ya que se espera que tenga un impacto importante en la probabilidad de que se quiebre la resistencia de las plantas transgénicas.

I.6.3. Antecedentes de caña de azúcar transgénica resistente o tolerante a virus

La resistencia a virus mediada por silenciamiento génico ha sido reportada para una amplia variedad de especies vegetales y patógenos (Prins, 2003, Prins *et al.*, 2008, Sharp *et al.*, 2002). Existen antecedentes de caña de azúcar transgénicas en las que se busca resistencia contra distintos virus. Aparte del mosaico, otros dos virus que afectan a la caña de azúcar han atraído esfuerzos de investigación. Gilbert y colaboradores (2009) obtuvieron cañas transformadas con una versión antisentido no traducible del gen de la proteína de cápside del *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV género *Polerovirus*, familia *Luteoviridae*) bajo la dirección del promotor del gen de la ubiquitina de maíz (UBI), expresado junto con el péptido antimicrobiano Cecropin B y utilizando el gen selector NptII (cobombardeado). Las dos líneas de plantas transgénicas obtenidas fueron analizadas en un ensayo a campo bajo condiciones naturales de infección (el virus es transmitido por áfidos) y encontraron que los porcentajes de infección eran bajos para las plantas transgénicas (0-5%) y para plantas regeneradas *in vitro* (24%), comparados contra el variedad no transformada (98%). Sin embargo el desempeño agronómico de las plantas transgénicas fue inferior a los controles de la variedad no transformada. Zhu y colaboradores (2011) obtuvieron cañas transgénicas que expresan una versión no traducible del gen de la proteína de cápside del SCYLV bajo la dirección del promotor UBI, cobombardeando con el gen selector NptII. En un ensayo de inoculación con áfidos virulíferos determinaron por RT-qPCR que en las líneas transgénicas los títulos virales del SCYLV eran hasta 4 órdenes de magnitud inferiores al control de la variedad no transformada, aunque algunas líneas acumulaban virus en cantidades similares a los controles. Finalmente, McQualter y colaboradores (2004) reportaron la transformación de caña con un fragmento traducible del segmento

9 ORF 1 del *Fiji disease virus* (FDV, *Fijivirus*, *Reoviridae*) bajo la dirección del promotor UBI. En un ensayo de infección con chicharritas virulíferas realizado en condiciones controladas de invernáculo encontraron que, de 64 líneas transgénicas, una demostró una resistencia significativa al virus, aunque no estaba claro el mecanismo de la resistencia.

Las primeras cañas transgénicas en las que se buscaba resistencia para un virus fueron desarrolladas por Joyce y colaboradores en 1998. Los autores transformaron caña utilizando una construcción que expresaba una versión traducible del gen de la proteína de cápside del SCMV bajo la dirección del promotor del gen de la ubiquitina de maíz (UBI) y cobombardearon con un plásmido portando el gen selector NptII. Las plantas obtenidas fueron desafiadas con un extracto infectivo de SCMV y se observaron posteriormente cuatro fenotipos: inmunes (sin síntomas de mosaico y títulos virales no detectables por ELISA), de recuperación (mostraban síntomas inicialmente pero las hojas nuevas no presentaban virus detectable), “atípicas” (mostraban un patrón de manchas distinto del mosaico y no presentaban virus detectable) y susceptibles (mostraban síntomas y títulos altos de virus). Los autores no encontraron cantidades detectables de la proteína de cápside en las plantas transgénicas y sugirieron que la resistencia estaba mediada a nivel del ARN.

Ingelbrecht y colaboradores (1999) transformaron caña con una versión no traducible del gen de la proteína de cápside del SrMV raza SCH bajo el control del promotor UBI de maíz. En ensayos de inoculación artificial con un extracto infectivo de SrMV (raza SCH) encontraron tres fenotipos: resistentes, susceptibles y un fenotipo de recuperación. En una extensa caracterización molecular, determinaron por “Southern blot” el número de copias insertadas del transgén y del plásmido con el gen selector NptII (que otorga resistencia al antibiótico kanamicina y geneticina) o Bar (que otorga tolerancia al herbicida bialaphos, principio activo fosfinotricina) de todas las plantas regeneradas (225), que varió entre 1 y más de 15 copias. Distintas plantas con un mismo patrón de inserción de los transgenes podían demostrar un, dos o hasta los tres fenotipos de resistencia a mosaico descriptos. En experimentos de “Northern blots”, “run-off transcription” y análisis de metilación del transgén encontraron evidencias consistentes con un mecanismo de resistencia mediado por silenciamiento génico.

Por su lado Gilbert y colaboradores (2005) reportaron el desarrollo de cañas transgénicas expresando una versión no traducible del gen de la proteína de cápside del SCMV bajo la dirección del promotor UBI y cobombardeando con una plásmido

portando el gen selector NptII. Las plantas obtenidas fueron testeadas bajo condiciones naturales de infección y caracterizadas por su desempeño agronómico y productivo. En general encontraron una gran variabilidad en los caracteres agronómicos medidos y detectaron algunas accesiones que no se infectaron a campo y se desempeñaban igual o mejor que el control no transgénico.

Finalmente, otros dos reportes dan cuenta de proyectos de caña de azúcar transgénica en las que se busca resistencia a mosaico que se encuentran en distinto grado de avance (Jain *et al.*, 2007, Sooknandan *et al.*, 2003).

Cabe notar que en ninguno de los desarrollos mencionados en la presente sección se busca resistencia contra más de una especie viral simultáneamente. Por otro lado, en todos los reportes se utiliza el cobombardeo con un plásmido portando un gen selector. Esta estrategia produce generalmente la inserción al azar en el genoma vegetal de múltiples copias de los dos plásmidos cobombardeados (Ingelbrecht *et al.*, 1999). Esto aumenta la complejidad de la caracterización molecular requerida por las autoridades regulatorias de OVGMs, lo que podría representar una desventaja respecto de eventos obtenidos al bombardear con un único plásmido portando ambos genes. Además, se ha reportado la transformación exitosa con fragmentos lineales de ADN conteniendo únicamente el casete de expresión vegetal (en inglés “minimal cassette”), lo que aumentaría las ventajas desde el punto de vista regulatorio (Agrawal *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2011).

I.6.4. Evaluación de las plantas transgénicas con resistencia o tolerancia a virus

La evaluación de la efectividad de un transgén de resistencia a virus en plantas transgénicas depende del modo de transmisión del virus (a través de vectores naturales o inoculación artificial), del fenotipo que la infección genera y de los niveles de susceptibilidad debido el fondo genético de la variedad transformada. Los parámetros normalmente registrados en ensayos de cañas transgénicas pueden incluir la presencia - ausencia de síntomas visuales (Gilbert *et al.*, 2005) y el tiempo que demoran en aparecer, títulos virales en algún órgano vegetal determinado por ELISA o PCR cuantitativa (Joyce *et al.*, 1998, Zhu *et al.*, 2011) y efectos sobre parámetros productivos como el peso del órgano cosechado, tamaño de la planta, calidad de la materia prima, etc. (Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009). Es importante la selección de controles adecuados para comparar el desempeño de las plantas transgénicas. La utilización de plantas de la variedad de caña no transformada que se encuentren en el mismo estadio

fisiológico que las plantas transgénicas representan un control adecuado (Gilbert *et al.*, 2009), ya que la respuesta a la infección viral es diferente entre distintas variedades de caña y se ve afectado por la edad de la planta (Koike y Gillaspie, 1989, Koike y Tippett, 1971). La inclusión de controles no transgénicos regenerados a partir de material *in vitro* puede mostrar los efectos de la variación somaclonal que sufren las plantas transgénicas que atraviesan el cultivo de tejidos (Vickers *et al.*, 2005b). Por otro lado, también es conveniente incluir controles no transgénicos que han sido propagados siguiendo las prácticas habituales del cultivo, aunque la disponibilidad de material libre de virus, ya sea a campo o *in vitro*, puede ser una limitante a la hora de seleccionar un control adecuado.

Aparte del fenotipo de resistencia ya descrito, es posible que las plantas transgénicas muestren un fenotipo de tolerancia, en el que se establece la infección viral, se presentan síntomas visuales pero esto no afecta el normal desarrollo de la planta ni sus parámetros productivos. La desventaja de este tipo respuesta es que las plantas que expresan tolerancia aumentan las poblaciones virales del patosistema y pueden convertirse en una fuente de inóculo para otras variedades que son susceptibles a la enfermedad (Lecoq *et al.*, 2004).

Un primer paso consiste típicamente en la evaluación de la resistencia bajo condiciones controladas, como por ejemplo ensayos de inoculación artificial en invernáculos o utilizando vectores virulíferos distribuidos manualmente sobre todas las plantas ensayadas. Dado que tanto el SCMV como el SrMV son factibles de ser transmitidos mecánicamente (Koike y Gillaspie, 1989), ésta técnica ha sido utilizada para desafiar cañas transgénicas portando un transgén de resistencia contra los mismos (Ingelbrecht *et al.*, 1999, Joyce *et al.*, 1998). Varios factores tales como las condiciones fisiológicas de las plantas, la temperatura y la radiación pueden afectar la eficiencia de infección del SCMV (Koike y Gillaspie, 1989). Por otro lado, la exposición a vectores virulíferos fue ensayada en cañas transgénicas en las que se buscaba resistencia contra el FDV (McQualter *et al.*, 2004) y contra el SCYLV (Zhu *et al.*, 2011), aunque ésta técnica puede resultar poco práctica cuando se desea analizar un gran número de plantas.

La evaluación en ensayos a campo tiene las ventajas de exponer a las plantas transgénicas a los factores ambientales y bióticos bajo los cuales se espera que demuestren un mejor desempeño que su contraparte no transgénica. Las principales desventajas son que en la práctica no se controla la acción de los insectos vectores, cuya

población puede variar en distintos años o en las distintas localidades donde se emplaza el ensayo, y tampoco se tiene un control sobre las razas / variantes virales a los cuales se verán expuestas las plantas transgénicas, aunque una opción intermedia consiste en realizar inoculaciones artificiales en material plantado a campo (Sharp *et al.*, 2002) En consecuencia, es aconsejable evaluaciones multianuales y en más de una localidad hasta poder caracterizar adecuadamente una línea transgénica. Para aumentar la presión viral en el ensayo se puede utilizar borduras y cabeceras con plantas enfermas con el virus o ubicar el ensayo próximo a plantaciones comerciales con síntomas (Gilbert *et al.*, 2005). A su vez, la selección de la fecha de plantación del ensayo puede realizarse para que coincida la época de máxima susceptibilidad de las plantas con el momento de mayores poblaciones del insecto vector, que para la caña de azúcar en Argentina corresponde a las plantaciones de verano (Ing. Agr. Ricardo Fernández de Ullivarri, comunicación personal). De esta manera se maximiza las posibilidades de que cada planta se vea desafiada con el virus y que las plantas sanas no sean producto de un “escape” a la infección.

Es deseable la inclusión de réplicas de cada evento a evaluar plantados en un diseño en bloques completamente aleatorizados (Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009), aunque la disponibilidad de suficiente semilla puede limitar el diseño experimental de los ensayos. En el laboratorio se obtienen típicamente un número variable de plantas por evento, y en el caso de caña de azúcar se requiere de al menos un año de desarrollo a campo para permitir el crecimiento de un número considerable de tallos maduros a ser utilizados como caña semilla. Esto resulta normalmente en que en el primer ensayo a campo las parcelas no tengan réplicas y recién en una segunda campaña se pueda plantar un ensayo en bloques completamente aleatorizados (Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009). Los datos iniciales de infección tienen una distribución binomial, ya que se registra planta o parcela sana vs. planta o parcela enferma. Es posible estimar en los controles no transgénicos una proporción de plantas sanas con su respectivo intervalo de confianza y comparar con la proporción de plantas sanas de cada evento.

A pesar de las limitaciones, varios autores destacan en caña y otros cultivos la importancia de realizar evaluaciones detalladas a campo, no solo para confirmar el fenotipo de resistencia a virus, sino para evaluar que las características agronómicas de la variedad transformada no hayan sido perjudicadas por el proceso de cultivo *in vitro* y transformación (Bravo-Almonacid *et al.*, 2012, Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009,

Ogwok *et al.*, 2012, Sharp *et al.*, 2002). Adicionalmente, el silenciamiento de transgenes ha sido reportado ampliamente en caña de azúcar (Butterfield *et al.*, 2002, Ingelbrecht *et al.*, 1999, Potier *et al.*, 2008), por lo que se recomienda la obtención y evaluación de un número grande de eventos independientes para asegurarse la obtención de líneas con las características deseadas.

Por último, cabe notar que en la Argentina se encuentran reguladas las actividades relacionadas con organismos genéticamente modificados (OGM) de uso agropecuario (Resoluciones N° 241/2012, 661/2011, 701/2011, 60/2007 y 412/2002). Para ello se creó la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA, Resolución 124/91) como instancia de evaluación y consulta, en el ámbito de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP).

Tanto la CONABIA como la Dirección de Biotecnología tienen como objeto garantizar la bioseguridad del agroecosistema. Para ello, analizan y evalúan las solicitudes presentadas para desarrollar actividades con OGM. En base a información científico-técnica y a datos cuantitativos respecto de la bioseguridad del OGM, emiten en conjunto un dictamen no vinculante que presentan ante la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, la autoridad de aplicación, que autoriza o no la realización de las actividades solicitadas. El ensayo de invernáculo y el ensayo de campo con cañas de azúcar transgénicas descriptos en la presente Tesis fueron realizados cumpliendo la normativa vigente aplicable a OGMs.

I.7. Objetivos de la presente Tesis

Los objetivos de la presente Tesis son:

- 1) Desarrollo de un protocolo rápido y simple que permita la caracterización a nivel nucleotídico de la variabilidad genética de los agentes causales del mosaico en la región.
- 2) Estudio de la diversidad genética de los virus causales del mosaico de la caña de azúcar en Argentina y regiones cañeras limítrofes.
- 3) Diseño y obtención de una construcción genética capaz de desencadenar el mecanismo de silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico y la obtención de líneas de caña de azúcar transgénicas que expresen dicha construcción.

4) Evaluación de las líneas de cañas transgénicas obtenidas por su resistencia a la enfermedad del mosaico en un ensayo de inoculación artificial y en un ensayo de infección natural a campo.

Capítulo I

Capítulo I

Objetivo general: Desarrollo de un protocolo rápido y simple que permita la caracterización a nivel nucleotídico de la variabilidad genética de los agentes causales del mosaico en la región.

Objetivos particulares:

1. Desarrollo de un protocolo de extracción rápido y económico de ácidos nucleicos que permitiera procesar un gran número de muestras de caña de azúcar, evitando el macerado de tejido.
2. Desarrollo de un protocolo para la amplificación por RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV partiendo de un extracto crudo de hoja.
3. Determinación de la estabilidad de los extractos y las condiciones óptimas de amplificación de los virus causales del mosaico.
4. Desarrollo de un protocolo que permita la secuenciación directa de los productos de RT-PCR, evitando la purificación y el clonado de los mismos.

I. Resultados.

La identificación de cepas virales de SCMV y SrMV se realizaba tradicionalmente utilizando hospedantes diferenciales, una técnica laboriosa y lenta (Vázquez de Ramallo, 1981). Más recientemente, se desarrolló la técnica de polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP, por su sigla en inglés) del producto de amplificación de la proteína de cápside por RT-PCR (Yang y Mirkov, 1997), lo que simplificó enormemente la identificación de cepas virales. Sin embargo, estudios realizados en Louisiana, EEUU, (Grisham y Pan, 2007) y en la provincia de Tucumán (Perera *et al.*, 2009), indican que un 13 y 60% de las muestras respectivamente resultan en patrones de RFLP diferentes a los descritos con anterioridad. Además, la variabilidad en la secuencia nucleotídica de poblaciones de SCMV en África (Alegria *et al.*, 2003) y China (Xu *et al.*, 2008) es muy alta, con aislamientos que no se agrupan con cepas virales descritas previamente. Estos resultados sugieren que para una adecuada caracterización de la población viral del mosaico se requiere información de secuencia nucleotídica de los aislamientos. Por este motivo, se decidió desarrollar un protocolo que brindara información de la secuencia nucleotídica de la proteína de cápside, ya que es el gen del cuál se dispone del mayor número de secuencias publicadas y es adecuado para realizar estudios filogenéticos (Adams *et al.*, 2004b).

Sin embargo, para realizar una adecuada descripción de poblaciones virales se necesitan procesar un gran número de muestras, que resulta impráctico con las técnicas estándar de procesamiento. Se han reportado varios protocolos para amplificar secuencias virales a partir de extractos simples de muestras de varias especies vegetales (Berthomieu y Meyer, 1991, Thomson y Dietzgen, 1995). El protocolo reportado por Thomson y Dietzgen en 1995 para la detección de virus de banana, zapallito y lechuga nos resultó particularmente atractivo por su simplicidad y el bajo costo de los reactivos. Se decidió intentar adaptarlo a caña de azúcar, una monocotiledónea, para la detección del SCMV y del SrMV en plantas sintomáticas.

El objetivo de este capítulo fue desarrollar un protocolo rápido y económico para el análisis por RT-PCR y posterior secuenciación de un gran número de muestras de caña de azúcar infectadas con el SCMV y/o el SrMV. El protocolo desarrollado sería

utilizado para caracterizar los agentes causales del mosaico en la Argentina, y zonas cañeras limítrofes de Bolivia, Uruguay y Paraguay.

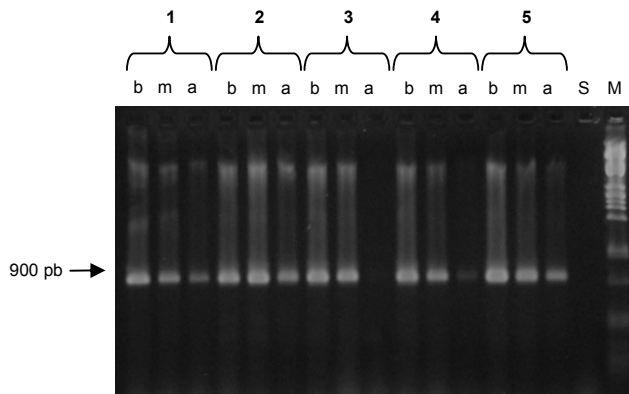
Se partió de un protocolo de preparación de tejidos para la detección de virus a ARN desarrollado por Thomson y Dietzgen en 1995 para virus de lechuga y zapallito, y se lo adaptó para su uso en caña de azúcar. El protocolo consiste en cortar un disco foliar con la tapa de un tubo eppendorf conteniendo buffer de extracción, incubarlo brevemente a 95°C y amplificar cDNAs de un fragmento del genoma viral directamente a partir de una alícuota del sobrenadante. Para el ajuste del protocolo para caña de azúcar se analizó una serie de factores que afectan la eficiencia de amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside a partir del tejido preparado, tales como la posición de muestreo en la hoja, la estabilidad de la muestra de hoja a 4°C, la estabilidad de los extractos a -20°C y -80°C, la composición de la mezcla de RT-PCR, el límite de detección y la aptitud de los productos de RT-PCR para ser secuenciados directamente, sin pasos de purificación en gel ni de clonado. La puesta a punto del protocolo se basó en gran medida en los resultados de amplificación de un fragmento de genoma viral a partir de los iniciadores SCMV R3 y SCMV F4 (Alegria *et al.*, 2003, Yang y Mirkov, 1997), que amplifican un fragmento de 850-900 pb del gen de la proteína de cápside del SCMV.

1.1. Determinación de las condiciones adecuadas para la preparación de la muestra y para conservar la estabilidad del mRNA viral

1.1.1. Determinación de la posición óptima de muestreo a lo largo de la hoja +1 para la detección viral por RT-PCR

Como los síntomas de mosaico son más evidentes hacia la base de la hoja, cabe la posibilidad de que el título viral varíe en las distintas posiciones de la hoja a muestrear. Para verificar la conveniencia de utilizar un sector particular del tejido de hoja como muestra, se realizaron experimentos de amplificación de un fragmento del genoma de SCMV a partir de distintas porciones de la hoja +1. Se prepararon extractos de hoja a partir de muestras tomadas de la porción basal, media y apical de cinco variedades de caña diferentes (Q 151, NCo 310, NA 84-3419, NA 84-3013 y NA 94-960) infectadas con el SCMV y se amplificaron por RT-PCR. Las muestras de la porción basal mostraron siempre una amplificación óptima (Fig. 1.1). Aunque en

algunos casos se obtuvieron productos de amplificación de intensidad similar en las tres posiciones, las amplificaciones más débiles fueron obtenidas en todos los casos a partir de la porción apical. Estos resultados correlacionan con la intensidad de síntomas visuales observados a lo largo de la hoja.



.Fig. 1.1. Optimización de la posición de muestreo para la detección de SCMV en la hoja. Se amplificó por RT-PCR un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV a partir de extractos preparados de la porción basal (b), media (m) y apical (a) de hojas infectadas con el SCMV de cinco variedades de caña de azúcar, numeradas 1 a 5 arriba de los corchetes: (1) Q 151; (2) Nco 310; (3) NA 84-3419; (4) NA 84-3013; (5) NA 94-960. S, muestra sana; M, marcador de peso molecular: ADN de fago lambda digerido PstI

1.1.2. Almacenamiento de las muestras de hoja de caña

Se analizó la estabilidad de las muestras de hoja conservadas a 4°C para determinar el tiempo máximo disponible entre el muestreo a campo y la extracción en el laboratorio. Se colectaron muestras de hoja sintomáticas y se las almacenó a 4°C durante períodos de 3, 7 y 22 días, procediéndose luego a la preparación del extracto de hoja. Se amplificó por RT-PCR un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y se comparó la intensidad de la banda específica de amplificación visualizada en un gel de agarosa. Como resultado, se obtuvieron productos de amplificación con los iniciadores para el SCMV en las tres fechas de muestreo, observándose una reducción gradual en el rendimiento de la amplificación a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento (Fig. 1.2, no incluye las muestras de tres días de almacenamiento). Las muestras de hoja conservadas a 4°C resultaron estables entre su recolección y el procesamiento en el laboratorio por un lapso de al menos 22 días. Esta ventana de tiempo disponible entre la fecha de muestro y el procesamiento en el laboratorio resultaría adecuada para el muestreo a gran escala que se realizó mas adelante (ver Capítulo II).

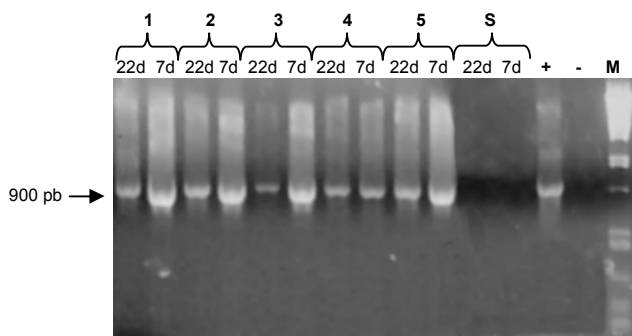


Fig. 1.2. Análisis de la estabilidad de extractos de muestras de hoja de caña luego de almacenamiento a 4°C. Se amplificó por RT-PCR un fragmento del gen de la proteína de cápside de SCMV a partir de extractos preparados de hojas conservadas a 4°C por 7 y 22 días (7d y 22d, respectivamente). Resultados para plantas sintomáticas de 5 variedades, numeradas 1 a 5 arriba del corchete: (1) CP 72-2086; (2) FAM 80-112; (3) CP 52-68; NA 92-1925; (5) CP 85-1625; S, planta sana de la variedad Q 151 mantenida en invernáculo; +, control positivo; -, control negativo de RT-PCR sin templado; M, marcador molecular: ADN de fago lambda digerido con PstI.

También se evaluó la estabilidad de muestras de hoja conservadas a -80°C. Se conservaron hojas sintomáticas congeladas a -80°C por 9 meses, momento en el que se tomó una muestra y analizó por RT-PCR para un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV. A partir de dichas muestras se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado, indicando que las muestras son estables a -80°C por al menos 9 meses (resultados no mostrados).

1.1.3. Determinación de las condiciones adecuadas para el almacenamiento del extracto de hojas de caña para la detección viral por RT-PCR

Se determinó la factibilidad de almacenar los extractos crudos de hoja dejando el disco foliar en el buffer de extracción a -20°C para la posterior detección del virus. Para esto, se analizaron muestras que fueron congeladas con o sin el disco foliar después de finalizado el protocolo de extracción mediante RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV. No se observaron diferencias en la amplificación en las muestras en que se dejaba el disco foliar. Más aún, los extractos que fueron congelados y descongelados en hasta dos ocasiones no sufrieron efectos negativos evidentes sobre la amplificación por RT-PCR (resultados no mostrados).

Se analizó la estabilidad de los extractos de hoja a distintas temperaturas. Para esto, se prepararon extractos a partir de hojas sintomáticas y se los conservó a temperatura ambiente, a 4°C, a -20°C y a -80°C por un tiempo variable y luego se amplificó por RT-PCR un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV. Los extractos mostraron ser inestables a temperatura ambiente, ya que a los 7 días de almacenaje bajo dichas condiciones no se obtuvieron productos de amplificación. Los

extractos demostraron ser estables por al menos 1 mes a 4°C, 6 meses a -20°C y 9 meses a -80°C (Fig. 1.3, datos para estabilidad a -20°C). La mayoría de las muestras mostraron una reducción gradual en la intensidad de los productos de amplificación a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento para todas las temperaturas analizadas. Estos resultados indican que el almacenamiento de los extractos a -20°C provee una ventana de tiempo adecuada entre el procesamiento de la muestra de hoja y la amplificación por RT-PCR.

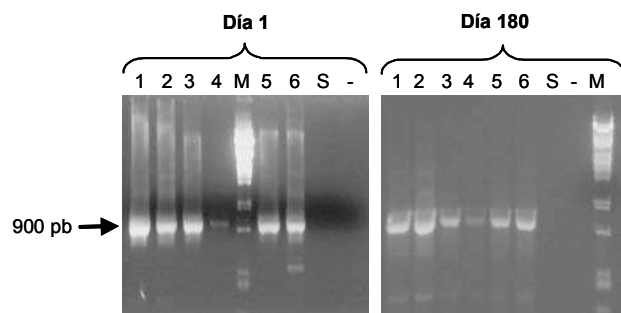


Fig. 1.3. Análisis de la estabilidad de los extractos almacenados a -20°C. RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside de 6 muestras de plantas de invernáculo infectadas con SCMV (numeradas 1 a 6). La amplificación se realizó inmediatamente después del muestreo (día 1) o después de 6 meses de almacenamiento a -20°C (día 180). M, marcador molecular: ADN del fago lambda digerido con PstI; S, planta sana; -, control negativo de RT-PCR sin templado.

1.2. Determinación de las condiciones que afectan la reacción de RT-PCR del SCMV

1.2.1. Buffer de RT-PCR

Para lograr una amplificación óptima, resulta crítico ajustar la composición del buffer de RT-PCR de modo de compensar el alto contenido de sal en el buffer de extracción (KCl 1M). Se ha reportado que la concentración final de KCl en la mezcla de PCR no debería superar los 60 mM (Thomson y Henry, 1995). Se puede obtener una concentración adecuada de sales en la mezcla de PCR limitando la cantidad de muestra en la mezcla de amplificación o, alternativamente, ajustando la composición del buffer de RT-PCR (Thomson y Dietzgen, 1995). En una serie de experimentos preliminares se obtuvieron menores rendimientos de producto de amplificación al limitar la cantidad de muestra en la mezcla de RT-PCR, motivo por el que se decidió evaluar distintas composiciones en el buffer de amplificación. Se ensayaron cuatro buffers de RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y se obtuvo productos de amplificación en aquellos que no incluían sales en su composición: buffer

PCR 10 X –KCl (Tris-base 100 mM, pH 8,8) y buffer PCR 10 X –KCl + Tween (Tris-base pH 8,8, Tween 20 0,1%). Utilizando estos buffers se alcanza una concentración estándar de KCl de 50 mM al agregar 2 µl de extracto de hoja a la mezcla de RT-PCR de un volumen final de 40 µl. La inclusión del detergente Tween 20 mejoró levemente la amplificación de productos específicos, por lo tanto se incluyó este reactivo en el protocolo de amplificación. Por otro lado, no se obtuvieron productos de amplificación al usar buffers de PCR comerciales (Fermentas Life Sciences) que incluyen KCl (50 mM concentración final) o (NH₄)₂SO₄ (20 mM concentración final) (resultados no mostrados).

1.2.2. Condiciones de la reacción de RT-PCR

Se ensayaron distintas condiciones de amplificación para optimizar la obtención de producto específico, reduciendo en lo posible la cantidad de enzimas a utilizar en vistas de obtener un protocolo de bajo costo por muestra. Las condiciones de amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV por RT-PCR fueron optimizadas partiendo de las condiciones de amplificación reportadas por Alegria y colaboradores (2003). La incorporación de 1 versus 4 unidades de Taq DNA polimerasa y 16 versus 80 unidades de transcriptasa reversa (en un volumen final de 40 µl) en el cóctel de reacción no influyó en el rendimiento del producto específico de amplificación (datos no mostrados). Por lo tanto, en el protocolo final se usó 1 unidad de Taq DNA polimerasa y 16 unidades de transcriptasa reversa en la mezcla de RT-PCR.

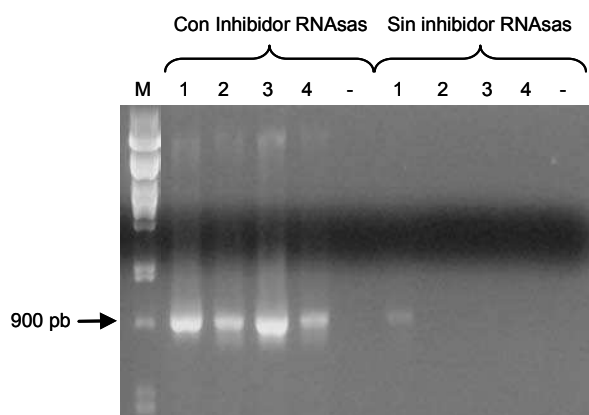


Fig. 1.4. Requerimiento de un inhibidor de RNAsas para la amplificación por RT-PCR. Amplificación por RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside de SCMV a partir de extractos de 4 plantas (calles 1 a 4) infectadas con SCMV en presencia (izquierda) o ausencia (derecha) del inhibidor de RNAsas Ribolock (Fermentas Life Sciences, Lituania). M, marcador molecular: ADN del fago lambda digerido con PstI; -, control negativo de RT-PCR sin templado.

Se analizó a continuación el efecto de la inclusión de un inhibidor de ARNsas en la mezcla de amplificación. Se realizó una RT-PCR a partir de 4 muestras de plantas

infectadas con el SCMV incluyendo o no un inhibidor de ARNasas, visualizándose los productos de amplificación en un gel de agarosa. La inclusión del inhibidor de ARNasas en la mezcla de RT-PCR resultó crítica para una adecuada amplificación en la mayoría de las muestras (Fig. 1.4). Este resultado es esperable ya que en el proceso de extracción de la muestra no se incluye ningún reactivo o paso que elimine las ARNasas de la muestra.

Por otro lado, se evaluaron distintas temperaturas de anillamiento en el termociclado para reducir los potenciales productos inespecíficos de amplificación. Una temperatura de anillamiento de 60°C mejoró la especificidad y el rendimiento de producto de amplificación comparado con 61,9°C, 63,7°C y 66°C. Sin embargo, algunas muestras mostraron productos de amplificación inespecíficos a todas las temperaturas evaluadas (datos no mostrados).

Finalmente, se compararon 35 versus 45 ciclos de amplificación en el programa de termociclado para un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV. Se realizó una dilución seriada de muestras positivas para el SCMV y el SrMV y se las sometió a los dos programas de amplificación. Al visualizar la intensidad de las bandas en un gel de agarosa no se observaron diferencias significativas en el rendimiento del producto de amplificación (datos no mostrados). Por lo tanto, se implementaron 35 ciclos de amplificación en el protocolo final para evitar la formación de productos inespecíficos.

Las condiciones de amplificación optimizadas para el SCMV fueron ensayadas para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside de SrMV a partir de muestras de caña de campo sintomáticas. Utilizando los iniciadores SrMV F3 y SrMV R3 (Yang y Mirkov, 1997) se obtuvieron los productos de amplificación del tamaño esperado, demostrando que el protocolo es robusto para la detección de ambos virus (Fig. 1.5A). De esta manera, se puede utilizar el mismo protocolo de preparación de la muestra de hoja y las mismas condiciones de RT-PCR para amplificar cualquiera de los dos agentes causales del mosaico de la caña de azúcar.

Para determinar si los extractos son factibles de ser analizados con pares de iniciadores degenerados, se ensayó la amplificación por RT-PCR con los iniciadores oligo1n y oligo2n (Marie-Jeanne *et al.*, 2000), diseñados para amplificar un fragmento del gen de la proteína de cápside de potyvirus que infectan poáceas, que incluye al SCMV y al SrMV. Se analizaron dos muestras positivas para el SrMV y seis muestras positivas para el SCMV utilizando las condiciones de amplificación optimizadas para el

SCMV y los parámetros de termociclado reportados por Marie-Jeanne y colaboradores, (2000). Se obtuvo el producto de amplificación del tamaño esperado a partir de todas las muestras (Fig. 1.5B), lo que confirma que el protocolo de extracción es robusto y versátil.

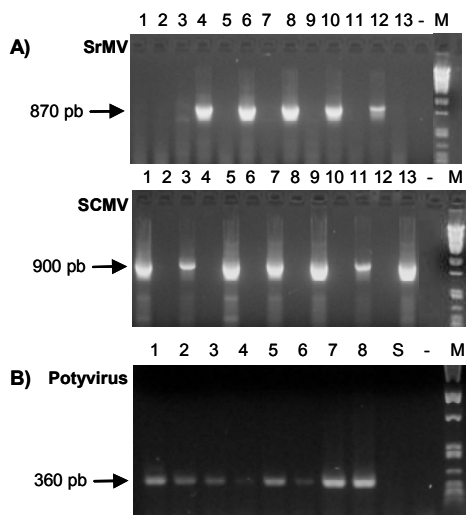


Fig. 1.5. (A) Prueba del protocolo de amplificación de muestras de campo. Amplificación por RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SrMV (panel superior) y del SCMV (panel inferior) a partir de 13 muestras de campo de la provincia de Santa Fe (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13) y del departamento de Guairá, Paraguay (calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12). (B) Amplificación de un fragmento de la proteína de cápside de potyvirus con los iniciadores degenerados oligo1n y oligo2n a partir de dos muestras positivas para SrMV (calles 1 y 2) y seis muestras positivas para SCMV (calles 3 a 8) recolectadas en las provincias de Salta y Jujuy. S, control sano; M, marcador molecular: ADN del fago lambda digerido con PstI; -, control negativo de RT-PCR sin templado.

1.3. Límite de detección de la RT-PCR

Para determinar la sensibilidad del protocolo de detección, se realizó un experimento de dilución seriada de muestras de campo infectadas con el SCMV. Se diluyeron los extractos positivos para SCMV en un extracto preparado a partir de una planta sana de invernáculo con el objetivo de reproducir las condiciones de amplificación con títulos bajos de virus, sin diluir potenciales inhibidores de la RT-PCR y/o de ARNsas. Las muestras así preparadas fueron amplificadas por el protocolo de RT-PCR estándar descrito anteriormente. Las muestras positivas para el SCMV resultaron en productos de amplificación en forma consistente en las diluciones 1:10 y frecuentemente en las diluciones 1:100, pero resultaron negativas para las diluciones 1:1000 (Fig. 1.6). La sensibilidad de la técnica demostró ser adecuada para los fines de analizar muestras de campo infectadas con el SCMV y/o el SrMV. Estos resultados, sin embargo, indican que la sensibilidad del protocolo podría ser incrementada reduciendo la relación volumen de buffer de extracción / tejido vegetal, cortando el tejido en pedazos mas pequeños o triturándolo (Thomson y Dietzgen, 1995).

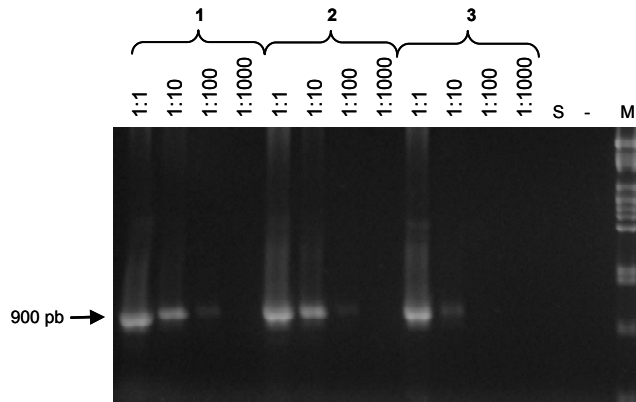


Fig. 1.6. Dilución seriada para establecer el límite de detección de la reacción de RT-PCR. Amplificación por RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside de SCMV a partir de muestras infectadas diluidas con un extracto de planta sana mantenida en el invernáculo. 1:1, sin diluir, 1:10, muestra diluida 1:10, 1:100, muestra diluida 1:100, 1:1000, muestra diluida 1:1000. Resultados para tres plantas sintomáticas de tres variedades distintas de caña de azúcar numeradas 1 a 3 arriba de las llaves: (1) NA 84-3419; (2) NA 84-3013; (3) Q 151. S, planta sana; M, marcador molecular: ADN del fago lambda digerido con PstI; -, control negativo de RT-PCR sin templado.

1.4. Secuenciación directa de productos de la RT-PCR

Con el objetivo de genotipificar con la máxima resolución posible las muestras de virus, se estableció un protocolo de análisis por secuenciación en el que se evitan los pasos usuales de purificación en gel del producto de RT-PCR y su posterior clonado. Se purificaron alícuotas del producto de RT-PCR utilizando un sistema comercial y se secuenciaron directamente (Macrogen, Corea) con los iniciadores usados en la RT-PCR o con versiones más cortas de los mismos. Esta estrategia generó resultados de calidad para los productos de amplificación específicos del SCMV y del SrMV. Sin embargo, no se obtuvieron secuencias de adecuada calidad al tratar de usar los iniciadores degenerados oligo1n y oligo2n para secuenciar el respectivo producto de amplificación, en contraste con un reporte previo en vainilla (Grisoni *et al.*, 2006).

En una primera instancia se secuenciaron 12 productos de amplificación del gen de la proteína de cápside de SrMV utilizando los mismos iniciadores usados en la RT-PCR. De las 24 secuencias obtenidas, 23 tuvieron más de 500 pb con valores de Phred Q de 20 (Ewing y Green, 1998) o mayores (es decir con una probabilidad de error en la secuencia < 1%), con un promedio general de 700 pb con Phred Q20. Después de recortar los extremos de las secuencias de baja calidad, en promedio el 80% del producto de amplificación estaba cubierto por lecturas en ambas hebras del ADN amplificado.

Siguiendo la misma estrategia, se intentó la secuenciación de productos de amplificación del gen de la proteína de cápside del SCMV con los iniciadores de la RT-PCR. Sin embargo, ninguno de los dos iniciadores cumplía con las especificaciones de temperatura de anillamiento requeridas por el proveedor del servicio de secuenciación, por lo que se diseñaron los iniciadores Oli39 y Oli48, que son versiones mas cortas de los iniciadores SCMV F4 y SCMV R3 respectivamente. El 80% de las secuencias obtenidas con el iniciador Oli39 tuvieron más de 500 pb con un valor Phred Q de 20 o más (es decir con una probabilidad de error en la secuencia < 1%), mientras que el 85% de las secuencias obtenidas con el iniciador Oli48 tuvieron más de 500 pb con un valor Phred Q de 20 o más (Fig. 1.7). Estos resultados indican que la calidad de las secuencias de ADN obtenidas es adecuada a partir del protocolo de procesamiento de las muestras desarrollado.

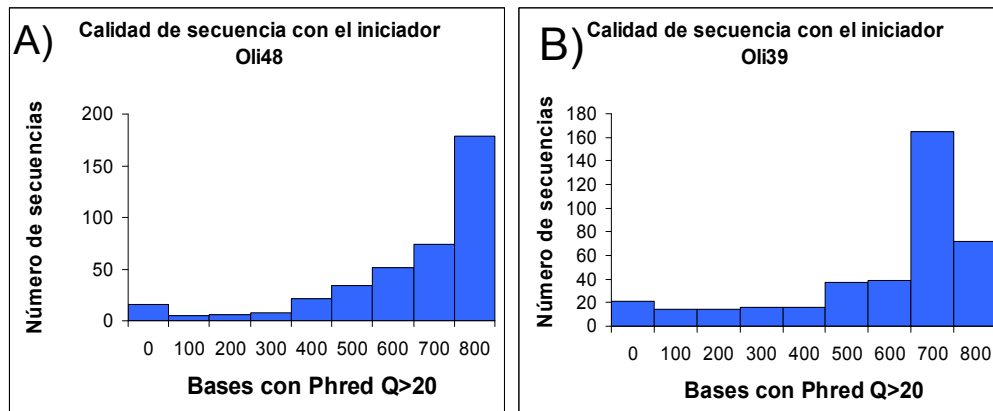


Fig. 1.7. Calidad de las secuencias obtenidas con los iniciadores de secuenciación del gen de la proteína de cápside de SCMV. Número de secuencias con una determinada cantidad de bases con calidad superior a Phred Q20 obtenidas utilizando los iniciadores Oli48 (A) y Oli39 (B) para la reacción de secuenciación.

Las secuencias sentido y antisentido fueron ensambladas en una secuencia consenso con el software Lasergene 7 del paquete DNASTar y comparadas contra la base de datos GenBank utilizando el software BLAST. Estas comparaciones permitieron realizar una primera caracterización de las secuencias y confirmar la especie viral presente en cada muestra.

I. Discusión y Conclusiones

El protocolo rápido de extracción de ácidos nucleicos puesto a punto en el marco de esta Tesis permite a una persona procesar hasta 200 muestras al día, evitando el uso de kits comerciales o reactivos costosos. El extracto crudo preparado a partir de un disco foliar puede ser incorporado directamente a una mezcla de RT-PCR en donde, en un solo tubo y consecutivamente, se sintetiza el cDNA y amplifica por PCR un fragmento de la proteína de cápside del SCMV o del SrMV. Dado que solo se usa material descartable, el riesgo de contaminación cruzada entre muestras se reduce notablemente. Al combinar una RT-PCR de un solo paso, el uso de placas de 96 pocillos y geles de agarosa de 96 pocillos (utilizando pipetas de 12 canales) resultó en un protocolo apto para procesar un gran número de muestras en forma eficiente. Como se describe más adelante en el Capítulo IV, el protocolo rápido de extracción de ácidos nucleicos es también apto para la detección de ADN insertado en el genoma vegetal, permitiendo la amplificación de secuencias derivadas del transgén en muestras de hoja colectadas a campo.

Dado que los síntomas de mosaico (zonas claras con poca clorofila alternadas con zonas oscuras) varía a lo largo de la posición de la hoja y en entre hojas, se determinó la posición óptima de muestreo. En un reporte previo de Balamuralikrishnan y colaboradores (2004) se había establecido que el tejido de hojas jóvenes resultaba óptimo para la detección del SCMV por RT-PCR. Por lo tanto, se tomaron muestras a lo largo de la hoja +1 y se observó que se obtenía mayor cantidad de producto de amplificación en las muestras tomadas de la base de la hoja, que es a su vez donde los síntomas de mosaico son más evidentes (Fig. 1.1).

Se determinó la estabilidad de las muestras de hoja y la estabilidad de los extractos conservados a distintas temperaturas para establecer el tiempo disponible entre la recolección de la muestra, el preparado del extracto crudo y la amplificación por RT-PCR. Las muestras de hoja demostraron ser estables por al menos 22 días a 4°C (Fig. 1.2), lo que permitiría tomar muestras de hojas de caña sintomáticas en lugares distantes como Paraguay y Uruguay y procesarlas varios días después en el laboratorio de la Chacra Experimental. Por otro lado, los extractos de hoja guardados a -20°C resultaron estables por al menos 6 meses (Fig. 1.3) y a -80°C por al menos 9 meses, aunque el rendimiento de la amplificación por RT-PCR disminuía gradualmente con el tiempo. La utilización de kits comerciales para el aislamiento de ARN viral suelen producir extractos más puros y por lo tanto más estables que el protocolo descrito. Sin embargo, el protocolo desarrollado resultó adecuado para los fines del presente estudio. En los

casos en que se quiso conservar ARN de determinadas muestras por períodos mayores al año se recurrió a la utilización del “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen Sciences, Maryland, EEUU) o alternativamente se utilizó el protocolo de Trizol (Invitrogen, Life Technologies Corporation, EE.UU.).

Fue necesario ajustar las condiciones de amplificación descritas previamente para los iniciadores específicos del SCMV y del SrMV. El buffer de RT-PCR fue modificado eliminándose el contenido de sal del mismo para compensar por el alto contenido de sal presente en el buffer de extracción (Thomson y Henry, 1995). Se ajustó el volumen de muestra agregado a la mezcla de RT-PCR de tal manera que la concentración final de KCl resulta óptima para la amplificación.

Resultó indispensable para una adecuada amplificación la inclusión de un inhibidor de ARNsas en la mezcla de RT-PCR, en contraste con lo reportado por Thomson y Dietzgen (1995) para dos virus con genoma de ARN, el *Zucchini yellow mosaic virus* y el *Lettuce necrotic yellows virus*. Ésto probablemente se deba a que la síntesis de cDNA se realiza en el mismo tubo justo antes de la amplificación y que el protocolo de extracción no elimina las ARNsas naturalmente presentes en la muestra de caña de azúcar (Fig. 1.4). Por otro lado, se estableció que el uso de 1 unidad de Taq polimerasa y 16 unidades de transcriptasa reversa en un volumen final de 40 μ l son suficientes para una adecuada amplificación, lo que reduce considerablemente los costos por muestra respecto de los protocolos estándar. Finalmente se determinó que una temperatura de anillamiento de 60°C y 35 ciclos de amplificación en el programa de termociclado resultaron óptimos para la amplificación de las secuencias blanco.

El límite de detección es un parámetro importante a la hora de determinar la utilidad de un protocolo de diagnóstico. (Balamuralikrishnan et al., 2004, Hema et al., 2003, Lopez et al., 2008). Para estimar dicho parámetro en muestras de campo infectadas con SCMV, se realizaron diluciones seriadas de muestras positivas con extractos de muestras negativas de invernáculo. Todas las muestras ensayadas dieron productos de amplificación al ser diluidas 1:10 y la mayoría al ser diluidas 1:100 (Fig. 1.6). Esta sensibilidad probaría ser adecuada para al menos el 97% de las muestras colectadas a campo (ver Capítulo II).

El protocolo de extracción y las condiciones de amplificación optimizadas para SCMV fueron ensayados con plantas de caña de azúcar infectadas con SrMV utilizando iniciadores específicos descritos previamente. Dichas condiciones resultaron adecuadas para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside de

SrMV (Fig. 1.5A). A su vez, se comprobó que las muestras podían ser amplificadas con iniciadores degenerados diseñados para amplificar potyvirus que infectan poáceas (Fig. 1.5B), lo que permitiría mas adelante obtener productos de amplificación a partir de muestras negativas para los iniciadores específicos del SCMV y del SrMV (ver Capítulo II).

Normalmente los productos de amplificación son clonados para su posterior secuenciación, pero se ha reportado la secuenciación directa del producto de RT-PCR de virus de tomate (Navas-Castillo *et al.*, 2000), vainilla (Grisoni *et al.*, 2006) y caña de azúcar (Xu *et al.*, 2008), entre otros. Esta alternativa reduce el tiempo y los costos para la obtención de información de secuencia de la muestra, siempre y cuando no sea indispensable obtener la secuencia completa del producto amplificado. Al utilizar para la secuenciación los mismos iniciadores de la RT-PCR, no se obtiene información de secuencia adecuada de las 30-50 pb presentes en los extremos 5' y 3' del producto amplificado. En el presente trabajo resultaron ser innecesarias, ya que se contó con los 750-800 pb de secuencia restantes del gen de la proteína de cápside, suficientes a los fines de identificar y clasificar las muestras virales. Con el protocolo desarrollado, los productos de la RT-PCR pueden ser enviados al servicio de secuenciación directamente, en donde son purificados (sistema Exo-SAP-IT, Affymetrix) y secuenciados con los mismos iniciadores de la RT-PCR o una versión mas corta de los mismos. Todas las muestras de SrMV y el 84% de las muestras de SCMV amplificadas en el muestreo a gran escala (Capítulo II) resultaron en secuencias consenso de alta calidad que fueron depositadas en GenBank. Cabe notar que no se intentó la reamplificación de muestras con bandas de amplificación débiles, no se cuantificaron los productos de amplificación ni se intentó la resecuenciación de muestras con secuencias de baja calidad, lo cual podría haber mejorado el porcentaje de secuencias de SCMV de buena calidad.

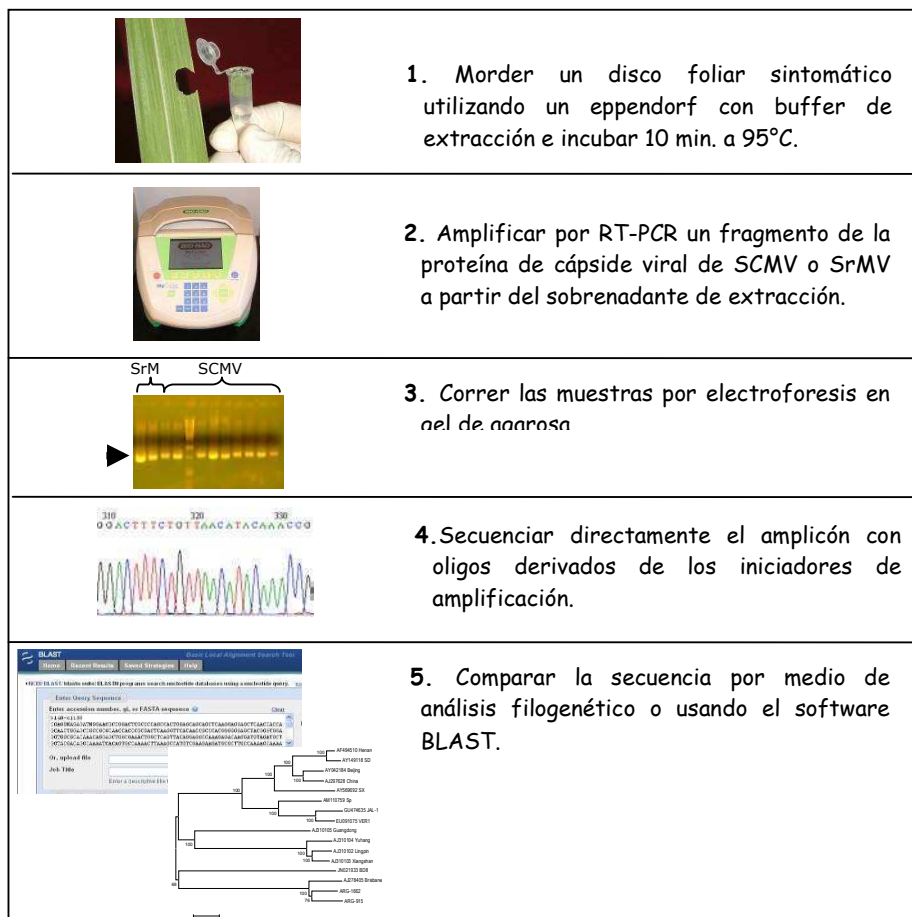


Fig. 1.8. Esquema del protocolo de análisis final para muestras de hoja de caña de azúcar infectadas con el SCMV o el SrMV.

El protocolo desarrollado (Fig. 1.8) resultó en una publicación original en una revista internacional con referato (Gómez *et al.*, 2009) e hizo viable un muestreo a gran escala de los agentes causales del mosaico de la caña de azúcar en Argentina y países limítrofes en el que se analizaron más de 500 muestras sintomáticas. Los resultados de dicho muestreo se detallan en el capítulo II

Capítulo II

Capítulo II

Objetivo general: Estudio de la diversidad genética de los virus causales del mosaico de la caña de azúcar en Argentina y regiones cañeras limítrofes.

Objetivos particulares:

1. Realización de un amplio muestreo de plantas de caña de azúcar con sintomatología de mosaico provenientes de Salta, Jujuy, Tucumán, Santa Fe y las áreas cañeras limítrofes de Bolivia, Uruguay y Paraguay.
2. Amplificación por RT-PCR y secuenciación de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV en más de 500 muestras con sintomatología de mosaico.
3. Análisis filogenético y clasificación de las muestras virales en grupos discretos según la similitud de secuencia nucleotídica del gen de la proteína de cápside.
4. Identificación de otras regiones conservadas en el genoma del SCMV y del SrMV mediante secuenciación de un fragmento del gen P3.
5. Secuenciación del genoma completo de dos muestras identificadas en los puntos anteriores como pertenecientes a dos grupos del SCMV.

II. Resultados

El desarrollo de un sistema de detección de virus de alta eficiencia permitió abordar el estudio de la variabilidad genética de los agentes causales del mosaico de la caña de azúcar en Argentina y en las zonas cañeras limítrofes. Dicho estudio tuvo como objetivo principal identificar las variantes de los virus del mosaico presentes en la región, en vista de identificar regiones conservadas del genoma viral que puedan ser usadas como blanco de resistencia mediada por silenciamiento génico en cañas de azúcar transgénicas que se desarrollaron a continuación (ver Capítulo III).

Utilizando el protocolo de diagnóstico viral por RT-PCR y posterior secuenciación descrito en el capítulo I, se llevó a cabo un amplio muestreo de plantas con sintomatología de mosaico. Se recolectaron muestras en las principales provincias productoras de caña de la Argentina y de zonas cañeras limítrofes con las que existe intercambio de germoplasma, a excepción de Brasil. En las muestras colectadas se determinó la presencia del SCMV y del SrMV mediante RT-PCR con iniciadores específicos de cada virus y se secuenciaron los productos de amplificación de las muestras positivas. Las muestras negativas para ambos pares de iniciadores fueron analizadas con iniciadores degenerados para potyvirus que infectan poáceas y también con iniciadores para el SCSMV, para descartar su presencia en la zona muestreada. También se determinó la secuencia de un fragmento evolutivamente conservado del gen P3 en una serie de muestras, así como también el genoma completo de dos muestras del SCMV. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante matrices de identidad y árboles filogenéticos, lo que permitió su clasificación en grupos de similitud y la identificación de regiones conservadas del genoma viral.

2.1. Muestreo a gran escala de caña de azúcar con síntomas de mosaico

Con el objetivo de realizar un relevamiento de los agentes causales del mosaico de la caña de azúcar y de capturar la máxima diversidad genética posible con los recursos disponibles para el estudio, se diseñó un amplio muestreo abarcando la principal zona cañera de Argentina y las zonas aledañas. Entre los meses de noviembre de 2007 y noviembre de 2008 se colectaron muestras de caña de azúcar con sintomatología de mosaico en la región productora de caña de azúcar de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Santa Fe y en las zonas cañeras limítrofes de Bolivia,

Paraguay y Uruguay (Ver Apéndice I). Se colectaron muestras en 103 sitios de muestreo distribuidos en un área que ocupa aproximadamente 800.000 km², registrándose en cada sitio la latitud y longitud con un equipo de GPS (Fig. 2.1).

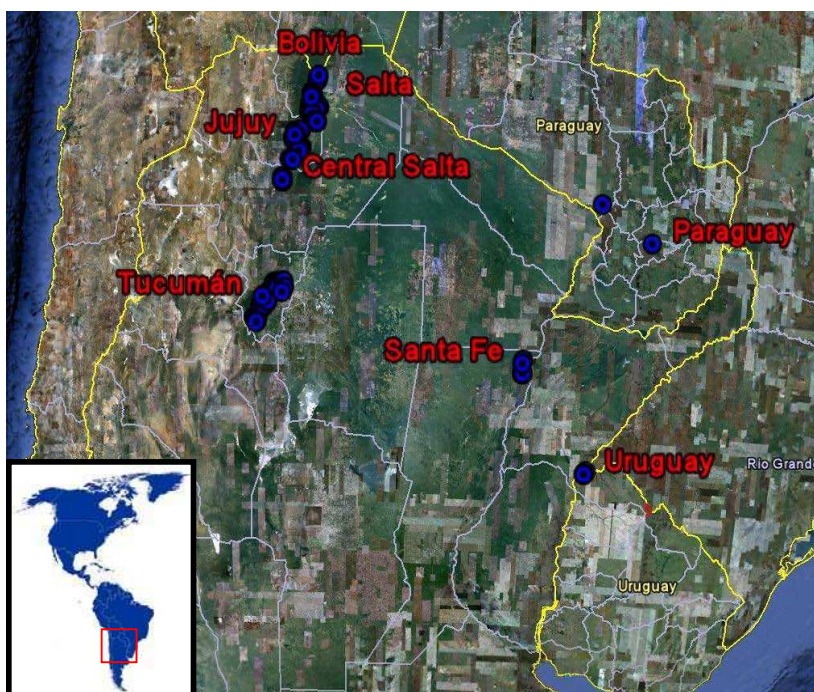


Figura 2.1. Mapa indicando la posición geográfica de los sitios de muestreo.

La mayor parte de las muestras (87%) fueron colectadas en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán, en las cuales se produce cerca del 99% de la caña de azúcar de Argentina (Pérez, 2011). Las muestras fueron tomadas en lotes experimentales (colecciones y variedades precomerciales) y en lotes comerciales plantados con variedades susceptibles o tolerantes al mosaico, sumando en total 104 genotipos distintos, distribuidos geográficamente de acuerdo a la Tabla 2.1. Del total de las muestras tomadas, el 53% provinieron de lotes comerciales y el 47% de lotes experimentales y colecciones. Esta distribución fue adoptada a fin de capturar la mayor diversidad genética del virus posible, ya que se ha reportado cambios en la prevalencia de razas del SrMV asociados a modificaciones en la adopción de distintos genotipos de caña de azúcar (Grisham y Pan, 2007). Se muestrearon las colecciones de variedades de caña de azúcar presentes en la Chacra Experimental Santa Rosa (Salta), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC, Tucumán), INTA Famaillá (Tucumán) y el Campo Experimental Natalicio Talavera (Paraguay). El factor tiempo, el cual no fue tomado en cuenta en el presente estudio, también es un factor que condiciona la diversidad en las poblaciones virales.

Las muestras colectadas en Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay fueron rotuladas con el prefijo ARG, BOL, PAR y URU, respectivamente.

Tabla 2.1. Distribución geográfica de muestras de hoja de caña de azúcar con síntomas de mosaico, discriminadas según la región y tipo de lote en que fueron colectadas.

Provincia/País	Tipo de lote	Muestras sintomáticas
Salta	comercial	107
	experimental	61
Jujuy	comercial	93
	experimental	83
Tucumán	comercial	45
	experimental	106
Santa Fe	comercial	12
	experimental	13
Bolivia	comercial	14
Paraguay	comercial	4
	experimental	8
Uruguay	comercial	3
	experimental	18
Total		567

Cada muestra consistió en una sección de aproximadamente 20 cm de la porción basal de la lámina de la hoja 0 o +1 (la primer hoja con la lígula completamente visible) tomada preferentemente de una planta de entre tres y seis meses de desarrollo. Se tomaron entre dos y tres muestras de hoja independientes de cada lote muestreado. Las muestras de hoja fueron conservadas a 4°C desde el momento de su recolección hasta la llegada al laboratorio, en donde fueron procesadas de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo I y el tejido restante fue conservado a -80°C.

2.2. Diagnóstico del SCMV y del SrMV por RT-PCR

Las muestras colectadas en el relevamiento a campo fueron analizadas por RT-PCR con iniciadores específicos para el SCMV y el SrMV, según el protocolo descrito en el capítulo I. En total se analizaron 567 muestras de hojas sintomáticas, obteniéndose inicialmente productos de amplificación a partir de 537 de las mismas (94,7%). Se extrajo ARN con el “RNeasy Plant Mini kit” a partir de 18 de las muestras negativas restantes, para aumentar la sensibilidad del protocolo y evitar falsos negativos. A partir de estos extractos se obtuvieron productos de amplificación con iniciadores específicos

para SCMV y SrMV a partir de 15 de las muestras. A fin de evitar falsos negativos que escapen a la amplificación mediante estos iniciadores, las muestras negativas para los iniciadores específicos de SCMV y SrMV fueron analizadas con los iniciadores degenerados oligo1n y oligo2n que permiten la amplificación de un producto de 330 pb de potyvirus de poáceas, obteniéndose productos de amplificación a partir de 10 de las muestras (Tabla 2.2). En conclusión, no se obtuvieron productos de amplificación a partir de 5 (0,9%) de las 567 muestras analizadas (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Resultados de amplificaciones por RT-PCR de un fragmento del gen de la proteína de cápside utilizando iniciadores específicos del SCMV y del SrMV e iniciadores degenerados para potyvirus que infectan poáceas. Los lotes experimentales son aquellos plantados con variedades precomerciales o con colecciones de variedades y progenitores. Los lotes comerciales son aquellos plantados con una única variedad destinados a la producción comercial de caña.

Región	Tipo de lote	SCMV+ SrMV-	SCMV- SrMV+	SCMV+ SrMV+	Potyvirus de poáceas +	No se amplificó producto	Total
Salta	Comercial	106	0	1	0	0	107
	Experimental	52	3	0	2	4	61
Jujuy	Comercial	89	0	0	4	0	93
	Experimental	78	1	0	4	0	83
Tucumán	Comercial	45	0	0	0	0	45
	Experimental	99	4	2	0	1	106
Santa Fe	Comercial	12	0	0	0	0	12
	Experimental	13	0	0	0	0	13
Bolivia	Comercial	14	0	0	0	0	14
	Experimental	4	0	0	0	0	4
Paraguay	Comercial	4	0	0	0	0	4
	Experimental	0	8	0	0	0	8
Uruguay	Comercial	3	0	0	0	0	3
	Experimental	18	0	0	0	0	18
Total		533	16	3	10	5	567

De la Tabla 2.2 se puede concluir que el SCMV es el agente causal del mosaico predominante en la región, presente en 536 muestras (94,5%), con 19 muestras positivas para SrMV (3,4%). Tan solo tres muestras (0,5%) presentaron coinfección de los dos virus.

2.3. RT-PCR con iniciadores para SCSMV

Se analizaron las muestras negativas para el SCMV y el SrMV con iniciadores específicos para el *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) con el objetivo de

descartar su presencia entre las muestras colectadas. Este virus, recientemente propuesto para ser parte del nuevo género *Susmovirus* de la familia *Potyviridae* (Xu *et al.*, 2010), produce una sintomatología muy similar al SCMV y al SrMV, pero hasta el momento del muestreo no había sido reportado en el continente americano. La RT-PCR resultó negativa para las 18 muestras analizadas, mientras que los controles positivos generaron una banda de amplificación del tamaño esperado (datos no mostrados).

2.4. Secuenciación de los productos de la RT-PCR del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV

Todos los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores específicos para el SCMV y el SrMV fueron secuenciados utilizando el servicio de MacroGen (Corea) según el protocolo descrito en el Capítulo I. Todas las muestras de SrMV amplificadas (19 en total) en el muestreo resultaron en secuencias consenso de alta calidad. De las 536 muestras positivas para SCMV, 451 muestras dieron lugar a secuencias consenso de alta calidad, lo que representa el 84% del total. Algunas de las causas por las que no se obtuvieron secuencias de calidad adecuada fueron la baja concentración del producto de amplificación, la presencia de cromatogramas superpuestos debido a la coamplificación de bandas inespecíficas o a que las lecturas sentido y antisentido no se superponían. Todas las secuencias fueron curadas manualmente y depositadas en GenBank, cuyos números de entrada se detallan en el Apéndice I. No se intentó la reamplificación o resecuenciación de muestras con secuencias de baja calidad, ya que se consideró suficiente, a los fines de este estudio, la cantidad de muestras con secuencias de calidad adecuada.

Las muestras positivas utilizando los iniciadores degenerados oligo1n y oligo2n fueron reamplificadas con los iniciadores Oli40 y Oli41 y el producto de amplificación secuenciado. Dichos iniciadores contienen un segmento 3' degenerado idéntico a oligo1n y oligo2n respectivamente, y un segmento 5' específico para la secuencia de los iniciadores universales M13F y Promotor T3, respectivamente. De esta manera, los iniciadores Oli40 y Oli41 dan lugar a productos de amplificación de potyvirus que infectan poáceas que pueden ser secuenciados directamente con los iniciadores universales mencionados. Las secuencias obtenidas con los iniciadores universales dieron lugar a cromatogramas con picos débiles pero legibles, permitiendo la clasificación de dichas muestras usando la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

2.5. Construcción de matrices de identidad como primera herramienta de análisis de las secuencias obtenidas

Una primera pregunta a responder de la población viral en estudio fue respecto al número de secuencias que representan genotipos repetidos en el conjunto de datos, respuesta que no se puede obtener con una simple inspección visual de los alineamientos debido al gran número de secuencias a analizar. Para responder esta pregunta se alinearon las secuencias del gen de la proteína de cápside usando el algoritmo Clustal W a través del programa Bioedit (Hall, 1999). Se recortaron los extremos de las secuencias nucleotídicas para que todas las muestras tuvieran una región en común, que resultó ser de 717 pb para el SCMV y de 732 pb para el SrMV. Se descartaron aquellas muestras que no tenían información de secuencia para toda la región seleccionada. Utilizando el programa Bioedit se calculó una matriz de identidad, que comparaba todas las secuencias nucleotídicas entre sí, asignándole un valor de uno (1) a secuencias idénticas y un valor de cero (0) a secuencias completamente distintas. La matriz de identidad fue importada a Excel y las casillas coloreadas automáticamente según el valor numérico utilizando la función de “formato condicional”, a fin de obtener un resultado visual de los datos. Se repitió el mismo análisis para las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas correspondientes.

Este análisis determinó que de las 451 secuencias nucleotídicas del SCMV analizadas, 403 corresponden a genotipos únicos (89,4%), reflejando una importante variabilidad genética evidenciable exclusivamente a través del análisis de secuencias nucleotídicas. Doce (12) de las secuencias de SCMV presentan deleciones de entre 6 y 51 pares de bases ubicadas hacia el extremo 5' del gen de la proteína de cápside, las cuales no alteran en ningún caso el marco de lectura. Los valores de identidad entre las secuencias nucleotídicas varían entre 0,77 y 1,00. Utilizando la matriz de identidad coloreada se destaca un grupo de 9 muestras cuyas secuencias nucleotídicas distan significativamente del resto de las secuencias ($ID < 0,92$) pero son muy parecidas entre sí ($ID > 0,97$). Notablemente, las secuencias aminoacídicas de los individuos de este grupo presentan entre 0,93 y 0,99 de identidad con el resto de las secuencias. A este grupo de secuencias se las clasificó más tarde utilizando información filogenética en el grupo “W” y corresponde a muestras tomadas en un área relativamente pequeña de Jujuy y Salta (a menos de 60 Km. entre sí). El resto de las muestras, que mostraban

valores de identidad mayores a 0,95 con la gran mayoría de las secuencias fueron subsiguientemente clasificadas, tras incluir el análisis filogenético, dentro del grupo “SCE” de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores (Xu et al., 2008). Este grupo mayoritario muestra una distribución geográfica ubicua. La porción central del gen de la proteína de cápside fue la zona más conservada del gen, y la porción 5’ fue la más variable (Viswanathan *et al.*, 2009).

Respecto de las 19 secuencias del SrMV obtenidas, 9 fueron genotipos únicos (47%). Los valores de identidad de secuencia nucleotídica variaron entre 0,97 y 1,00, reflejando una menor diversidad genética para esta especie viral, considerando que las muestras provenían de Tucumán, Salta, Jujuy y Paraguay. Ninguno de las muestras virales analizadas presentaron deleciones.

Las secuencias obtenidas con los iniciadores para potyvirus que infectan poáceas fueron comparadas contra las secuencias depositadas en GenBank utilizando el programa BLAST. Éstas tuvieron un largo promedio de 323 pb y corresponden al extremo 3’ del gen de la proteína de cápside. Dos de las secuencias nucleotídicas, ARG-306 y ARG-308, comparten un identidad de secuencia >0,98 con SCMV colectado en maíz en la Argentina (DQ973170, Lenardón S. L., presentación directa) y en otros países. Estas dos muestras tienen una identidad promedio de 0,85 con el grupo SCE y fueron ambas colectadas de la colección de variedades presente en la Chacra Experimental Santa Rosa (Salta). De las secuencias nucleotídicas restantes, cuatro mostraron una alta identidad con SrMV y tres con SCMV grupo SCE, por lo que se las asignó a dichos grupos. Posiblemente, estas muestras no dieron lugar a productos de amplificación en la RT-PCR con los iniciadores específicos del SCMV y del SrMV debido a mutaciones en el sitio de unión de los mismos.

2.6. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV

Se clasificaron los muestras virales en grupos discretos de similitud de secuencia mediante un análisis filogenético a partir de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen de la proteína de cápside del SCMV y del SrMV. Para ello se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas junto con secuencias de referencia de los grupos virales descriptos previamente y se calculó un árbol filogenético por la

metodología de “Neighbor Joining” y se calcularon los valores de “Bootstrap” para 1000 remuestreos.

2.6.1. Construcción de un árbol filogenético a partir del gen de la proteína de cápside del SrMV

Todas las muestras de SrMV colectadas en el presente estudio se agrupan en una rama junto con muestras del grupo HS (“Hybrid Sugarcane”) de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores (2008) (Fig. 2.2). Este grupo engloba aislamientos presentes en caña de azúcar comercial obtenidas por mejoramiento genético clásico, a diferencia del grupo NS (“Noble Sugarcane”), que engloba a aislamientos colectados en “cañas nobles”, es decir clones de *Saccharum officinarum* L.

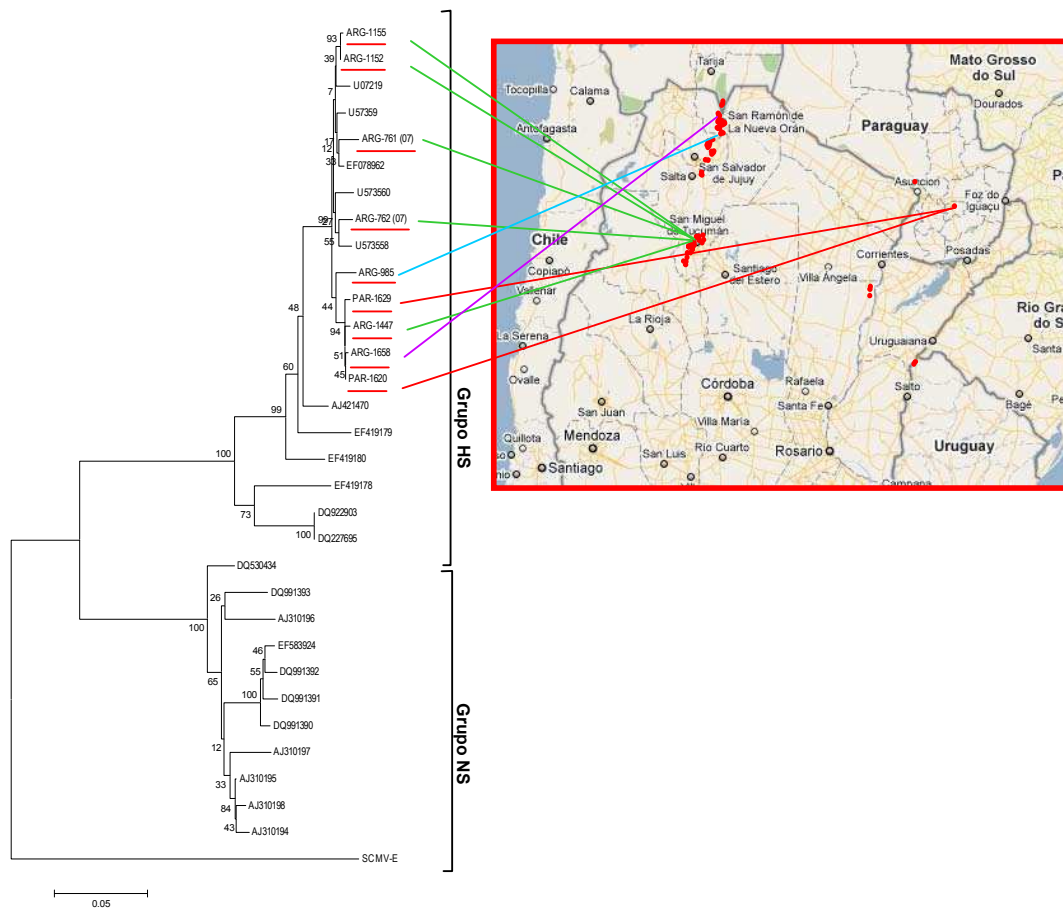


Fig. 2.2. Árbol filogenético obtenido a partir de un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína de cápside de las muestras del SrMV colectadas en este estudio (subrayadas en rojo) y su distribución geográfica. Se obviaron las muestras con genotipos repetido y se incluyen secuencias de SrMV de referencia de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores (2008). El árbol se calculó por el método de Neighbor Joining y se incluyen los valores de Bootstrap con 1000 remuestreos. Las muestras colectadas en Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay fueron rotuladas con el prefijo ARG, BOL, PAR y URU, respectivamente.

Las muestras están preferentemente relacionadas (valor de “Bootstrap” de 99%) con muestras colectadas en EE.UU. (U57358-60, EF078962 y U07219) y con muestras colectadas en Tucumán descriptas por Perera y colaboradores en 2009 (muestras ARG-761(07) y ARG-762(07)). No se observa una relación obvia entre el genotipo de SrMV y la localización geográfica en que fue colectada la muestra, con valores bajos de “Bootstrap” dentro de la rama que contiene las muestras de este estudio y las provenientes de los EE.UU.

2.6.2. Construcción de un árbol filogenético a partir del gen de la proteína de cápside del SCMV

La mayoría de las muestras de SCMV (97,8%) analizadas en este estudio se clasifican dentro del grupo SCE, de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores en 2008 (Fig. 2.3). Nueve muestras colectadas en Salta y Jujuy (Ingenios Tabacal y Ledesma respectivamente) forman un grupo filogenético distinto en base a la secuencia del gen de la proteína de cápside, con un valor de “Bootstrap” de 99%. Sumado al análisis de matrices de identidad, se propone la creación de un nuevo grupo en la clasificación de SCMV denominado “W” que contenga estas muestras. Este grupo se caracteriza por la acumulación de mutaciones silenciosas en la región central del gen de la proteína de cápside, que está altamente conservada en SCMV. La muestra ARG-306, colectada de una variedad precomercial en ensayos de la Chacra Experimental Santa Rosa, se clasifica dentro del grupo MZ de SCMV de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores (2008).

Se construyó a continuación un árbol filogenético sin raíz por el método de “Neighbor Joining” a partir de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de todas las muestras secuenciadas del SCMV, junto con secuencias de referencia (Fig. 2.4). En el árbol calculado a partir de la secuencia nucleotídica, la mayoría de las muestras forman una rama compacta que corresponde al grupo SCE (ramas coloreadas en negro), que incluye a cuatro muestras de referencia de este grupo: SCMV razas A, B, D y E (Fig. 2.4.A). Las muestras clasificadas como grupo W forman una rama claramente separada coloreada de rojo. La muestra ARG-306, rotulada con un cuadrado negro, se agrupa con otros aislamientos del grupo MZ publicados. Por otro lado, al analizar el árbol construido a partir de la secuencia aminoacídica (Fig. 2.4.B), se observa que las muestras del grupo W (rotuladas con cuadrados rojos) se agrupan con las muestras del grupo SCE (ramas coloreadas en negro). Esto evidencia la conservación de la

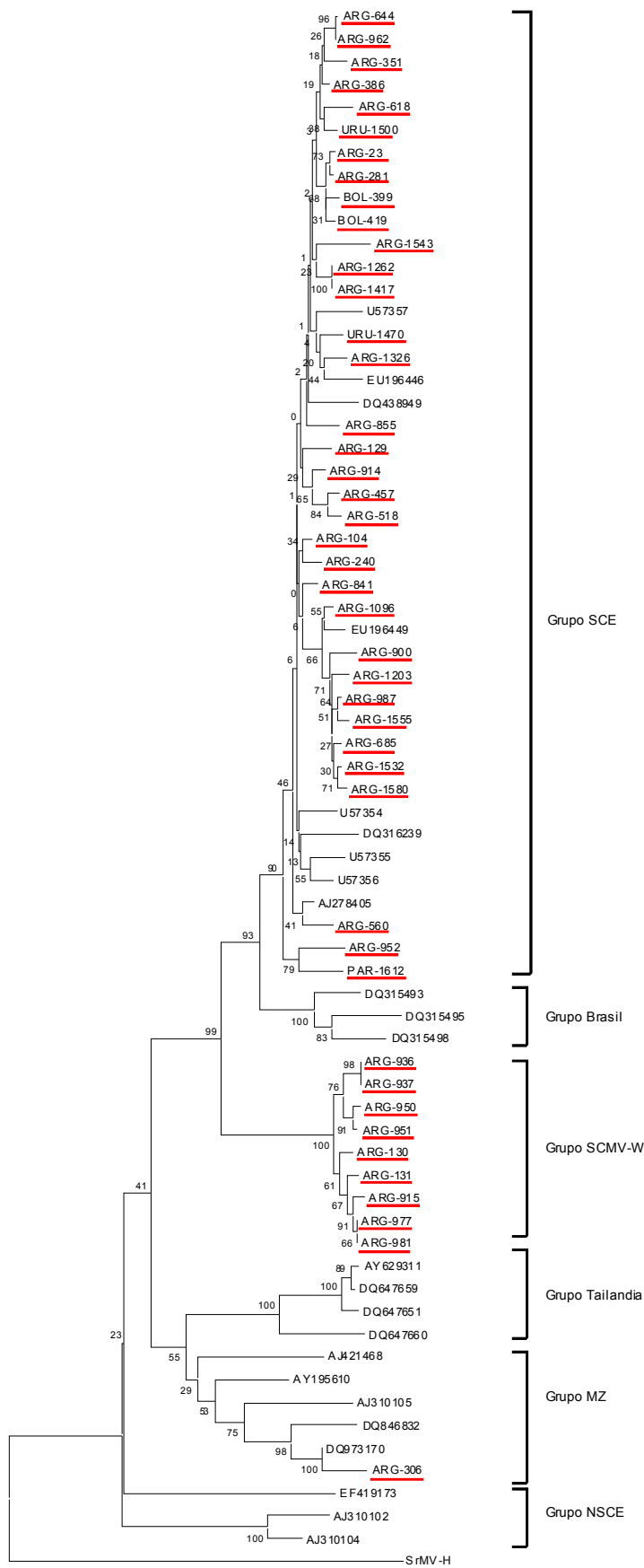


Fig. 2.3. Árbol filogenético obtenido a partir de un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína de cápside de un set representativo de muestras del SCMV colectadas en este estudio (subrayadas en rojo). Se incluyen secuencias del SCMV de referencia de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores (2008). El árbol se calculó por el método de Neighbor Joining y se incluyen los valores de Bootstrap con 1000 remuestros. Las muestras colectadas en Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay fueron rotuladas con el prefijo ARG, BOL, PAR y URU, respectivamente.

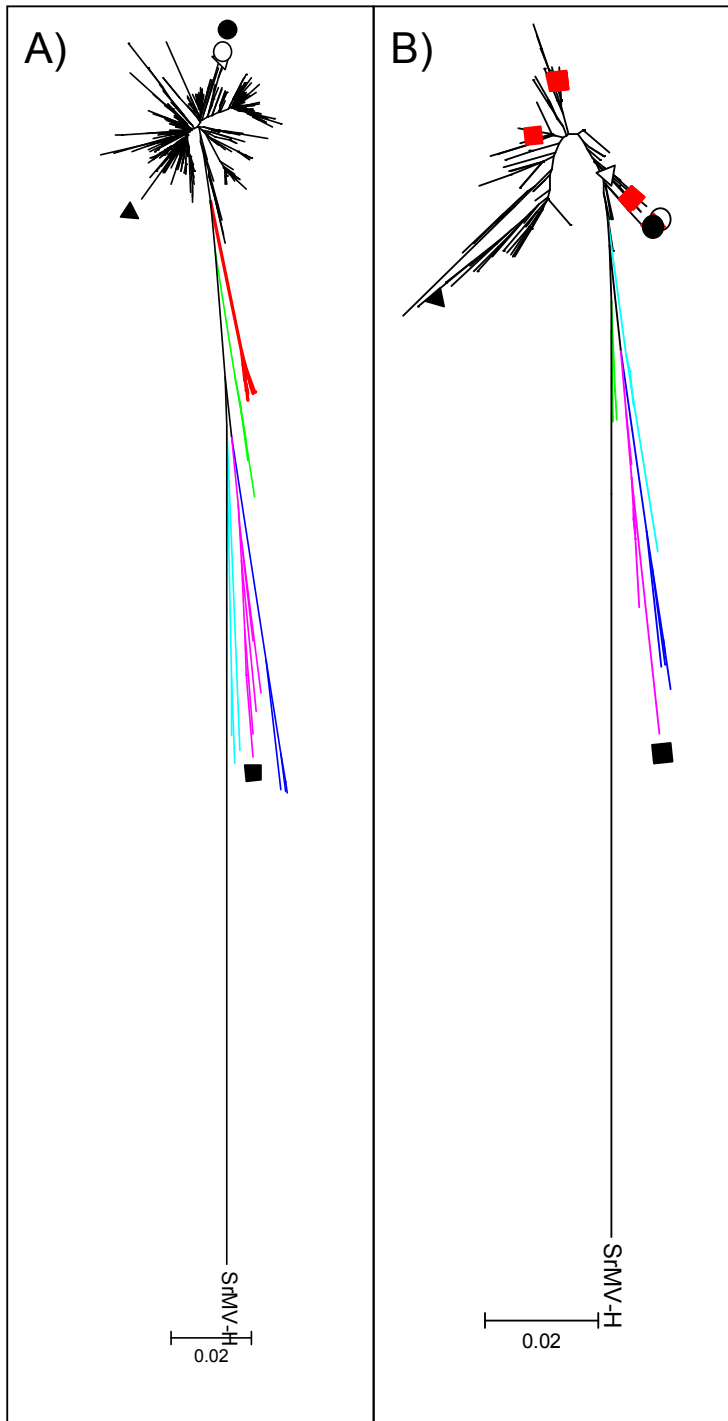


Fig. 2.4. Árbol filogenético sin raíz obtenido a partir de un fragmento de la secuencia nucleotídica (A) y aminoacídica (B) del gen de la proteína de cápside de todas las secuencias del SCMV colectadas en éste estudio. Se incluyen secuencias de SCMV de referencia de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores (2008), con el siguiente código de coloreado de las ramas: grupo SCE (negro), grupo Brasil (verde claro), grupo Tailandia (azúl), grupo MZ (rosado), grupo NSCE (turquesa), grupo W (líneas y cuadrados rojos); ○ U57354 (SCMV raza A); ● U57355 (SCMV raza B); △ U57356 (SCMV raza D); ▲ U57357 (SCMV raza E); ■ ARG 306 (SCMV-MZ). El árbol se calculó por el método de Neighbor Joining.

secuencia aminoacídica entre los dos grupos y la acumulación de mutaciones silenciosas en la secuencia nucleotídica del gen de la proteína de cápside en las muestras del grupo W en relación a las muestras del grupo SCE. La muestra ARG-306 sigue agrupándose con los aislamientos del grupo MZ de acuerdo a su secuencia aminoacídica. Se observa, además, un menor número de ramas en el grupo SCE, debido a que muchas muestras comparten una identidad de 1,00 en la secuencia aminoacídica pero valores inferiores de identidad para la secuencia nucleotídica

De esta manera, las muestras secuenciadas en el presente estudio pueden ser clasificadas de acuerdo a la similitud en la secuencia del gen de la proteína de cápside en cuatro grupos, tomando como valor de corte una identidad de secuencia de 0,92. Dichos grupos son: SrMV grupo HS y dentro del SCMV, grupos SCE, MZ y W.

2.7. Estructura poblacional de los virus del mosaico en las regiones muestreadas

Para visualizar la estructura poblacional de los virus identificados en el estudio y poder identificar posibles variaciones silenciosas en la secuencia de algunos de los subgrupos, se graficó la frecuencia de ocurrencia de pares de valores de identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídicas, resultado de comparar entre sí todas las secuencias (207.936 comparaciones de a pares) del gen de la proteína de cápside de SCMV y de SrMV obtenidas en este estudio (Fig. 2.5). Se excluyeron del análisis las muestras de SCMV que presentaban deleciones, ya que éstas generan picos artificialmente distantes entre sí. Se observa un pico principal correspondiente al grupo SCE de SCMV formado por el 93,8% de las muestras. Las muestras de SrMV forman el segundo pico en tamaño cerca de un valor de 0,7 de identidad aminoacídica y nucleotídica, y corresponde a 19 muestras que representan el 3,3 % del total. Se observa un pequeño pico entre los dos picos principales mencionados, que corresponde a la muestra ARG-306, clasificada dentro del grupo MZ de SCMV, la cual presenta una divergencia considerable respecto del resto de las muestras de SCMV. Por último se observa un pico correspondiente a las muestras clasificadas dentro del grupo W de SCMV, que está desplazado hacia el frente y a la derecha respecto del pico principal del grupo SCE. Esto significa que dichas muestras acumulan un importante número de mutaciones silenciosas en el gen de la proteína de cápside, que determinan valores

bajos de identidad de secuencia nucleotídica y valores altos de identidad de secuencia aminoacídica respecto del grupo SCE (Fig. 2.5).

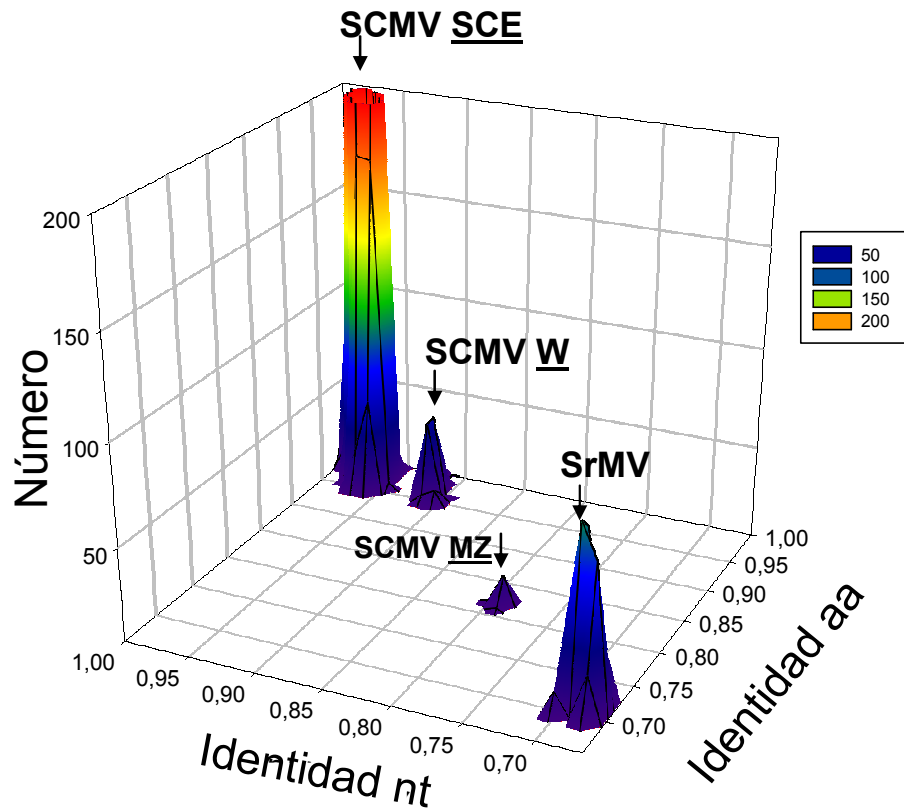


Fig. 2.5. Relación entre la identidad de secuencia aminoacídica (aa) y nucleotídica (nt) para el gen de la proteína de cápside en un set de 207.936 comparaciones de a pares de todas las secuencias de SCMV y SrMV obtenidas. Matrices de identidad calculadas con el software Bioedit, transformadas en frecuencia de pares de valores de ID aminoacídica y nucleotídica y graficados con el software Sigmaplot.

2.8. Secuenciación de un fragmento del gen P3 del SCMV y del SrMV

Con el objetivo de identificar en los genomas de SCMV y de SrMV regiones evolutivamente conservadas que puedan servir de blanco del silenciamiento genético en caña de azúcar transgénica, se decidió secuenciar otra región de un subconjunto de muestras. En un alineamiento de todos los genomas completos del SCMV disponibles en GenBank, se identificó un fragmento del gen P3 como una zona del genoma conservada (Fig. 2.6). Éste gen, cuya función no ha sido totalmente dilucidada, estaría implicado en la determinación de sintomatología (Desbiez *et al.*, 2003) y a pesar de su variabilidad interespecífica, se ha reportado una alta conservación entre cepas de una misma especie viral (Aleman-Verdaguer *et al.*, 1997). Se amplificó por RT-PCR un

fragmento de 1Kb con los iniciadores Oli96 y Oli97, abarcando el extremo 3' del gen HC-Pro y alrededor de 900 pb del gen P3. Los productos amplificados mediante RT-

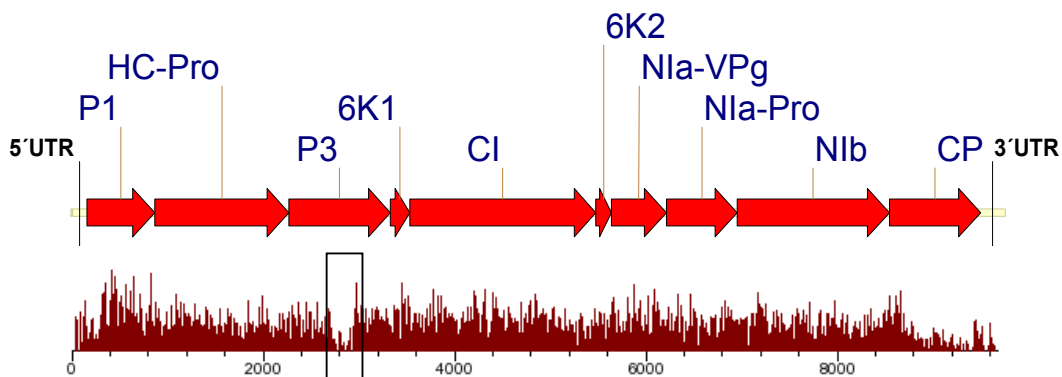


Fig. 2.6. Gráfico de entropía a partir de la secuencia nucleotídica de los doce genomas completos de SCMV disponibles en Genbank al 12/05/2011, junto con un esquema del genoma de SCMV. En el gen P3 se marca con un rectángulo la región conservada que fue secuenciada.

PCR fueron secuenciados con los iniciadores universales M13F y Promotor T3. En total, se secuenciaron muestras provenientes de los 4 grupos de similitud identificados previamente: SCMV grupos SCE (8 muestras), grupo W (5 muestras) y grupo MZ (1 muestra) y SrMV (1 muestra).

Tabla 2.3. Matriz de identidad generada a partir de un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen P3 del SCMV de un grupo seleccionado de muestras. Se colorearon las celdas de acuerdo al valor de identidad: naranja (1,00), verde oscuro (>0,95 y < 1,00), verde claro (>0,92 y < 0,95) y blanco (< 0,92).

Clasificación	Muestra	Brisbane	ARG-130	ARG-131	ARG-308	ARG-345	ARG-350	ARG-627	ARG-914	ARG-915	ARG-936	ARG-950	ARG-1318	ARG-1578
SCMV-SCE	Brisbane	ID	0,99	0,98	0,91	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	1,00
SCMV-W	ARG-130	0,99	ID	0,97	0,91	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,97	0,98	0,99
SCMV-W	ARG-131	0,98	0,97	ID	0,91	0,97	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,98
SCMV-MZ	ARG-308	0,91	0,91	0,91	ID	0,91	0,91	0,91	0,91	0,92	0,91	0,91	0,91	0,91
SCMV-SCE	ARG-345	0,99	0,99	0,97	0,91	ID	1,00	0,99	0,99	0,99	0,97	0,97	0,98	0,99
SCMV-SCE	ARG-350	0,99	0,99	0,97	0,91	1,00	ID	0,99	0,99	0,99	0,97	0,97	0,98	0,99
SCMV-SCE	ARG-627	1,00	0,99	0,98	0,91	0,99	0,99	ID	0,99	0,99	0,98	0,97	0,99	1,00
SCMV-SCE	ARG-914	1,00	0,99	0,98	0,91	0,99	0,99	0,99	ID	0,99	0,98	0,97	0,99	1,00
SCMV-W	ARG-915	0,99	0,98	0,97	0,92	0,99	0,99	0,99	0,99	ID	0,98	0,98	0,98	0,99
SCMV-W	ARG-936	0,98	0,97	0,98	0,91	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	ID	1,00	0,97	0,98
SCMV-W	ARG-950	0,98	0,97	0,97	0,91	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	1,00	ID	0,97	0,98
SCMV-SCE	ARG-1318	0,99	0,98	0,97	0,91	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,97	0,97	ID	0,99
SCMV-SCE	ARG-1578	1,00	0,99	0,98	0,91	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	ID

Se obtuvieron secuencias de calidad media o baja, pero que permitieron disponer de al menos una lectura para la región más conservada del gen P3 de cada uno de los

grupos virales identificados previamente. Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas con el programa Bioedit y recortadas hasta obtener un fragmento de 232 pb común a todas las secuencias, tras lo cual se calculó una matriz de identidad. Como se observa en la Tabla 2.3, la identidad promedio a nivel nucleotídico entre los grupos W y SCE es elevada (0,98) considerando como referencia lo observado para el gen de la proteína de cápside (identidad < 0,92).

La muestra ARG-308 del grupo MZ también mostró valores de identidad mayores con los grupos W y SCE, con un promedio de 0,91 de identidad con los mismos. Por otro lado, la muestra PAR-1620 del grupo SrMV mostró valores de identidad con el resto de los grupos similares a lo observado para el gen de la proteína de cápside. En un árbol filogenético obtenido a partir de la misma región analizada del gen P3, se observa que las secuencias de los grupos W y SCE del SCMV se agrupan en una misma rama (con un valor de “Bootstrap” de 100), mientras que las secuencias de los grupos MZ del SCMV y el SrMV se agrupan por separado junto con otras secuencias de referencia de GenBank (Fig. 2.7). Ciertas ramas del árbol muestran valores de “Bootstrap” bajos, tal vez debido al tamaño relativamente pequeño del fragmento génico utilizado para construir el árbol, sin embargo esto no afecta a las observaciones hechas mas arriba.

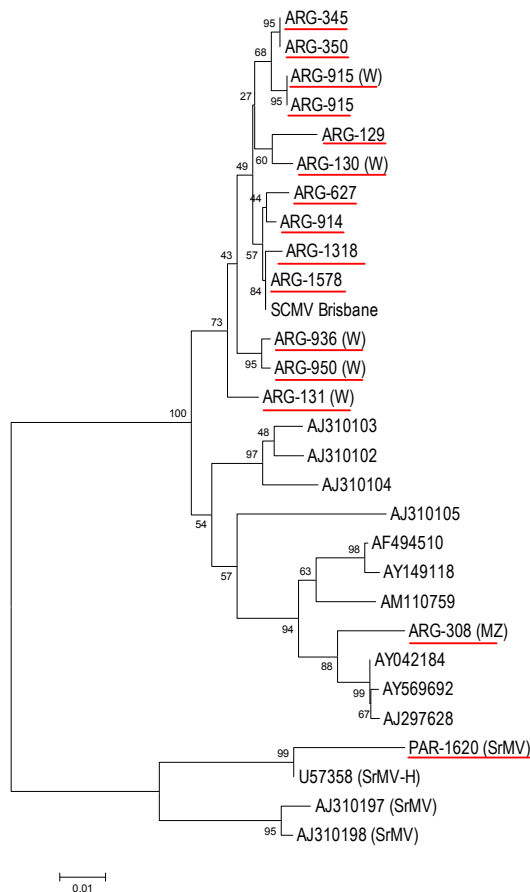


Fig. 2.7. Árbol filogenético obtenido a partir de un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen P3 de un set representativo de muestras colectadas en éste estudio (subrayadas en rojo). El árbol se calculó por el método de Neighbor Joining y se incluyen los valores de Bootstrap con 1000 remuestreos. Se incluyen secuencias del SCMV y del SrMV de referencia y se aclaró entre paréntesis cuando las muestras pertenecían a los grupos W, MZ y SrMV.

2.9. Secuenciación del genoma completo de dos muestras del SCMV

Para caracterizar en mayor profundidad las muestras de SCMV colectadas, se secuenció el genoma completo de dos muestras de dicho virus. Al momento de realizar estos experimentos solo había depositado en GenBank un genoma completo del SCMV aislado de caña de azúcar comercial (AJ278405, aislamiento Brisbane), siendo los 13 genomas restantes aislamientos colectados en maíz o cañas nobles (*Saccharum officinarum* L). Se seleccionó una muestra de SCMV perteneciente al grupo SCE (muestra ARG-1662 colectada en la Chacra Experimental) y otro perteneciente al grupo W (muestra ARG-915 colectada en Jujuy). Se amplificó por RT-PCR el genoma completo de las muestras a través de 9 productos parcialmente superpuestos, utilizando cebadores diseñados en base a los genomas completos de SCMV disponibles en GenBank (Tabla M.1). Los productos de amplificación fueron secuenciados con los mismos iniciadores de la RT-PCR y con iniciadores que hibridan dentro de los mismos. Las secuencias genómicas fueron ensambladas con el programa Seqman del paquete Lasergene.

El genoma viral está conformado por 9571 nucleótidos para la muestra de SCMV del grupo SCE y por 9576 nucleótidos para la muestra del grupo W, excluyendo la cola de Poli-A. El primer AUG en el extremo 5' de la secuencia de ambas muestras se encuentra en el marco de lectura adecuado e inmerso en la secuencia CAAAA₁₄₈UGGC para la muestra del grupo SCE y en la secuencia CGAGAA₁₄₈UGGC para la muestra del grupo W. Estas secuencias serían razonablemente cercanas a la secuencia AACAAAUGGC de inicio de traducción reportada para plantas (Lutcke *et al.*, 1987). El primer codón stop U₉₃₃₇AG en el marco de lectura definido por el codón de inicio referido define una poliproteína putativa de 3063 aa, con un peso molecular deducido de 346,9 kDa para ambas muestras (Zhong *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2002). De esta manera queda definido una región 5' no traducida ("5' UTR") de 147 nt para ambas muestras y una región 3' no traducida ("3' UTR") de 235 nt para la muestra del grupo SCE y de 240 nt para la muestra del grupo W.

Se comparó la secuencia aminoacídicas deducida con la de otros potyvirus y se identificó los sitios de clivaje de las proteasas P1, HC-Pro y NIa-Pro (Tabla 2.4). La poliproteína generada por la traducción del genoma viral sería clivada autocatalíticamente en 10 proteínas maduras de acuerdo a lo descrito por Adams y colaboradores (2005).

Tabla 2.4. Secuencias aminoacídicas deducidas y posición de corte proteolítico que daría origen a 10 proteínas maduras putativas en dos muestras del SCMV: ARG-1662 (grupo SCE) y ARG-915 (grupo W).

Proteínas virales	Secuencia aminoacídica	Posición de corte (aa)
P1 / HC-Pro	IEHY/A	233
HC-Pro / P3	YLVG/G	693
P3 / 6K1	VIHE/G	1040
6K1 / CI	VVQQ/S	1107
CI / 6K2	VIHQ/G	1745
6K2 / VPg	VSHQ/G	1798
VPg / NIa-Pro	VAHE/S	1987
NIa-Pro / NIB	VEEQ/C	2229
NIB / CP	VFHQ/A	2750

Se identificaron dominios consenso de potyvirus presentes en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de ambas muestras. En la Tabla 2.5 se detallan dichos dominios y su función putativa.

Tabla 2.5. Dominios consenso y función putativa presentes en dos muestras de SCMV: ARG-1662 (grupo SCE) y ARG-915 (grupo W).

Dominio consenso	Función putativa	Cita
U ₁₃ CAACACAACAC ₂₄	“Potybox a”, secuencia conservada en el 5'UTR de <i>Potyvirus</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
G ₁₉₄ XSG ₁₉₇	Sitio activo de la serin-proteasa en gen P1.	(Zhong <i>et al.</i> , 2005)
F ₂₀₇ IVRGR ₂₁₂	Dominio proteolítico en el gen P1.	(Zhong <i>et al.</i> , 2005)
K ₂₈₇ ITC y P ₅₄₅ TK	Motivo en el gen HC-Pro de unión al estilete de áfidos vectores.	(Blanc <i>et al.</i> , 1998)
D ₂₇₅₅ AG	Motivo en el gen CP de unión al estilete de áfidos vectores.	(Blanc <i>et al.</i> , 1997) (Peng <i>et al.</i> , 1998)
C ₅₂₇ CCVT	Movimiento sistémico, gen HC-Pro.	(Cronin <i>et al.</i> , 1995) (Kasschau <i>et al.</i> , 1997)
G ₁₁₉₅ XXGXGKST ₁₂₀₃	Sitio de unión a NTP y motivo de helicasa en el gen CI.	(Lain <i>et al.</i> , 1990)
G ₂₁₃₆ XCG ₂₁₃₉	Sitio activo de la proteasa NIa-Pro.	(Zhong <i>et al.</i> , 2005)
N ₂₅₈₀ GDD ₂₅₈₃	Sitio en el gen NIB encontrado en ARN polimerasas ARN dependientes virales.	(Argos, 1988)

Se compararon las secuencias genómicas de las dos muestras secuenciadas contra las secuencias genómicas de todos los aislamientos de SCMV disponibles en GenBank. Se utilizó la herramienta “Virus Genotyper” (Rozanov *et al.*, 2004) del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) que compara las secuencias

con una “ventana deslizante” de 100 nucleótidos y le asigna un puntaje de similitud utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Se utilizó como genoma de referencia la muestra ARG-915 perteneciente al grupo W del SCMV (Fig. 2.8). Se observa que los dos genomas más parecidos al genoma de referencia son ARG-1662 y AJ278405 (SCMV aislamiento Brisbane), ambos aislados de caña de azúcar comercial y clasificados dentro del grupo SCE. Sin embargo se observan que en el extremo 3’ del genoma se acumulan un importante número de polimorfismos, particularmente en el extremo 3’ del gen Nib y en la región central de la proteína de cápside. El resto de los aislamientos analizados muestran puntajes menores, excepto para una región conservada en el gen P3 (cuya secuenciación se describe en el punto 2.7) y la región 3’ no traducida que parece estar conservada. Estos últimos aislamientos fueron colectados en maíz o en cañas nobles.

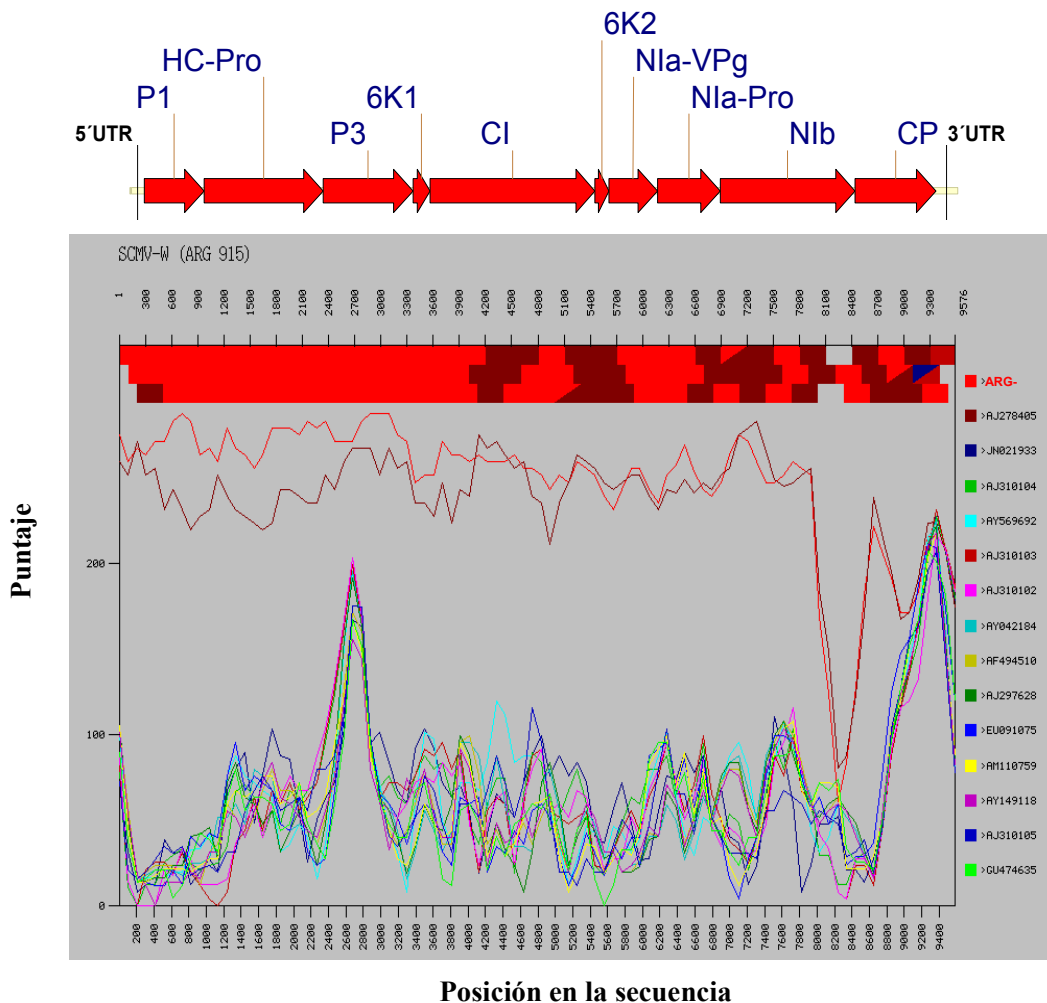


Fig. 2.8. Comparación del genoma completo de la muestra ARG-915 (SCMV grupo W) con todos los genomas completos de SCMV disponibles en GenBank utilizando la herramienta “Virus Genotyper” del NCBI. Tamaño de la ventana deslizante: 100 pb.

Se construyó un árbol filogenético utilizando el método de “Neighbor Joining” a partir de los genomas completos de SCMV descritos en este estudio y de todos los presentes en GenBank (Fig. 2.9). Se observa que las muestras ARG-915 y ARG-1662 se agrupan claramente junto con el único otro aislamiento de SCMV de caña de azúcar (AJ278405) colectado en Brisbane, Australia. El resto de los aislamientos fueron colectados en maíz o en cañas nobles en China, Méjico y España.

Las secuencias genómicas de las muestras ARG-915 y ARG-1662 fueron depositadas en GenBank con los número de acceso JX237863.1 y JX237862 respectivamente.

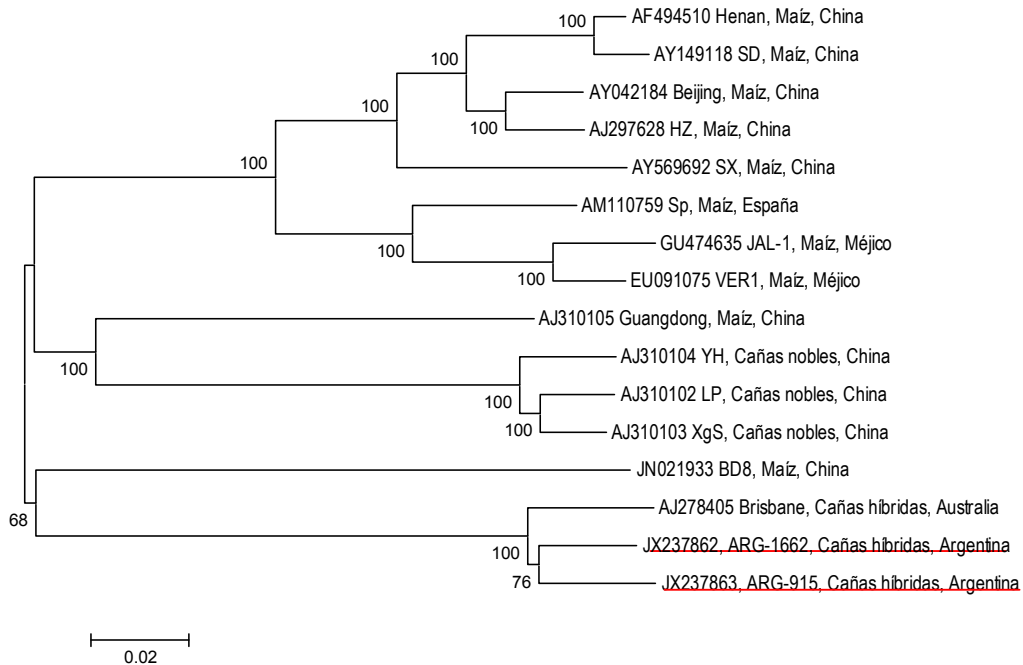


Fig. 2.9. Árbol filogenético de Neighbor Joining obtenido a partir del genoma completo de SCMV de los dos aislamientos secuenciados en este estudio y de todos los genomas completos de SCMV disponibles en Genbank. Se detalla en número de entrada de GenBank, nombre del aislamiento, hospedante y país de origen.

II. Discusión y Conclusiones

Se realizó un amplio muestreo de caña de azúcar con sintomatología de mosaico en la Argentina y regiones cañeras de países limítrofes. El número de muestras analizadas no tiene precedentes a nivel local para un estudio de virus vegetales y el objetivo del muestreo fue capturar la máxima diversidad genética de los agentes causales del mosaico en caña de azúcar, en vistas al desarrollo de un transgén quimérico de resistencia al virus del mosaico. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR para la presencia del SCMV y del SrMV con iniciadores descritos en la literatura (Yang y Mirkov, 1997, Alegria et al., 2003, Marie-Jeanne et al., 2000). No se obtuvieron productos de amplificación a partir de un porcentaje bajo (0,9%) de muestras, lo que confirma la utilidad del protocolo de análisis desarrollado (Gómez *et al.*, 2009) y una correcta elección de iniciadores para la población viral en estudio. La presencia de muestras negativas podría deberse a un error en la identificación de síntomas en el muestreo, mal estado de las muestras de hoja, mutaciones en los sitios de hibridación de los iniciadores o la presencia de otro agente causal del mosaico que no fue detectado con los iniciadores utilizados.

El SCMV es el principal agente causal del mosaico en la región, presente en el 94,5% de las muestras (Tabla 2.2). El SrMV fue detectado solamente en 3,4% de las muestras, con niveles bajos de coinfección (0,5%) de ambos virus. En un estudio publicado durante el desarrollo de esta Tesis, Perera y colaboradores (2009) reportaron niveles altos de coinfección de SCMV y de SrMV (59,8%) en muestras colectadas en la provincia de Tucumán, pero para las provincias de Salta y Jujuy reportaron ausencia de coinfección. Por otro lado, Xu y colaboradores (2008) reportaron niveles de coinfección del 36% en cañas híbridas para la región sur de China, aunque otros reportes informan niveles bajos o nulos de coinfección (Alegria *et al.*, 2003, Grisham y Pan, 2007), por lo que estas diferencias podrían deberse a causas geográficas, a interacciones virus-vector o virus-genotipo de la planta o a la abundancia y distribución de las especies de áfidos vectores. Es sorprendente que se detectara el SrMV en pocas muestras colectadas en Argentina (11 de 567), mientras que en Paraguay se detectó en 8 de 12 muestras, teniendo en cuenta que en aquel país se encontraron pocas plantas con sintomatología, a pesar de haber recorrido varias localidades productoras de caña de azúcar. De hecho, todas las muestras positivas para SrMV fueron colectadas en el Campo Experimental Natalicio Talavera (Paraguay).

Las muestras inicialmente negativas para el SCMV y el SrMV fueron analizadas con iniciadores específicos para el SCSMV, obteniéndose un resultado negativo para la totalidad de las mismas, en concordancia con lo reportado por Perera y colaboradores en el 2009 para el área de Tucumán. En un reporte reciente de Sawazaki y colaboradores, se informa por primera vez la presencia del SCSMV en América, habiéndose detectado dicho virus en un área productora del Brasil (Sawazaki *et al.*, 2012). Resulta de gran importancia el cumplimiento de las normas cuarentenarias para evitar la introducción de dicho patógeno a la Argentina, y es de gran utilidad disponer de una técnica sensible como la RT-PCR para detectar la posible presencia del SCSMV (Fernandez *et al.*, 2006).

Los productos de amplificación del gen de la proteína de cápside fueron secuenciados directamente con los iniciadores usados en la amplificación o con una versión mas corta de los mismos. De esta manera se evitó el clonado de los productos de amplificación, de manera similar a lo reportado por Xu y colaboradores (2008). Las secuencias obtenidas fueron analizadas inicialmente con matrices de identidad, con las que se determinó que el 89,4% de las muestras del SCMV correspondían a genotipos únicos, con valores de identidad de secuencia nucleotídica entre 0,77 y 1,00. Este rango de valores de identidad nucleotídica es similar al reportado para aislamientos del SCMV colectados en China (Xu *et al.*, 2008) y para aislamientos colectados en África (Alegria *et al.*, 2003) aunque es más amplio que el reportado por Perera y colaboradores (2009) para el área de Tucumán (identidades entre 0,959 y 0,999). En contraste, las muestras del SrMV mostraron un rango mucho menor de identidad de secuencia, que osciló entre 0,97 y 1,00. Xu y colaboradores (2008) reportaron un valor de identidad de secuencia promedio de 0,90 para el gen de la proteína de cápside entre 8 muestras de SrMV colectadas en cañas híbridas en el sur de China, evidenciando una mayor diversidad genética de este virus en China con respecto al encontrado en nuestro estudio.

El uso de los iniciadores degenerados oligo1n y oligo2n (Marie-Jeanne *et al.*, 2000) y luego la versiones para secuenciar Oli40 y Oli41 permitió la amplificación de secuencias virales a partir de muestras para las que los iniciadores específicos de SCMV y SrMV no habían dado lugar a productos de amplificación (Fernandez *et al.*, 2006). La secuenciación de dichos productos y el análisis por BLAST (Grisoni *et al.*, 2006) permitió su clasificación. Entre las 9 muestras clasificadas, dos secuencias fueron identificadas como pertenecientes al grupo MZ de SCMV, que normalmente infecta maíz (Alegria *et al.*, 2003, Gao *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2008). Particularmente la región

analizada de la muestra ARG-306 tiene una secuencia idéntica a la de un aislamiento SCMV de maíz colectado en la Argentina (Sousa *et al.*, 2005).

En la Fig. 2.5 se puede apreciar la estructura de la población viral muestreada en la campaña 2007-2008. La altura de los picos da una idea de la abundancia de cada grupo viral identificado y su distribución en el plano indica la divergencia a nivel nucleotídico y aminoacídico para el gen de la proteína de cápside (Adams *et al.*, 2004b). En este gráfico se pueden identificar 4 grupos virales (picos) que serían confirmados a continuación por el análisis filogenético; los grupos SCE, MZ y W dentro del SCMV y un pico más divergente correspondiente al SrMV. El grupo SCE incluye al 93,8% de las muestras y es por ende el de mayor importancia epidemiológica al momento del muestreo. El grupo W propuesto se diferencia del grupo SCE por acumular un importante número de mutaciones silenciosas en la región central del gen de la proteína de cápside, lo que determina que el pico este “corrido” hacia la derecha (Fig. 2.5), es decir acumula mutaciones a nivel nucleotídico que no afectan la secuencia aminoacídica del gen.

La construcción de árboles filogenéticos permitió comparar las muestras virales descritas en esta Tesis con aquellas descritas previamente y clasificarlos en grupos de similitud. Las muestras del SrMV colectadas son genéticamente cercanas entre sí, de manera similar a lo reportado por Chen y colaboradores en China (Chen *et al.*, 2002) y se agrupan con otros aislamientos colectados de cañas híbridas (grupo “HS”) de acuerdo a la clasificación propuesta por Xu y colaboradores en 2008 (Fig. 2.2). No parece haber una relación entre el genotipo del SrMV y la región geográfica muestreada ya que se observan valores bajos de “Bootstrap” dentro de la rama que contiene a todas las muestras de este estudio, con muestras provenientes de Paraguay, Tucumán, Salta y Jujuy, junto con aislamientos colectados en los EE.UU.

A partir del árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV, las muestras colectadas se pueden clasificar en tres grupos discretos (Fig. 2.3). El primero, que engloba a la mayor parte de las muestras es el grupo SCE (Alegria *et al.*, 2003), e incluye aislamientos colectados exclusivamente en caña de azúcar. El segundo grupo, denominado MZ, incluiría a las muestras ARG-308 (no incluida en la figura debido a que el gen CP solo se secuenció parcialmente) y la muestra ARG-306, cuyo gen CP fue secuenciado completamente e incorporado a la Figura 2.4. La importancia epidemiológica de estos aislamientos, que típicamente se encuentran infectando maíz, no está clara. Para algunos

autores parece haber una clara distinción entre genotipos de SCMV que tienen como hospedante al maíz de los que tienen como hospedante a la caña de azúcar (Xu *et al.*, 2008), mientras que otros autores clasifican dentro del mismo grupo a ciertos aislamientos colectados en ambos cultivos (Gemechu *et al.*, 2006, Gao *et al.*, 2011). Las diferencias reportadas podrían deberse a diferentes metodologías de reconstrucción filogenética o a que, dependiendo de las condiciones, genotipos similares tengan realmente la capacidad de infectar ambas especies. Esto no sería raro, ya que el SCMV tiene la capacidad de infectar varias especies de malezas además de los cultivos de importancia económica (Shukla *et al.*, 1989). El tercer grupo que se evidencia en la Fig. 2.3 es el que reportamos en este trabajo por primera vez como grupo W, y está compuesto por 9 muestras colectadas en un área relativamente pequeña de Salta y Jujuy. Estas muestras no estuvieron asociadas a ningún genotipo particular de caña de azúcar y fueron colectadas en lotes comerciales y experimentales en Salta y Jujuy. El grupo W presenta una identidad nucleotídica promedio para el gen CP de 0,91 con el grupo mayoritario SCE, pero una identidad aminoacídica promedio de 0,97 con el mismo. Debido a esto, las muestras del grupo W se separan claramente en el árbol de la Figura 2.5.A (secuencia nucleotídica) pero no en el árbol de la Figura 2.5.B (secuencia aminoacídica). Este hecho podría tener consecuencias para el diseño de un transgén de resistencia mediada por silenciamiento génico, ya que este mecanismo celular depende de la identidad de secuencia nucleotídica entre el gen quimérico que desencadena el silenciamiento y la secuencia nucleotídica del virus infectante (Harrison, 2002, Ingelbrecht *et al.*, 1999).

Se decidió secuenciar el genoma completo de una muestra del SCMV del grupo SCE y una muestra del grupo W con el objetivo de identificar regiones del genoma viral evolutivamente conservadas más allá del gen de la proteína de cápside y que eventualmente pudieran servir como blanco de silenciamiento génico. En las Tablas 2.4 y 2.5 se describen los sitios de corte de proteasas y los motivos de secuencias descriptos para miembros del género *Potyvirus*. En la Figura 2.9 se observa que los dos genomas secuenciados se agrupan con el único genoma de SCMV colectado en caña de azúcar, diferenciándose claramente de los aislamientos de maíz y de cañas nobles. Sin embargo, en la Figura 2.8 se observa que la muestra ARG-915 del grupo W acumula un importante número de mutaciones en la región 3' del gen NIB y en la región central del gen de la proteína de cápside respecto de los otros dos aislamientos de caña de azúcar híbrida, lo que podría significar que este grupo se originó por recombinación. La

recombinación en el SCMV, cuyo genoma está conformado por ARN simple cadena, está ampliamente documentado (Achon *et al.*, 2007, Padhi y Ramu, 2011, Zhong *et al.*, 2005). Sin embargo, utilizando el extremo 3' del genoma de la muestra del grupo W (genes Nib, CP y 3'UTR) en una búsqueda de BLAST, no se encontró depositado en GenBank ningún aislamiento con identidad de secuencia superior a 0,90 que pudiera ser considerado como parental putativo.

Con el objetivo de identificar otras regiones conservadas en las muestras estudiadas, se secuenció una región del gen P3 identificada en este trabajo como conservada en secuencias del SCMV disponibles en GenBank. Se seleccionaron muestras de los 4 grupos virales identificados. En una matriz de identidad nucleotídica (Tabla 2.3) y un árbol filogenético (Fig. 2.7) se pudo observar que las muestras de los grupos SCE y W compartían mayor identidad de secuencia ($> 0,98$) en el gen P3 que en el gen de la proteína de cápside ($< 0,92$) y ambos grupos se ubicaban en una única rama del árbol. Este resultado hace a esta región conservada del gen P3 un blanco interesante para emplear la estrategia de silenciamiento génico en plantas transgénicas. Durante el transcurso de ésta Tesis, Chung y colaboradores (2008) reportaron el descubrimiento de un nuevo gen dentro del cistrón P3 al que denominaron PIPO y que se traduciría en el marco de lectura +2 como un producto de fusión P3-PIPO. Los autores muestran evidencias de que el gen PIPO es esencial para el movimiento del virus y estaría conservado dentro de la familia *Potyviridae*. Se determinó bioinformáticamente que el fragmento del gen P3 identificado como conservado en las muestras de SCMV secuenciadas incluye al marco de lectura abierta PIPO. Desde el punto de vista evolutivo, la superposición de dos marcos de lecturas abiertos en distintos marcos resulta en una mayor restricción a la acumulación de mutaciones sin que se vea afectado el fitness del virus. Este resultado hace a esta región conservada del gen P3-PIPO un blanco interesante para emplear la estrategia de silenciamiento génico en plantas transgénicas

En conclusión, las muestras del SCMV y del SrMV secuenciados en el presente estudio pueden ser clasificados de acuerdo a la similitud en la secuencia del gen de la proteína de cápside en cuatro grupos, tomando como valor de corte una identidad de secuencia de 0,92. Dichos grupos son el grupo HS del SrMV y los grupos SCE, MZ y W del SCMV. De esta manera, se alcanzó el objetivo del muestreo de caracterizar la variabilidad de los agentes causales del mosaico de la caña de azúcar en la región y asignar todas las variantes virales a grupos discretos de similitud. Este resultado fue

tenido en cuenta para el diseño de un transgén de resistencia contra el mosaico basado en el silenciamiento génico, que se describe en detalle en el capítulo III.

Capítulo III

Capítulo III

Objetivo general: Diseño y obtención de una construcción genética capaz de desencadenar el mecanismo de silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico y la obtención de líneas de caña de azúcar transgénicas que expresen dicha construcción.

Objetivos particulares:

1. Identificación de regiones conservadas del genoma del SCMV y del SrMV para su utilización como desencadenantes del silenciamiento génico en plantas de caña transgénicas.
2. Obtención de una construcción genética capaz de expresar tres fragmentos derivados de los genomas del SCMV y SrMV en orientación sentido y antisentido para desencadenar silenciamiento génico en plantas transgénicas mediante la expresión de horquillas de ARN de doble cadena.
3. Obtención de eventos de caña de azúcar transgénica derivados de variedades de importancia comercial capaces de expresar dicha construcción.

III. Resultados

En este capítulo se describe el diseño y obtención de construcciones tipo horquilla para desencadenar silenciamiento génico contra los virus descritos en el Capítulo II. Se seleccionaron cuatro variedades de caña de azúcar desarrolladas en el programa de mejoramiento genético clásico de la Chacra Experimental (denominadas “NA” y el número de clon) y una variedad desarrollada en EE.UU. (denominada “CP” por “Canal Point”) para ser transformadas con las construcciones desarrolladas. Estas variedades son o han sido de importancia económica en el área cañera de Salta y Jujuy, pero muestran distintos grados de susceptibilidad a la enfermedad del mosaico, lo que afecta negativamente el rendimiento de las mismas por lo que se han dejado de utilizar parcial o totalmente. La obtención de variedades transgénicas resistentes o tolerantes al mosaico permitiría “recuperar” estos genotipos elite y permitiría una mayor adopción de las mismas en los cañaverales de la región.

3.1. Diseño de construcciones adecuadas para desencadenar silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico en plantas de caña transgénicas

Como se discutió en la Introducción, es posible conferir resistencia a virus mediante la expresión de secuencias derivadas del virus que se desea controlar explotando el mecanismo de silenciamiento de ARN (Eamens *et al.*, 2008). Existen varios factores que pueden afectar la efectividad con que es desencadenado el silenciamiento de secuencias virales, siendo uno de ellos el grado de identidad de secuencia entre el transgén y la secuencia del genoma viral desafiante (Harrison, 2002). Aunque no existe un valor preciso reportado en la literatura, adoptamos como criterio de efectividad una identidad de secuencia nucleotídica entre el transgén y el virus desafiante mayor al $\sim 0,90$.

En el Capítulo II se clasificaron todas las muestras virales colectadas en la región en cuatro grupos de similitud, utilizando como valor de corte una identidad de secuencia en el gen de la proteína de cápside de 0,92. En un principio se consideró la posibilidad de clonar cuatro fragmentos virales en la construcción de resistencia, uno por cada grupo de similitud viral, en vistas de que la construcción a expresar en cañas transgénicas tuviera en teoría la capacidad de silenciar a todo el espectro de variantes

virales caracterizado en este estudio. Sin embargo, al secuenciar el gen P3 de un subset de muestras se observó que los grupos SCE y W del SCMV comparten altos valores de identidad nucleotídica (>0,98) en un fragmento de dicho gen que incluye al gen PIPO (Chung *et al.*, 2008). Por lo tanto, el fragmento conservado del gen P3 fue seleccionado para desencadenar el silenciamiento contra los grupos SCE y W del SCMV. Para desencadenar el silenciamiento contra los grupos virales SrMV y MZ del SMCV, se seleccionó la región central (más conservada) del gen de la proteína de cápside de una muestra de cada grupo (Tabla 3.1). Las dos regiones seleccionadas de la proteína de cápside no son homólogas, con lo que se reduciría la posible inestabilidad por recombinación del vector en bacterias y plantas (Bucher *et al.*, 2006). La muestra a partir del cuál se amplificó cada fragmento para ser clonado en la construcción fue seleccionada buscando aquella que tuviera el valor más alto de identidad de secuencia nucleotídica comparado con la secuencia consenso calculada para cada región del genoma viral.

Tabla 3.1. Fragmento viral seleccionado para ser clonado en la construcción que se utilizará para desencadenar el silenciamiento contra cada grupo viral blanco.

Grupo viral blanco	Fragmento clonado	Posición en el genoma viral (*)
SCE y W del SCMV	Fragmento de 395 pb del gen P3 del SCMV, grupo SCE.	Bases 2558 a 2952 del SCMV
MZ del SCMV	Fragmento de 316 pb del gen de la proteína de cápside del SCMV, grupo MZ.	Bases 9079 a 9394 del SCMV
SrMV	Fragmento de 318 pb del gen de la proteína de cápside del SrMV.	Bases 8711 a 9028 del SrMV

(*) Posiciones de hibridación en base a los genomas completos del SCMV aislamiento Brisbane (GenBank AJ278405), SrMV aislamiento H (GenBank U57358).

Existe el riesgo de que las secuencias virales seleccionadas para ser incluidas en la construcción para desencadenar silenciamiento compartan suficiente similitud de secuencia con genes endógenos de la caña de azúcar, y que al desencadenar el silenciamiento contra los virus del mosaico también se silencie la expresión de genes endógenos (del inglés “off-targets”). Para evaluar este riesgo se utilizó la herramienta “siRNA Scan” (Xu *et al.*, 2006) disponible en el sitio Web <http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm>. Esta herramienta analiza la secuencia a ser utilizada como desencadenante del silenciamiento buscando con el algoritmo Blastn fragmentos de 21 nucleótidos que tengan 100% de identidad con secuencias de EST

derivadas de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* Gene Index versión 3, conteniendo 282.683 ESTs). Estos fragmentos de 21 nucleótidos representan potenciales siARNs, teniendo en cuenta las reglas para un siARN efectivo descritas por Ui-Tei y colaboradores (2004). En un estudio sistemático en células de mamíferos, Ui-Tei y colaboradores encontraron que no todos los siARNs dirigidos contra el gen reportero de la Luciferasa eran igualmente efectivos para silenciar su expresión. Los autores describieron cuatro reglas para la secuencias de siARNs, que al ser cumplidas simultáneamente, resultan en siARNs altamente efectivos: 1) portar una A/U en el extremo 5' de la hebra antisentido, 2) portar una G/C en el extremo 5' de la hebra sentido, 3) al menos cinco A/U en el primer tercio del extremo 5' de la hebra antisentido, 4) la ausencia de 9 o mas residuos de GC contiguos. Utilizando la herramienta "siRNA Scan" y teniendo en cuentas las reglas para identificar siARNs efectivos mencionadas, se realizó el análisis de los tres fragmentos descritos en la Tabla 3.1, obteniéndose como resultado que ninguno de los tres generaría siARNs efectivos contra los genes endógenos de la caña de azúcar disponibles en la base de datos mencionada.

3.2. Obtención de construcciones para desencadenar silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico

Las tareas de clonado fueron llevadas a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Daniel Silhavy en el Agricultural Biotechnology Center de Gödöllő, Hungría. Dicha colaboración se llevó a cabo en el marco del Programa de Cooperación Científico-Tecnológica Argentino-Húngara (proyecto AR-4/2007), por el cual trabajé por 2 meses en el instituto mencionado.

Todos los fragmentos presentes en las construcciones finales fueron primero clonados en pBluescript SK y secuenciados para una mayor seguridad y confiabilidad.

Para dirigir la expresión de los transgenes se decidió utilizar promotores de monocotiledóneas con eficacia demostrada en caña de azúcar, que fueron utilizados con anterioridad en el programa de Biotecnología de la Chacra Experimental. Se utilizó el promotor del gen de la ubiquitina de maíz (Christensen y Quail, 1996) para dirigir la expresión del casete de resistencia viral y el promotor del gen de la actina de arroz (McElroy *et al.*, 1991) para dirigir la expresión del gen selectivo NptII. El gen NptII ha

sido utilizado ampliamente como gen selectivo en la transformación de caña de azúcar (Bower y Birch, 1992, Falco *et al.*, 2000, Manickavasagam *et al.*, 2004).

Como resultado final de una serie de 13 pasos de clonado que por razones de espacio no se detallan aquí, se obtuvieron cuatro plásmidos para la transformación biolística de caña de azúcar (Tabla 3.2 y Fig. 3.1). La serie de plásmidos “VIR3” cuenta con los 3 fragmentos virales descritos en la Tabla 3.1, mientras que en la serie “VIR2” se excluyó el fragmento del gen de la proteína de cápside del grupo MZ del SCMV, por ser éste un grupo minoritario en el muestreo realizado. Los plásmidos denominados “NptII” portan el gen de neomicina fosfotransferasa II (Fraley *et al.*, 1983) bajo la dirección del promotor del gen de la actina de arroz, que otorga resistencia a los antibióticos kanamicina y geneticina y puede ser usado como marcador selectivo en plantas. Por otro lado, los plásmidos que no portan el gen NptII pueden ser utilizados para cotransformar por biobalística con otros genes selectores de interés si se lo desea, por ejemplo genes de tolerancia a herbicida con un potencial valor agronómico.

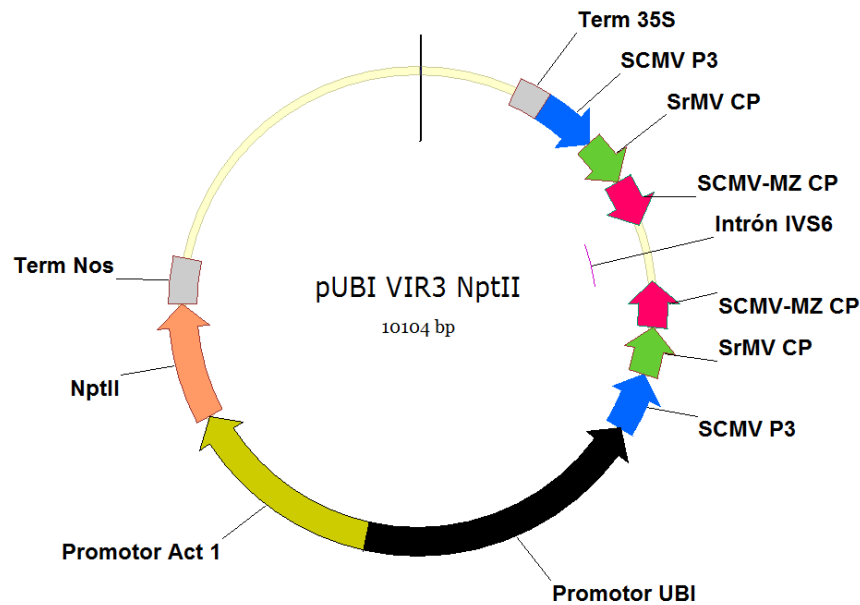


Fig. 3.1. Diagrama del plásmido pUBI VIR3 NptII empleado en la transformación biolística de caña de azúcar. Promotor UBI y Promotor Act 1 corresponden a los promotores junto con el primer exón y el primer intrón de los genes de la Ubiquitina de maíz y Actina de arroz respectivamente. Term 35S y Term Nos son los terminadores de los genes del transcritto 35S del CaMV y del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* respectivamente. Intrón IVS6 corresponde al intrón 6 del gen IVS de maíz. Con los colores azul, verde y rojo se muestran los tres fragmentos virales clonados en direcciones opuestas a ambos lados del intrón IVS6.

En los casos en los que se utilizan dos promotores en la misma construcción (pUBI VIR3 NptII y pUBI VIR2 NptII), éstos están orientados en direcciones opuestas

para evitar la transcripción indeseada de secuencias río abajo de los terminadores. Finalmente, todos los plásmidos cuentan con 2 sitios *Kpn* I flanqueando el/los casete(s) de expresión. Estos sitios de restricción permiten la digestión enzimática del plásmido para poder separar mediante electroforesis y purificar a partir del gel de agarosa el casete de expresión. Tal como se desarrolló en la Introducción, transformar plantas utilizando solo el casete de expresión conlleva ventajas para la desregulación comercial de los eventos obtenidos (Kim *et al.*, 2011, Taparia *et al.*, 2012).

Tabla 3.2. Principales características de los plásmidos de transformación obtenidos.

Plásmido	Grupo viral blanco del silenciamiento	Gen selectivo en plantas
pUBI VIR3 NptII	SCE, W y MZ del SCMV y el SrMV	NptII (Geneticina)
pUBI VIR3	SCE, W y MZ del SCMV y el SrMV	Ninguno (versátil para cotransformación)
pUBI VIR2 NptII	SCE y W del SCMV y el SrMV	NptII (Geneticina)
pUBI VIR2	SCE y W del SCMV y el SrMV	Ninguno (versátil para cotransformación)

3.3. Transformación biolística de variedades de caña de azúcar susceptibles al mosaico

Se seleccionaron cinco variedades de caña de azúcar susceptibles a la enfermedad del mosaico para ser transformadas con los plásmidos desarrollados. Entre las variedades seleccionadas figuran:

1. Variedades de caña de uso comercial pero que han sido dejadas de usar parcial o totalmente por su susceptibilidad a mosaico: NA 84-3013, NA 84-3419 y CP 72-2086 (Tabla 4.1) (Ing. Agr. Ricardo Fernández de Ullivarri, comunicación personal).
2. Variedades precomerciales destacadas del programa de mejoramiento genético de la Chacra Experimental y que comienzan a ser multiplicadas por los ingenios azucareros de Salta y Jujuy, pero que demuestran cierta susceptibilidad al mosaico: NA 97-3463 y NA 97-3152 (Tabla 4.1) (Ing. Agr. Ricardo Fernández de Ullivarri, comunicación personal).

De esta manera se intentó obtener variedades transgénicas para su uso comercial directo. Se planea, a su vez, introducir el transgén de resistencia al virus del mosaico en

el programa de mejoramiento genético de la Chacra Experimental transformando progenitores destacados que muestran susceptibilidad al mosaico.

En la Figura 3.2 se observa un esquema general del protocolo de cultivo *in vitro* y transformación de la caña de azúcar utilizado.

3.3.1. Cultivo *in vitro* de caña de azúcar

Se utilizó la sección apical de la caña de azúcar (cogollo) como explanto para el cultivo *in vitro* de caña de azúcar, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se cocultivaron los discos de cogollo durante dos a tres meses en medio MSE3cx2 que contiene la hormona 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxi acético), con repiques a medio fresco cada dos semanas. Dicha hormona induce a la desdiferenciación celular y al crecimiento del tejido de callo (Ahloowalia y Maretzki, 1983). Las diferentes variedades de caña de azúcar varían en su comportamiento *in vitro*, generando callos de distinta morfología y capacidad de regeneración. Se observaron tres tipos de callos: callos blancos y globulares capaces de regenerar una planta (embriogénicos); callos friables no morfogénicos y callos nodulares y mucilaginosos que pueden revertir a los otros dos tipos de callos (Chen *et al.*, 1988). Las variedades NA 84-3013, NA 84-3419 y NA 97-3463 presentaron el mejor comportamiento *in vitro*, generando mayormente callos blancos y globulares de buena capacidad de regeneración. En cambio, las variedades CP 72-2086 y NA 97-3152 presentaron un desempeño más pobre, con la variedad NA 97-3152 produciendo mayormente callos friables o mucilaginosos sin capacidad de regeneración. Para los experimentos de transformación biolística se seleccionaron callos blancos globulares y se descartó el resto del material. En la Tabla 3.3 se detalla el número de placas iniciales de los experimentos de cultivo *in vitro* para cada variedad de caña de azúcar y el número de placas de callos bombardeadas correspondiente, lo que permite hacer una estimación de la cantidad y calidad de los callos generados a partir de cada variedad.

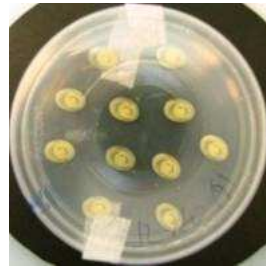
3.3.2. Transformación de callos de caña de azúcar por biobalística

Entre los dos y tres meses de iniciado el cultivo *in vitro*, se separó el tejido de callo formado del explanto original y se lo bombardeó utilizando un cañón génico del tipo “Particle Inflow Gun” (Finer *et al.*, 1992). Se utilizó el protocolo estándar de transformación utilizado en la Chacra Experimental. Los callos fueron repicados a medio osmótico MSE3O (induce la plasmólisis celular) e incubados por 4 horas. Una

Cogollo de la caña de azúcar



1) Desinfección e introducción *in vitro*



2) Crecimiento de callos inducido por la hormona 2,4-D



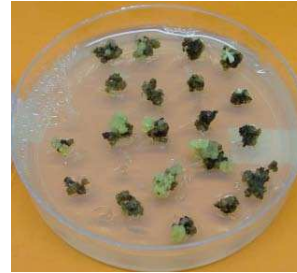
3) Remoción del explanto original



4) Transformación por biobalística



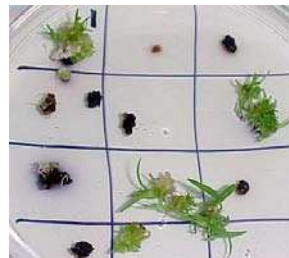
5) Selección de callos resistentes a geneticina



6) Pasaje a la luz y sin la hormona 2,4-D



7) Regeneración



8) Desarrollo del sistema radicular



9) Rusticación en tierra



Fig. 3.2. Esquema de cultivo *in vitro* y transformación de caña de azúcar por biobalística.

hora antes del bombardeo las placas fueron abiertas en el flujo laminar para eliminar el exceso de humedad de los callos. Este paso de secado resultó crítico para obtener una alta eficiencia de transformación. Cada placa fue bombardeada con una suspensión en etanol de 0,5 µg de partículas de tungsteno sobre las que se precipitó previamente 4 µg de plásmido. Luego de 3-4 días de incubación en medio no selectivo, los callos fueron repicados a medio selectivo MSE3 Gen45 conteniendo 45 mg/L del antibiótico geneticina y se incubaron en la oscuridad a 28 – 30° C, con repiques a medio fresco cada 2 semanas.

En una primera instancia se realizaron experimentos de transformación transitoria para confirmar la eficacia del protocolo de transferencia de ADN biológicamente activo al núcleo celular utilizando el gen reportero *uidA* contenido en el plásmido pDMC207 (McElroy *et al.*, 1995). A los 3 días del bombardeo, los callos transformados con dicho plásmido fueron incubados por 16 horas en buffer de revelado conteniendo el sustrato X-gluc, que resulta en la tinción de azul de las células en las que el plásmido ingresa en el núcleo y es expresado (Fig. 3.3). Se observó un alto número de focos GUS positivos por placa bombardeada (> 1000 focos), evidenciando la eficacia del protocolo utilizado (Franks y Birch, 1991, Gallo-Meagher y Irvine, 1993).



Fig. 3.3. Transformación transiente de callos de caña de azúcar de la variedad NA 97-3463 con el plásmido pDMC207 conteniendo el gen reportero *uidA*. A los tres días del bombardeo el tejido fue incubado con el sustrato X-gluc que resulta en la tinción azul de las células que expresan el gen reportero.

A continuación se utilizó el plásmido pUBI VIR3 NptII (Fig. 3.1) para la transformación estable de callos de las cinco variedades de caña de azúcar seleccionadas siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos. Se decidió utilizar el plásmido pUBI VIR3 NptII en todos los experimentos de transformación ya que ésta construcción otorgaría la resistencia mas amplia contra los virus del mosaico y además expresa el gen NptII de resistencia a geneticina, que ha demostrado ser muy efectivo en la selección de plantas transgénicas de caña de azúcar (Bower y Birch,

1992). Aproximadamente a las 6 u 8 semanas de la transformación se observó el crecimiento de callos resistentes a geneticina, que se destacan como callos blancos o de color claro creciendo a partir de una masa de callo de color más oscuro y que se termina necrosando (Fig. 3.2 paso 5). Cada callo resistente a geneticina fue separado del tejido muerto, se le asignó un código de identificación y fue considerado subsiguientemente como un evento putativo independiente. Los callos resistentes a geneticina fueron repicados a medio de regeneración MSR Gen 45 (no contiene la hormona 2,4-D y contiene 45 mg/L de geneticina) e incubados a 28-30 °C y a la luz.

Dependiendo de la variedad transformada, un porcentaje variable de los callos incubados a la luz regeneraron plantines putativamente transgénicos a través de embriogénesis somática (Ahloowalia y Maretzki, 1983, Guiderdoni y Demarly, 1988). La Tabla 3.3 resume los resultados obtenidos. Las variedades NA 97-3463, NA 84-3013 y NA 84-3419 tuvieron el mejor desempeño *in vitro*, dando lugar a más de 200 callos resistentes a geneticina y más de 100 eventos putativos que desarrollaron raíces cada una. Por otro lado, las variedades NA 97-3152 y CP 72-2086 tuvieron un desempeño más pobre y dando lugar a un número menor de callos resistentes a geneticina por placa bombardeada, aunque el porcentaje de callos resistentes que regeneraron de CP 72-2086 fue similar al de las variedades de buen desempeño *in vitro*. La variedad NA 97-3152 fue recalcitrante a la transformación, obteniéndose callos resistentes a geneticina del tipo mucilaginoso y solo un evento putativo con desarrollo radicular suficiente para el trasplante a maceta. En promedio, el 54% de los callos puestos a regenerar resultaron en plantines de caña pasibles de ser rusticados, promediando 2,9 eventos rusticables por placa bombardeada.

En los experimentos de transformación estable se incluyeron controles de regeneración para cada variedad de caña de azúcar, que corresponden a callos no bombardeados incubados en medio sin agente selectivo (Fig. 3.4) y permiten estimar la capacidad de regeneración a partir de tejido de callo. Estos controles fueron eventualmente utilizados como controles de infección no transgénicos en el ensayo de inoculación artificial (ver Capítulo IV). En general se observó un adecuado crecimiento en los controles de regeneración, excepto para la variedad NA 97-3152, cuya eficiencia de regeneración fue muy baja.

Tabla 3.3. Resumen de los experimentos de transformación de cinco variedades de caña de azúcar con el plásmido pUBI VIR3 NptII

Variedad transformada	# placas de cultivo <i>in vitro</i>	# placas bombardeadas	# callos resistentes a genet. puestos a regenerar	# callos resistentes / placa bombardeada	% callos que regeneraron	# eventos listos para rusticar	# eventos rusticables / placa Bombardeada
NA 97-3152	40	11	26	2,4	4 %	1	0,1
CP 72-2086	35	12	23	1,9	52 %	12	1,0
NA 84-3419	38	46	248	5,4	54 %	134	2,9
NA 84-3013	42	44	243	5,5	59 %	144	3,3
NA 97-3463	40	67	421	6,3	54 %	229	3,4
Total / Promedio	Total 195	Total 180	Total 961	Promedio 5,3	Promedio 54 %	Total 520	Promedio 2,9

Tabla 3.4. Número de eventos y plantines rusticados y porcentaje de supervivencia para cinco variedades de caña de azúcar transformadas con el plásmido pUBI VIR3 NptII.

Variedad	# eventos putativos rusticados	Total de plantines rusticados	Plantines sobrevivientes	% de supervivencia
NA 97-3152	1	20	19	95 %
CP 72-2086	12	75	70	93 %
NA 84-3419	120	1252	929	74 %
NA 84-3013	126	1340	1065	79 %
NA 97-3463	136	1836	1447	79 %
Total	395	4523	3530	78%



Fig. 3.4. Control de regeneración de la variedad NA 97-3463; callos no bombardeados incubados en medio MSE3 sin agente selectivo y puestos a regenerar en medio MSR sin agente selectivo y a la luz.

3.3.3. Rusticación de plantines transgénicos putativos de caña de azúcar

Los plantines que presentaron un adecuado nivel de desarrollo *in vitro* en medio selectivo habiendo desarrollado un sistema radicular capaz de sostener el trasplante a maceta, fueron trasladados al invernáculo donde se realizó la rusticación y aclimatación. Se obtuvo un número variable de plantines con raíz por evento, con eventos que mostraban una gran capacidad de proliferación y otros que regeneraron uno o pocos plantines o que no desarrollaban un sistema radicular. Cada plantín fue sembrado individualmente, conservándose la identidad del evento, en un pocillo de multimaceta conteniendo una mezcla de mantillo y cachaza adecuada para la rusticación de caña de azúcar. Se cuidó del exceso de radiación con una media sombra y las plantas fueron regadas y podadas regularmente para estimular un desarrollo vigoroso. Por falta de espacio en el invernáculo, se rusticó un máximo de 18 plantines por evento y no se rusticaron todos los eventos putativos regenerados, restringiendo el número de eventos rusticados para las variedades NA 97-3463, NA 84-3013 y NA 84-3419. En la Tabla 3.4 se detalla el material que fue rusticado en el invernáculo y el porcentaje de supervivencia de los plantines luego de transcurridos cuatro meses de la rusticación.

3.4. Confirmación de la transgénesis de un subconjunto de eventos putativos regenerados

Se confirmó por medio de la técnica de PCR la inserción del transgén en plantines *in vitro*. Debido al elevado número de regenerantes, se consideró poco práctico la confirmación de la transgénesis por PCR de todo el material regenerado. Se decidió tomar una muestra de 21 eventos putativos (buen desarrollo del plantín y sistema radicular en medio selectivo MSR Gen45) incluyendo las 5 variedades

transformadas para estimar el porcentaje de escapes (callos/plantines no transgénicos que crecen en medio selectivo). Se purificaron ácidos nucleicos totales por el protocolo CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y se tomó una alícuota para la amplificación por PCR de un fragmento de 1445 pb utilizando los iniciadores Oli1 y SCMV-R, que hibridan en el primer exón del promotor de la ubiquitina y en el gen P3 del SCMV respectivamente. El 76% de las muestras analizadas resultaron positivas para el fragmento amplificado (Tabla 3.5), por lo que se obtuvo una primera estimación del porcentaje de escapes de un 24%.

Tabla 3.5. Análisis por PCR de plantines transgénicos putativos transformados con la construcción pUBI VIR3 NptII.

Variedad Transformada	# eventos putativos evaluados	# eventos PCR +
NA 97-3152	1	1 (100%)
CP 72-2086	2	2 (100%)
NA 84-3419	6	5 (83,3%)
NA 84-3013	6	4 (66,6%)
NA 97-3463	6	4 (66,6%)
Total	21	16 (74%)

III. Discusión y Conclusiones

El silenciamiento génico fue descubierto por primera vez en plantas y se demostró luego que es un mecanismo celular evolutivamente conservado entre los eucariotas (Voinnet, 2005). El silenciamiento cumple roles en la regulación de la expresión génica, en la regulación de transposones y en la defensa contra distintos patógenos (Eamens *et al.*, 2008, Rovere *et al.*, 2002, Waterhouse *et al.*, 2001). Wesley y colaboradores (2001) establecieron que las construcciones más eficientes para desencadenar el silenciamiento génico son aquellas en la que se ubicaba el fragmento desencadenante del silenciamiento en direcciones opuestas a ambos lados de un intrón de manera de que su expresión en plantas diera lugar a la producción de horquillas de ARN de doble cadena, obteniéndose de esta manera eficiencias de silenciamiento superiores al 90%. Por este motivo, en las construcciones desarrolladas en esta Tesis se utilizó el intrón IVS 6 del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 de maíz para separar las repeticiones invertidas de fragmentos de cDNA del SCMV y del SrMV (Fig. 3.1). Se espera que el procesamiento del ARN mensajero por la maquinaria de “splicing” vegetal escinda la secuencia del intrón resultando en una molécula de ARN doble cadena perfectamente complementaria conteniendo las secuencias virales. La

presencia de ARN doble cadena desencadenaría entonces el mecanismo de silenciamiento génico contra todo ARN que comparta suficiente identidad de secuencia con la secuencia desencadenante, incluyendo los ARN genómicos virales del SCMV y del SrMV (Prins *et al.*, 2008).

La resistencia a virus mediada por silenciamiento génico ha sido reportada para una amplia variedad de especies vegetales y patógenos (Prins, 2003, Prins *et al.*, 2008, Sharp *et al.*, 2002). Existen antecedentes de caña de azúcar transgénicas en las que se busca resistencia contra el SCMV (Gilbert *et al.*, 2005, Joyce *et al.*, 1998, Sooknandan *et al.*, 2003), el SrMV (Ingelbrecht *et al.*, 1999) o contra otras enfermedades virales como *Fiji disease virus* (FDV) (McQualter *et al.*, 2004) y *el Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) (Gilbert *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2011). Con la excepción de las plantas transgénicas desarrolladas por McQualter y colaboradores en 2004 en las que se expresa el ORF 1 del segmento 9 del FDV, en el resto de los casos citados para caña de azúcar resistente a virus se expresa una versión traducible o no traducible del gen de la proteína de cápside del respectivo virus bajo la dirección del promotor de la ubiquitina. En todos estos desarrollos las construcciones genéticas expresan un fragmento genómico de una única especie viral, a diferencia de las construcciones desarrolladas en la presente Tesis que expresan secuencias derivadas de dos especies virales, el SCMV y el SrMV. Bucher y colaboradores (2006) desarrollaron plantas transgénicas de tomate resistentes a cuatro especies de *Tospovirus* al expresar en una construcción tipo horquilla un fragmento de 150 pb del gen N de cada virus blanco. En esta Tesis se buscó resistencia contra dos especies virales, el SCMV y el SrMV, ya que ambas fueron encontradas infectando caña de azúcar en la región, tal como se describió en el Capítulo II. Ambas especies tienen una homología promedio del 75% a nivel nucleotídico para el gen de la proteína de cápside (Yang y Mirkov, 1997 y Capítulo II de esta Tesis) por lo que se consideró necesario incluir regiones derivadas de ambos genomas para desencadenar silenciamiento contra ambas especies virales. Asimismo, Ingelbrecht y colaboradores reportaron en 1999 que plantas transformadas que expresan el gen de la proteína de cápside del SrMV eran resistentes a dicho virus pero susceptibles al SCMV. Por otro lado, dada la variabilidad genética encontrada dentro de las muestras del SCMV, con identidades de secuencia nucleotídica entre 0,77 y 1,00 para el gen de la proteína de cápside, se decidió clonar dos fragmentos de cDNA de dicho virus (Tabla 3.1). Un fragmento pertenece a la región más conservada del gen P3, que incluye el PIPO (Chung *et al.*, 2008) en donde las muestras de los grupos SCE y W del SCMV

comparten una homología del 98%. El otro fragmento clonado pertenece al gen de la proteína de cápside de una muestra del grupo MZ del SCMV, con lo cual se espera que se desencadene eficientemente el silenciamiento contra todos los grupos del SCMV identificados en el Capítulo II. Dada la poca variabilidad genética encontrada en las muestras de SrMV (identidad de secuencia nucleotídica >0,97) se consideró que un solo fragmento del gen de la proteína de cápside sería efectivo para desencadenar el silenciamiento contra este virus. Se decidió clonar fragmentos de cDNA viral entre 300 y 400 pares de bases (Tabla 3.1), aunque fragmentos mas cortos han demostrado ser igualmente efectivos (Harrison, 2002).

En esta Tesis se identificaron regiones virales conservadas dentro de cada uno de tres grupos de virus con el objetivo de clonaras y utilizarlas como blanco del silenciamiento en cañas de azúcar transgénicas. Se espera que esta estrategia resulte en una resistencia durable en el tiempo ya que los virus causales del mosaico teóricamente tendrían restricciones evolutivas para acumular suficientes mutaciones en dichas regiones conservadas y que por lo tanto no podrían escapar al silenciamiento desencadenado por la construcción de resistencia sin una marcada reducción de su aptitud adaptativa. La durabilidad de la resistencia otorgada por el silenciamiento génico probablemente dependa del genotipo de la variedad transformada, de la variabilidad en la secuencia nucleotídica que pueda soportar el genoma viral respecto del transgén de resistencia y de la variabilidad genética a nivel de la población viral sobre la cuál se genere una presión de selección (Harrison, 2002). Se ha reportado que papayas transgénicas homocigotas para un fragmento de 800 pb del gen de la proteína de cápside del *Papaya ringspot virus* del género *Potyvirus* son completamente resistentes únicamente cuando el virus desafiante comparte una identidad de secuencia mayor al 89,5% respecto del transgén, aunque observaron que esto se encuentra influido por la edad de la planta transgénica al momento de ser desafiada (Tennant *et al.*, 2001). Por otro lado, Ingelbrecht y colaboradores reportaron en 1999 que cañas de azúcar transgénicas expresando el gen de la proteína de cápside del SrMV mostraban niveles más altos de infección a medida que la identidad de secuencia nucleotídica del virus desafiante disminuía respecto del transgén. Joyce y colaboradores (1998) reportaron en caña de azúcar que un transgén de resistencia formado por el gen de la proteína de cápside del SCMV confería resistencia contra un aislamiento de SCMV con 97% de homología con el transgén.

En todos los reportes de caña de azúcar transgénicas para resistencia a virus mencionados en la presente discusión, los autores utilizaron el gen selector NptII para cobombardear con la construcción de resistencia a virus. Esta estrategia resulta generalmente en la incorporación de un número variable de ambos transgenes en distintos *loci* (Butterfield *et al.*, 2002, Glynn *et al.*, 2010). Los plásmidos pUBI VIR3 NptII y pUBI VIR2 NptII desarrollados en esta Tesis presentan los casetes de expresión del gen NptII y del gen quimérico viral clonados en el mismo plásmido de transformación. Esta conformación probablemente resulte en patrones de inserción en el genoma de la planta más simples, lo que simplificaría la caracterización molecular requerida por los sistemas regulatorios para el análisis de riesgo de las plantas transgénicas (Craig *et al.*, 2008).

El cultivo *in vitro* de caña de azúcar está influido entre otros factores por el genotipo de la variedad bajo estudio (Snyman *et al.*, 2006). Basnayake y colaboradores (2011) reportaron que de 16 genotipos de caña de azúcar utilizados en Australia, 12 resultaron adecuados para el cultivo *in vitro* y transformación por biobalística con un protocolo estándar. Por otro lado, tres genotipos requirieron de la modificación en la concentración de 2,4-D y geneticina en los medios de cultivo y/o la modificación en la intensidad de la luz durante la regeneración, mientras que una variedad resultó recalcitrante al cultivo *in vitro*. En nuestro laboratorio, de las cinco variedades ensayadas, tres resultaron en un buen desempeño *in vitro* y en buenas eficiencias de transformación (NA 97-3463, NA 84-3013 y NA 84-3419), una variedad (CP 72-2086) demostró un desempeño intermedio y una variedad (NA 97-3152) demostró ser recalcitrante a la transformación (Tabla 3.3). La baja calidad de los callos generados por la variedad NA 97-3152 (mucilaginosos, no globulares) dio lugar a que se obtuviera un solo evento regenerado a partir de la misma. Sin embargo, para el resto de las variedades se obtuvo entre uno y tres eventos putativos por placa bombardeada, que se encuentra dentro del rango reportado previamente para caña de azúcar (Basnayake *et al.*, 2011, Bower y Birch, 1992, Kim *et al.*, 2011).

Durante el proceso de rusticación de los plantines *in vitro* se observó una mortandad promedio del 22%, valor que estuvo influido por las altas temperaturas registradas en el mes de la rusticación (marzo) y al hecho de que el invernáculo donde se las rusticó no cuenta con sistema de refrigeración. Para minimizar el efecto de la alta radiación se utilizó una malla de media sombra. Se rusticaron 395 eventos putativos,

con un rango de entre 1 y 18 plantines por evento dependiendo de la capacidad de regeneración y multiplicación de cada evento.

Dado el gran número de eventos putativos regenerados (520) se consideró poco práctico la confirmación de la transgénesis por los métodos clásicos de purificación de ADN y PCR de todo el material. Dado que es probable que parte del material regenerado esté compuesto de escapes, y que el porcentaje de escapes puede variar con el genotipo de caña transformado (Basnayake *et al.*, 2011), se decidió obtener una estimación del número de escapes (explantos no transgénicos resistentes al antibiótico geneticina) a partir de una muestra. La confirmación de la transgénesis se realizaría luego de seleccionar los eventos putativos por su fenotipo directamente en ensayos de resistencia a virus del mosaico en invernáculo y a campo (ver Capítulo IV). Se extrajo ADN y analizó por la técnica de PCR 21 eventos putativos de las cinco variedades transformadas y se obtuvo un porcentaje de escapes del 24%. Sin embargo en el experimento de PCR no se amplificó un gen endógeno como control de inhibición, por lo que el porcentaje de escapes podría ser menor. Por su parte, Kim y colaboradores en el 2011 reportaron un porcentaje de escapes del 14% en la transformación de callos de caña de azúcar con el gen NptII utilizando geneticina como agente selectivo en el cultivo de callos y paramomicina durante la regeneración. De hecho, los resultados de un experimento de PCR a partir de eventos seleccionados del ensayo de campo que se describe en el Capítulo IV sugieren que el porcentaje de escapes es efectivamente menor.

Las plantas transgénicas desarrolladas en el presente capítulo fueron desafiadas con el virus del mosaico bajo condiciones artificiales de infección y a campo bajo condiciones naturales de infección. Los resultados obtenidos de dichos ensayos se detallan en el Capítulo IV.

Capítulo IV

Capítulo IV

Objetivo general: Evaluación preliminar de las líneas de cañas transgénicas obtenidas por su resistencia a la enfermedad del mosaico en un ensayo de inoculación artificial y en un ensayo de infección natural a campo.

Objetivos particulares:

1. Selección de eventos transgénicos de caña con buen comportamiento frente a la inoculación artificial con SCMV para un posterior ensayo de evaluación a campo.
2. Realización de un ensayo a campo para la evaluación preliminar de la resistencia a la enfermedad de las líneas transgénicas obtenidas bajo condiciones naturales de infección.
3. Caracterización molecular de un número de eventos destacados por las técnicas de PCR, RT-PCR y “Northern blot” de ARN mensajero y ARNs pequeños.

IV. Resultados

En el Capítulo III se describe el desarrollo de plantas de caña de azúcar transgénicas que han incorporado un transgén diseñado para desencadenar el mecanismo de silenciamiento génico contra los virus causales del mosaico. Se rusticaron un número variable de plantines (entre 1 y 18) que dependió de la capacidad de regeneración y multiplicación de los callos transgénicos puestos a regenerar a la luz. En total se obtuvieron 395 eventos putativos a partir de la transformación de cinco variedades de caña de azúcar. En la Tabla 4.1 se describe brevemente el porcentaje de adopción (superficie plantada respecto del total) en los Ingenios San Martín de Tabacal y Ledesma (los dos ingenios más grandes de Salta y Jujuy) de las variedades que fueron seleccionadas para ser transformadas y su respuesta frente al mosaico. En el presente capítulo se describe la caracterización fenotípica de estos eventos en dos ensayos de desafío con el virus del mosaico, uno en invernáculo, bajo condiciones artificiales de infección y otro a campo, bajo condiciones naturales de infección. Ambos ensayos fueron realizados con la aprobación previa de la CONABIA quienes además inspeccionaron posteriormente el ensayo para asegurar el cumplimiento de la normativa de bioseguridad vigente. Finalmente, se describe la caracterización a nivel molecular de un grupo seleccionado de eventos.

Tabla 4.1. Porcentaje de adopción de las variedades de caña seleccionadas para ser transformadas y respuesta de las mismas ante el mosaico.

Variedad	Ingenio Tabacal		Ingenio Ledesma		Mosaico	
	% de adopción máxima (año)	% de adopción actual	% de adopción máxima (año)	% de adopción actual	Incidencia I. Ledesma (*)	Severidad Chacra Exp. (#)
NA 84-3013	2,6% (2007)	0,8%	No plantada	No plantada	-	3-4
NA 84-3419	19,4% (2006)	0,8%	No plantada	No plantada	-	1
CP 72-2086	No plantada	No plantada	14,4% (2005)	0%	> 80%	2
NA 97-3152	29,6% (2012)	29,6%	13,5% (2012)	13,5%	0-82%	0
NA 97-3463	0,3 % (2012)	0,3%	0,21% (2012)	0,21%	0-11%	0

(*). Incidencia mínima y máxima observada en múltiples ensayos de un surco de 33 mts lineales de caña. (#) Escala de severidad de mosaico entre 0 (ausencia de síntomas, resistente) y 4 (muy susceptible).

4.1. Evaluación del comportamiento de las líneas transgénicas obtenidas frente a la inoculación artificial con el SCMV en invernáculo

El objetivo del ensayo de inoculación artificial fue obtener un resultado temprano del fenotipo de resistencia o susceptibilidad al SCMV en los primeros estadios del desarrollo de la planta. Se decidió analizar primero el comportamiento de las plantas transgénicas frente a un extracto infectivo del SCMV grupo SCE, ya que este grupo viral es el de mayor importancia epidemiológica en la Argentina (Capítulo II). Además se contaban con pocos plantines por evento como para realizar una inoculación independiente con el SrMV, el segundo agente causal del mosaico en importancia en la región, por lo que dicho ensayo no fue incluido en esta Tesis.

Se preparó un extracto infectivo a partir de hojas de caña de azúcar de plantas a campo infectadas con el SCMV (grupo SCE) triturándolas en una licuadora con buffer fosfato y se descartó la presencia del SrMV en el extracto por medio de un análisis de RT-PCR (datos no mostrados). Se utilizó el abrasivo carborundo para frotar la hoja inoculada y así generar pequeñas lesiones necesarias para el establecimiento de la infección (Srisink *et al.*, 1994). El extracto infectivo fue preparado justo antes de cada inoculación (se necesitaron 3 días para inocular todo el material rusticado) y fue conservado en hielo durante el procedimiento. Se inocularon todos los plantines pertenecientes a los eventos putativos. Como control de la eficiencia de infección se utilizaron plantines no transgénicos obtenidos a partir del mismo proceso de cultivo de tejidos que el material transgénico, con la diferencia de que no fueron bombardeados y no se utilizó geneticina (agente selectivo) en el medio de cultivo (ver Capítulo III). No se contó con controles no transgénicos de la variedad CP 72-2086 por haberse contaminado las placas de *Petri* que contenían dicho material. Se inoculó solo la mitad de los plantines no transgénicos, mientras que la otra mitad se utilizó para evaluar si el material regenerado *in vitro* mostraba síntomas de mosaico que pudieran provenir de las cañas utilizadas en el establecimiento del cultivo de tejidos. Este control fue necesario dado que se ha reportado la regeneración de caña de azúcar libre de mosaico a partir de meristemas (Cheong *et al.*, 2012, Ramgareeb *et al.*, 2010), pero no para plantines regenerados a partir de callos.

La aparición de síntomas fue monitoreada visualmente, registrándose los primeros síntomas a los 25-27 días posinoculación. A los 90 días posinoculación se tomó la hoja 0 o +1 y se analizó la presencia del SCMV por la técnica de “Leaf Printing

immunoassay” (ver punto 5 de Materiales y Métodos). Dicha técnica consiste en la impresión de la nervadura central de la hoja en una membrana de nitrocelulosa y el revelado de la misma utilizando un antisuero anti-SCMV, que resulta en la tinción de azul de la impresión correspondiente a plantas infectadas (Fig. 4.1). Se observó en general una baja eficiencia en la infección con el SCMV, que fue del 9% (4/47 plantines) en promedio para los controles no transgénicos de cuatro variedades de caña y del 11% (384/3406 plantines) en promedio para las cañas transgénicas putativas provenientes de 5 variedades de caña (Tabla 4.2). No se observó la aparición de síntomas de mosaico en los controles de infección no transgénicos que no habían sido inoculados, lo que indicaría la ausencia de la enfermedad en el material propagado y regenerado *in vitro*.

Tabla 4.2. Resultado de un ensayo de inoculación artificial de plantas transgénicas para la construcción pUBI VIR3 NptII con un extracto infectivo del SCMV grupo SCE. La infección fue determinada serológicamente. El número de plantines inoculados por evento varió entre 1 y 18 dependiendo de la capacidad de regeneración y multiplicación mostrada por cada evento durante el cultivo *in vitro*.

	Variedad transformada				
	NA 84-3013	NA 84-3419	CP 72- 2086	NA 97-3152	NA 97-3463
Plantas control infectadas / Total	2/13 (15%)	1/6 (17%)	-	0/9 (0%)	1/18 (6%)
Plantas transgénicas infectadas / Total	228/1039 (22%)	98/896 (11%)	5/69 (7%)	4/19 (21%)	49/1383 (3,5%)
Total de eventos evaluados	124	120	14	1	136
Nº de eventos infectados (*)	83 (67%)	59 (49%)	4 (29%)	1 (100%)	28 (21%)
Nº de eventos sanos (#)	41 (33%)	61 (51%)	10 (71%)	0 (0%)	108 (79%)

(*): Se consideró que un evento estaba infectado si tenía al menos un plantín con síntomas de mosaico. (#): Se consideró que un evento estaba sano si ningún plantín mostraba síntomas.

De un total de 395 eventos transgénicos analizados, 175 tuvieron al menos un plantín enfermo (44%), mientras que 220 eventos no se infectaron. Dado que se disponía de un gran número de eventos putativos, se decidió que solo pasarían al ensayo de infección natural a campo aquellos eventos que no mostraron infección.

Plantines *in vitro*



Sistema radicular desarrollado



Rusticación en multimacetas



Estadío de 4 a 6 hojas



Inoculación artificial con extracto infectivo de SCMV



Síntomas de mosaico sana infectada



Inmunoensayo "Leaf preanting" con anti-SCMV

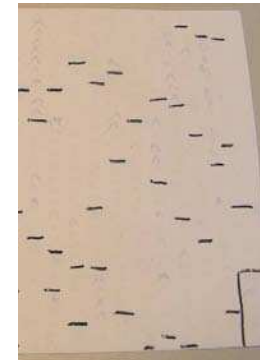


Fig. 4.1. Esquema de rusticación de plantines de caña de azúcar, inoculación con extracto infectivo de SCMV y diagnóstico serológico con un antisuero anti-SCMV.

4.2. Evaluación del comportamiento de las líneas transgénicas obtenidas frente al SCMV bajo condiciones naturales de infección a campo

Con el objetivo de evaluar el desempeño de las plantas transgénicas bajo condiciones naturales de infección a campo, los eventos que no se infectaron en el ensayo de inoculación artificial en invernáculo fueron transplantados a campo en enero de 2011. Se plantaron 1895 plantines transgénicos putativos para la construcción pUBI VIR3 NptII pertenecientes a 226 eventos. Los plantines fueron dispuestos en surcos separados por 1,5 m, a razón de un plantín cada 60 cm. Cada evento fue asignado a una parcela demarcada con una estaca de madera numerada. Todos los eventos originados a partir de una misma variedad de caña fueron dispuestos aleatoriamente dentro de un bloque de surcos contiguos para minimizar el riesgo de confusión entre distintos materiales y facilitar la comparación con los controles no transgénicos. Para aumentar la presión de virus en el ensayo, tanto las borduras como las cabeceras y 3 de los 30 surcos que ocupó el ensayo fueron plantados con plantines con sintomatología de mosaico de la variedad de caña NA 84-3013 que es altamente susceptible al mosaico (Fig. 4.2 y 4.3).

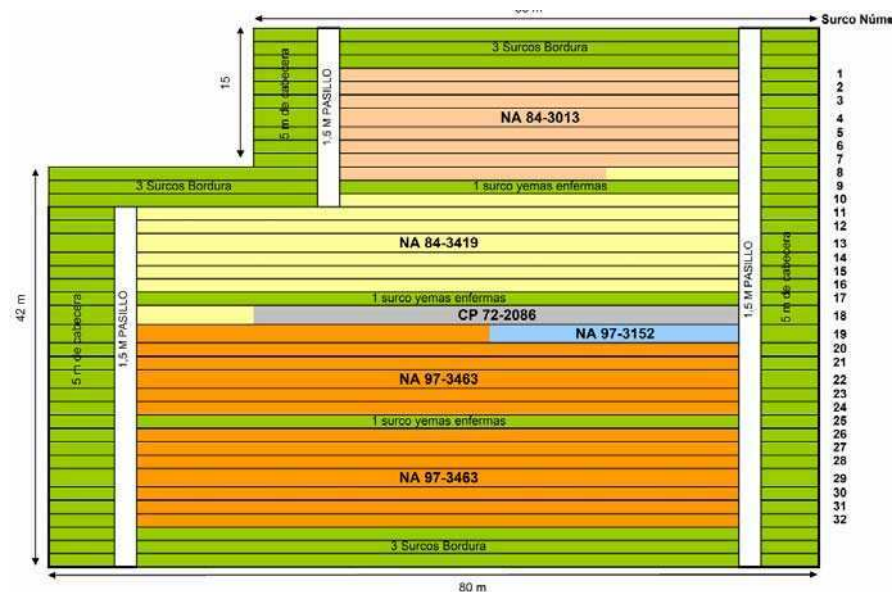


Fig. 4.2. Esquema del ensayo a campo para evaluar el desempeño de los eventos bajo condiciones naturales de infección. Plantines plantados cada 60 cm con una distancia entre surcos de 1,50 m. Cabeceras, borduras y 3 surcos intermedios (color verde) plantados con la variedad NA 84-3013 altamente infectada con mosaico.

Preparación del terreno



Plantines en multimacetas



Plantación 25/01/2011



Desmalezado mecánico



Ensayo al 26/04/2011



Ensayo al 26/11/2011



Fig. 4.3. Imágenes del ensayo a campo para evaluar el desempeño de los eventos de caña de azúcar bajo condiciones naturales de infección.

Debido a que las 5 variedades ensayadas demuestran distintos grados de susceptibilidad al mosaico, los eventos de cada variedad se deben comparar con su respectiva contraparte no transgénica (Tabla 4.1). Se incluyeron dos tipos de controles de infección no transgénicos. Por un lado, se plantaron los controles no transgénicos que no se habían infectado en el ensayo de inoculación en invernáculo, que provenían de material regenerado *in vitro*. Por otro lado, se utilizaron plantines provenientes de una multiplicación en invernáculo a partir de yemas axilares de cañas de campo, en las que se confirmó serológicamente la ausencia del SCMV. Las parcelas control de cada variedad fueron dispuestas aleatoriamente junto con los eventos derivados de las mismas. No se contó con controles no transgénicos regenerados *in vitro* de la variedad CP 72-2086 (por contaminación de las placas de *Petri* correspondientes), ni tampoco con controles no transgénicos multiplicados a partir de yemas axilares de NA 84-3013, ya que todo el material de invernáculo ensayado estaba infectado con el SCMV.

La fecha de plantación fue seleccionada teniendo en cuenta que entre fines del verano y principios de otoño se observa un pico en las poblaciones de áfidos transmisores del virus del mosaico (M. Sc. Analía Salvatore, comunicación personal). A su vez, las plantas jóvenes demuestran una mayor susceptibilidad a la infección con mosaico (Balamuralikrishnan *et al.*, 2003), por lo que la selección de enero como fecha de plantación maximiza la exposición de las plantas transgénicas a la enfermedad.

Con la asistencia del fitopatólogo M. Sc. Alejandro Rago (INTA-IPAVE), especialista en enfermedades de caña de azúcar, y del mejorador de caña Agr. Antonio Agüero (Chacra Experimental Santa Rosa) se realizaron evaluaciones visuales para la presencia de síntomas de mosaico a los 85 y 140 días posplantación y se determinó la presencia de síntomas en cada planta individualmente.

Se registró un leve aumento en los porcentajes de infección en los controles y en las plantas transgénicas si comparamos las dos fechas de evaluación del ensayo (datos no mostrados). A los 85 días posplantación se registraron un total de 226 plantas con síntomas (entre transgénicas y controles), mientras que a los 140 días posplantación es cifra ascendió a 282. En la Tabla 4.3 se resumen los resultados de la infección en la segunda fecha de evaluación.

Tabla 4.3. Resultado de la evaluación visual de sintomatología de mosaico a los 140 días posplantación del ensayo a campo de 226 eventos putativos de caña de azúcar.

	Variedad transformada				
	NA 84-3013	NA 84-3419	CP 72-2086	NA 97-3152	NA 97-3463
Plantas control regeneradas <i>in vitro</i> infectadas / Total	18/27 (67%)	5/13 (38%)	-	0/19 (0%)	4/35 (11%)
Plantas control de yemas infectadas / Total	-	52/66 (78%)	13/22 (59%)	1/18 (5%)	2/45 (4%)
Plantas transgénicas infectadas / Total	82/314 (26%)	75/495 (15%)	5/52 (10%)	3/19 (16%)	21/1015 (2%)
N° de eventos evaluados	41	68	9	1	107
N° de eventos infectados (*)	27 (66%)	29 (43%)	3 (33%)	1 (100%)	15 (14%)
N° de eventos sanos (#)	14 (34%)	39 (57%)	6 (67%)	0 (0%)	92 (86%)

(*): Se consideraron infectados a los eventos que tuvieran al menos una planta con sintomatología de mosaico.

(#): Se consideró que un evento estaba sano si ninguna planta mostraba síntomas.

Aunque no se cuantificó la presencia de los áfidos vectores (por ejemplo por trampeo), se constató su presencia por la observación directa de los mismos durante las evaluaciones y por la aparición de plantas de caña con síntomas distribuidas en todo el ensayo (Fig. 4.4). De la Figura 4.4 se puede obtener una imagen global de la infección presente en el ensayo, en donde cada planta está representada por un cuadrado de color y las plantas pertenecientes a un mismo evento están enmarcadas por un rectángulo. Las plantas infectadas correspondientes a eventos transgénicos fueron coloreadas en rojo y los respectivos controles no transgénicos fueron coloreados en azul. Se observa, como era de esperar, distintos niveles de infección en los controles de las 5 variedades transformadas. Los controles de las variedades NA 84-3013, NA 84-3419 y CP 72-2086 mostraron los niveles más altos de infección (Tabla 4.3). Estas tres variedades recibieron un puntaje de 3-4, 1 y 2 en una escala de susceptibilidad del 0 al 4 utilizada en el programa de mejoramiento genético de la Chacra Experimental (Tabla 4.1), en donde 0 corresponde a variedades resistentes y 4 corresponde a variedades altamente susceptibles (M. Sc. Alejandro Rago, comunicación personal). Por otro lado los controles no transgénicos de las variedades NA 97-3152 y NA 97-3463 se infectaron en baja proporción. Estas variedades habían sido clasificadas como resistentes o levemente

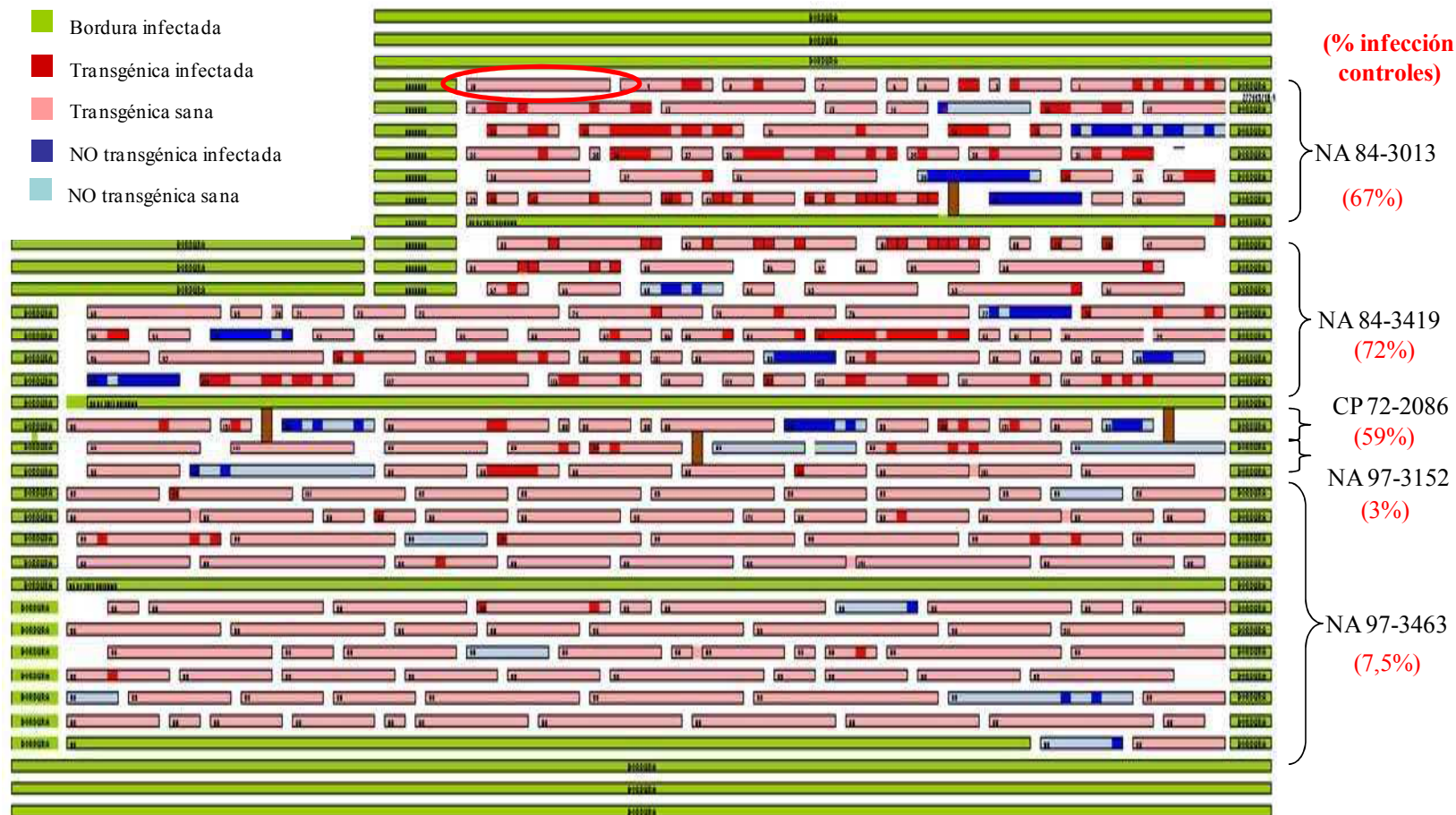


Fig. 4.4. Resultados de la infección en el ensayo a campo de caña de azúcar transgénica bajo condiciones naturales de infección. Los rectángulos representan parcelas conteniendo un evento o un control no transgénico. Cada pequeño cuadrado coloreado representa un planta y se utilizó el código de color detallado en la esquina superior izquierda de la figura.

susceptibles (valores de 0 o 1 en la escalada de susceptibilidad) por el programa de mejoramiento genético de la Chacra Experimental, registrando mayores niveles de infección en los ensayos realizados en el Ingenio Ledesma en Jujuy (Ing. Agr. Cecilia Easdale, comunicación personal).

Se calcularon los intervalos de confianza al 95% de la proporción de plantas sanas correspondientes a las parcelas control no transgénicas, incluyendo tanto a los controles provenientes de regeneración *in vitro* como a las plantas multiplicadas de yemas (Tabla 4.4). Se excluyeron del análisis los eventos que tenían menos de cuatro plantas, dado que en estos casos una menor cantidad de plantas hace que la estimación de la proporción de plantas sanas o enfermas sea imprecisa y por lo tanto poco confiable.

Tabla 4.4. Intervalos de confianza al 95% para la proporción de plantas sanas en controles no transgénicos del ensayo de infección natural a campo.

Variedad	Proporción plantas sanas	Error estándar	n	Límite inferior I.C.(95%)	Límite Superior I.C.(95%)
NA 84 3013	0,33	0,09	27	0,17	0,54
NA 84 3419	0,28	0,05	79	0,18	0,39
CP 72 2086	0,41	0,10	22	0,21	0,64
NA 97 3152	0,94	0,05	18	0,73	1,00
NA 97 3463	0,93	0,03	80	0,84	0,97

En la Tabla 4.5 se clasifican los eventos según si fueron excluidos del análisis (por tener menos de 4 plantas), si no mostraron diferencias significativas en la proporción de plantas infectadas con mosaico respecto de los controles no transgénicos, si mostraron una mayor proporción de plantas sanas o si resultaron completamente sanos.

Se observa que un número considerable de eventos muestran un desempeño mejor que los controles no transgénicos, lo que es particularmente claro para las variedades NA 84-3013, NA 94-3419 y CP 72-2086, las tres variedades más susceptibles al mosaico. Para las tres variedades se obtuvieron en total 34 eventos completamente sanos que podrían corresponder al fenotipo de resistencia descripto anteriormente. A su vez, se obtuvieron 41 eventos de estas tres variedades que muestran proporciones de plantas infectadas significativamente menores a los controles no transgénicos (Tabla 4.5). Estos eventos podrían corresponder al fenotipo de tolerancia o de recuperación. Por otro lado, el único evento evaluado de la

variedad NA 97-3152 se infectó con mosaico, aunque el respectivo control mostró un porcentaje bajo de infección. En la variedad NA 97-3463 también se observaron porcentajes bajos de infección en los controles, por lo que la significancia estadística de los eventos que no se infectaron debe ser interpretada prudentemente (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Evaluación estadística de los eventos según su comportamiento con respecto a los controles no transgénicos en el ensayo de infección natural a campo.

Variedad Transformada	Eventos excluidos del análisis (*)	Eventos con % de infección no significativamente distintos del control	Eventos con % de infección significativamente distintos del control	Eventos completamente sanos
NA 84 3013	11	7	14	8
NA 84 3419	20	1	25	22
CP 72 2086	2	1	2	4
NA 97 3152	0	1	0	0
NA 97 3463	7	13	0	90
Total	40	23	41	124

(*): Se excluyeron del análisis los eventos que tenían menos de cuatro plantas.

Una limitación del presente ensayo es que no se tiene un control de la población de insectos vectores y si estos son virulíferos o no, por lo que no es posible garantizar que todos los eventos o todas las plantas hayan sido expuestos al virus. Por esta razón hay que ser cautos en la interpretación de las diferencias de proporciones de plantas sanas entre los controles y los eventos.

Se observó variabilidad en el desarrollo de las plantas entre eventos de una misma variedad y en varios casos entre plantas del mismo evento también. Este hecho, que ya fue observado en otros proyectos de caña de azúcar transgénica en la Chacra Experimental, enfatiza la necesidad de una completa evaluación fenotípica de los eventos desarrollados para seleccionar aquellos eventos que conserven el desempeño agronómico de la variedad transformada.

4.3. Confirmación de la transgénesis de un subset de los eventos putativos a campo por PCR

Dado el gran número de posibles eventos transgénicos obtenidos en el laboratorio y luego transplantados a campo, se decidió confirmar la transgénesis sólo en aquellos eventos que tuvieran un buen desempeño a campo. Se tomaron muestras de hoja de 87 eventos putativos que no resultaron infectados por mosaico y que

además tuvieron un adecuado desempeño agronómico (buen porte, vigor y macollaje), los cuales serían transplantados mas adelante a un segundo ensayo a campo, que se desarrollará por fuera de los objetivos de esta Tesis. Se preparó un extracto crudo a partir de las muestras de hoja y se amplificó por PCR un fragmento de 580 pb de la construcción pUBI VIR3 NptII de acuerdo al protocolo descrito en el punto 10.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 4.5 se observan los productos de amplificación para un grupo de muestras del total analizado. Se observó un adecuado rendimiento de producto de amplificación para la gran mayoría de las muestras, lo que confirma que el protocolo de extracción rápida de ácidos nucleicos no solo es apto para la detección de virus en hojas de caña infectadas, sino que también permite la amplificación de secuencias insertadas en el genoma vegetal. Se confirmó la transgénesis en 86 de los 87 eventos putativos analizados, evidenciando un porcentaje muy bajo de escapes (1,1%) en los eventos resistentes a mosaico y de buen desempeño agronómico.

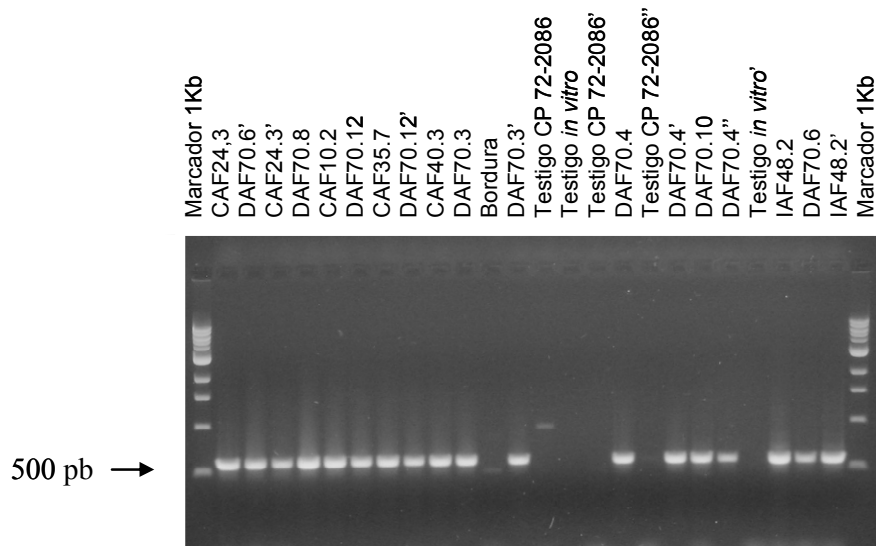


Fig. 4.5. Análisis de los posibles eventos transgénicos de caña de azúcar por PCR. Se amplificó por PCR un fragmento de 580 pb de la construcción pUBI VIR3 NptII utilizando los iniciadores Oli142 y Oli144. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa 1% con BrEt. Las siglas “CAF”, “DAF” y “IAF” indican que los eventos provienen de las variedades NA 84-3419, CP 72-2086 y NA 97-3463 respectivamente. Bordura: plantas no transgénicas de la variedad NA 84-3013; Testigo CP 72-2086: plantas no transgénicas multiplicadas de yemas de campo; Testigo *in vitro*: plantas no transgénicas de la variedad CP 72-2086 regeneradas *in vitro*; (:): duplicado; (’): triplicado.

4.4. Análisis de la expresión del casete de resistencia a virus por RT-PCR

Con el objetivo de determinar si el casete de resistencia a virus del plásmido pUBI VIR3 NpTII insertado en eventos de caña transgénica se transcribe activamente, se analizó por RT-PCR la presencia de ARN mensajero de dicho casete en un grupo de eventos pertenecientes a las 5 variedades de caña transformadas. Para ello se extrajo ARN total por el método de Trizol y se amplificó por RT-PCR en un solo paso con los iniciadores Oli1 (hibrida en el primer exón de la ubiquitina) y Oli92 (hibrida en el gen P3 del SCMV) según lo descrito en el punto 10.2 de Materiales y Métodos. Estos iniciadores dan lugar a un fragmento de 418 pb a partir de ARN mensajero luego del “splicing” del primer intrón de la ubiquitina, mientras que dan lugar a un fragmento de 1,4 Kb. a partir de ARN inmaduro o a partir de ADN de la construcción pUBI VIR3 NpTII. Las condiciones de amplificación fueron seleccionadas para favorecer la amplificación del fragmento de 418 pb (30 seg. de extensión en el perfil de termociclado). Se incluyó además para todas las muestras un control sin la enzima Transcriptasa Reversa para confirmar que el producto de amplificación se generaba a partir de del cADN sintetizado del ARNm y no a partir de posible ADN contaminante. En la Figura 4.6 se observa que de los 11 eventos analizados se obtiene el fragmento de 418 pb esperado, confirmando la ocurrencia de transcripción a partir del casete de resistencia a virus.

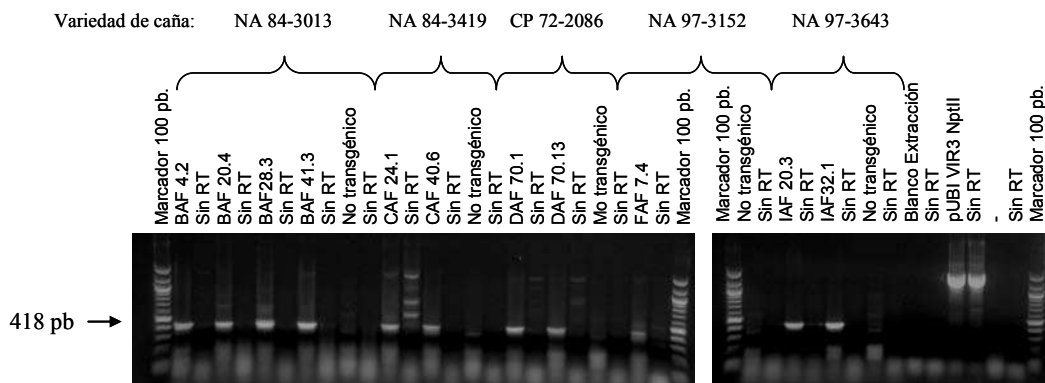


Fig. 4.6. Análisis de la expresión del casete de resistencia a virus en eventos transgénicos de caña por RT-PCR. Se amplificó a partir de cDNA obtenido de RNA total utilizando los iniciadores Oli1 y Oli92 que dan lugar a un fragmento de 418 pb luego del “splicing” del primer intrón de la Ubiquitina. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa 1%. Para cada muestra se incluyó el respectivo control sin transcriptasa reversa (“Sin RT”) que fue sembrado a la derecha de la misma. -, control negativo de RT-PCR sin templado.

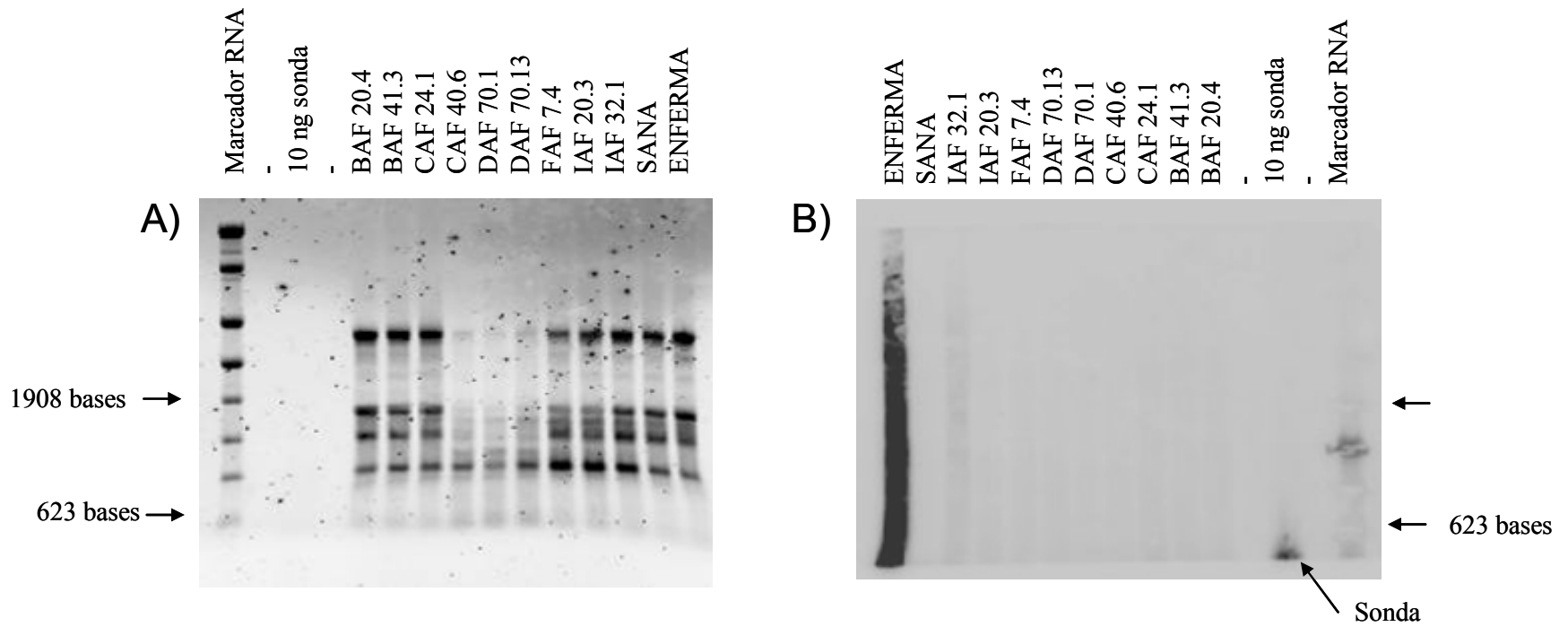


Fig. 4.7. “Northern blot” de líneas transgénicas de caña que expresan la construcción pUBI VIR3 NptII. Electroforesis de 6 μ g de ARN total de caña de azúcar corrida en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt (A). (B) “Northern blot” del gel A utilizando una sonda correspondiente a un fragmento de 409 pb del gen P3 del SCMV clonado en pUBI VIR3 NptII. La membrana fue expuesta por 48hs y la autoradiografía fue revelada utilizando el equipo Typhoon 9400 (GeHealthcare). ENFERMA, planta de la variedad NA 84-3013 con síntomas de mosaico; SANA, planta de la variedad NA 97-3463 libre de mosaico.

4.5. Detección del ARN mensajero transcrito a partir del casete de resistencia a virus en cañas transgénicas por “Northern blot”

Con el objetivo de determinar si se acumulan los transcritos generados a partir del casete de resistencia a virus del plásmido de transformación pUBI VIR3 NptII en las líneas transgénicas obtenidas, se realizó un “Northern blot” a partir de 6 µg de ARN total purificado de 9 eventos de caña de azúcar. En los eventos en que se desencadena correctamente el silenciamiento génico a partir del casete de resistencia viral se espera que no se acumulen niveles detectables de ARN mensajero. Se siguió el protocolo descrito en el punto 10.4 de Materiales y Métodos y se hibridó la membrana con una sonda de 409 pb marcada con fósforo radiactivo correspondiente al fragmento del gen P3 del SCMV clonado en el plásmido pUBI VIR3 NptII. La Figura 4.7.A corresponde al gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, en donde se observa el ARN total de caña separado electroforéticamente. Las calles con los eventos CAF 40.6, DAF 70.1 y DAF 70.13 muestran bandas más tenues ARN, lo que indica que se sembró menor cantidad de ARN total que en las demás calles. En la Figura 4.7.B se observa la membrana de nitrocelulosa hibridada con la sonda radiactiva y expuesta por 48 hs. La transcripción a partir del casete de resistencia a virus y su correcto procesamiento por “splicing” generaría un transcrito de 2.1 Kb mas la cola de poli A. No se observan bandas discretas en la membrana, exceptuando una banda correspondiente a 10 ng de sonda corridos para confirmar que la transferencia y la hibridación funcionan adecuadamente. La ausencia de una banda correspondiente al ARN mensajero maduro implicaría que se encuentra en niveles por debajo del límite de detección de la prueba y es consistente con la hipótesis de que la construcción desencadena el silenciamiento génico y no se acumulan niveles estables de transcrito. El control correspondiente a una planta enferma con mosaico da lugar a un fuerte chorreado sin bandas discretas, que podría deberse a la presencia ARN viral parcialmente degradado. Ingelbrecht y colaboradores (1999) reportaron la presencia de un chorreado similar a lo observado en la Fig. 4.7.B en experimentos de “Northern blot” de plantas de caña enfermas con el SrMV, en donde se utilizó como sonda el gen de la proteína de cápside y el 3’UTR del mismo virus.

4.6. “Northern blot” para detectar ARN pequeños generados partir del casete de resistencia a virus en cañas transgénicas.

Debido a que se considera que la presencia de siRNAs derivados del transgén es un indicativo del establecimiento del silenciamiento génico (Dunoyer *et al.*, 2010a), se realizó un experimento de “Northern blot” para detectar la presencia de ARNs pequeños generados a partir del casete de resistencia a virus. Para ello se siguió el protocolo descrito en el punto 10.5 de Materiales y Métodos, sembrando en el gel de polyacrilamida 17,5% el máximo volumen de muestra posible, lo que resultó en un rango de 13 a 29 μg de ARN total corrido por calle. Se utilizó como sonda el mismo fragmento del gen P3 del SCMV utilizado para en “Northern blot” de ARN mensajero. En la Figura 4.8.B se observan bandas que corresponderían a ARNs pequeños solo en la planta control enferma con mosaico y en los eventos IAF 32.1 y IAF 20.3. Estas bandas se encuentran cercanas al límite de detección del protocolo ensayado, por lo que teóricamente sería posible detectar ARNs pequeños en las demás muestras mejorando las condiciones experimentales. En la planta enferma se volvió a detectar un fuerte chorreado para bandas de mayor peso molecular.

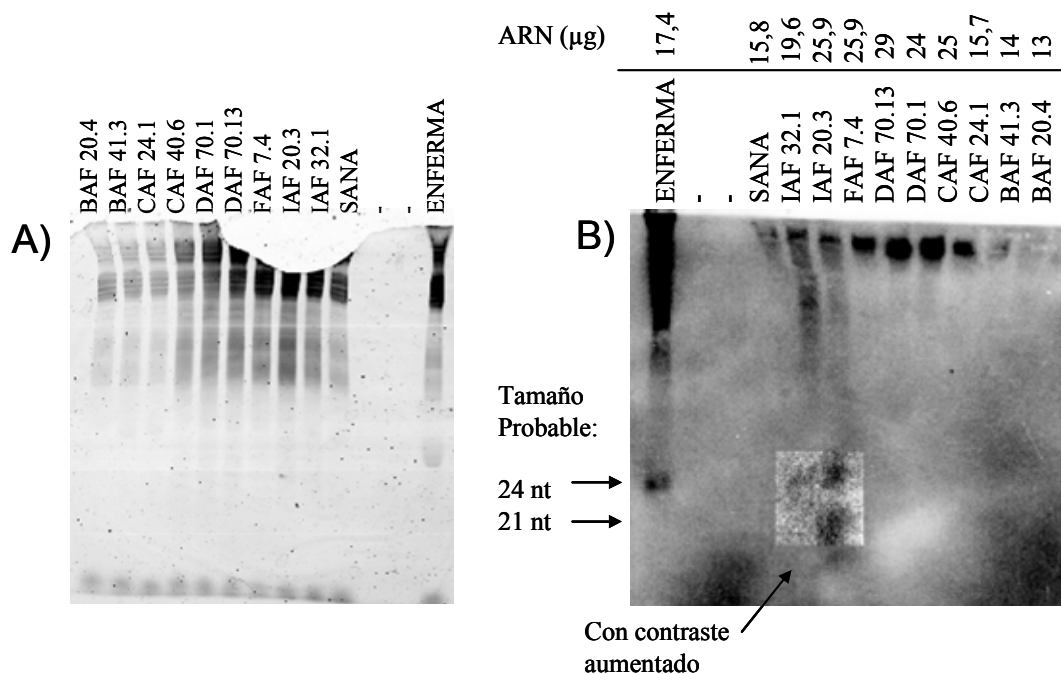


Fig. 4.8. “Northern blot” de ARN pequeños presentes en diversas líneas transgénicas de caña. Electroforesis en gel de poliácridamida al 17,5% de 13-29 μg de ARN total de caña de azúcar y teñido con BrEt (A). El ARN fue transferido a una membrana de nylon e hibridada con una sonda de 409 pb correspondiente a un fragmento del gen P3 del SCMV clonado en pUBI VIR3 NptII (B). La membrana fue expuesta por 48hs y la autoradiografía fue revelada utilizando el equipo Typhoon 9400 (GeHealthcare). ENFERMA, planta de la variedad NA 84-3013 con síntomas de mosaico; SANA, planta de la variedad NA 97-3463 libre de mosaico.

IV. Discusión y Conclusiones

En el presente capítulo se describe la caracterización inicial a nivel fenotípico y molecular de eventos de caña de azúcar portando un transgén de resistencia a mosaico. Se rusticaron 395 eventos putativos de caña con un número variable de plantines de cada evento, que dependió de la capacidad de regeneración del callo resistente a geneticina que dio origen al evento. Esta variabilidad en el número de plantines por evento (entre 1 y 18) representó una limitante a la hora de evaluar el desempeño de cada evento al ser desafiado con el virus del mosaico en un ensayo de inoculación artificial o en un ensayo de infección natural a campo. A pesar de esta limitación, se consideró oportuno hacer una caracterización preliminar del material disponible frente al mosaico.

En el ensayo de inoculación artificial con el SCMV en invernáculo se eligió un protocolo de inoculación que utiliza carborundo como abrasivo para generar pequeñas lesiones en las hojas, que son mojadas con un extracto de hojas infectivo (Koike y Gillaspie, 1989). La eficiencia de infección fue baja, con un promedio para las cinco variedades de 9% y 11% de infección en los controles no transgénicos y en los eventos respectivamente (Tabla 4.2). Joyce y colaboradores (1998) reportaron el uso de una almohadilla abrasiva junto con carborundo para inocular con el SCMV las plantas de caña transgénicas obtenidas, método que fue desarrollado por Srisink y colaboradores (1994) y resulta en eficiencias altas de infección. Por su parte, Ingelbrecht y colaboradores (1999) reportaron eficiencias de inoculación superiores a 95% en controles de caña no transgénica al usar tierra de diatomeas como abrasivo y hojas de sorgo enfermas con el SCMV como fuente de inóculo, utilizadas debido al alto título viral de las mismas. Las condiciones de las plantas antes y después de la inoculación, incluyendo la fertilización, temperatura, luminosidad y humedad del suelo, afectan al éxito de la transmisión del virus. La inoculación suele fallar en plantas sometidas a altas temperaturas y/o alta luminosidad (Koike y Gillaspie, 1989). Es posible que las altas temperaturas registradas en las 3 fechas de inoculación (32,2°, 34,3° y 36,3°C) y alta radiación que habitualmente se registran en el mes de Septiembre en la Chacra Experimental hayan interferido en la inoculación artificial. Además, el invernáculo donde se realizó el ensayo de inoculación no posee sistema de refrigeración, por lo que las temperaturas a la que son sometidas las

plantas dependen de las condiciones climáticas. Se decidió descartar todo evento que tuviera al menos un plantín infectado, con lo cual se seleccionaron 226 eventos para ser plantados en un ensayo a campo, lo que representa un número considerable de eventos. Con este criterio de selección se descartaron eventos con un posible fenotipo de recuperación (Ingelbrecht *et al.*, 1999).

En enero de 2011 se plantó un ensayo a campo con parcelas no replicadas, en el que cada evento ocupaba una única parcela conteniendo entre 1 y 18 plantas provenientes del ensayo de invernáculo. La fecha de plantación fue elegida para maximizar la infección con mosaico ya que coincide el pico de poblaciones de áfidos (M. Sc. Analía Salvatore, comunicación personal) con el momento de mayor susceptibilidad de la caña (Balamuralikrishnan *et al.*, 2003) y así poder evaluar adecuadamente el fenotipo que se desea conferir con el transgén. A su vez, el ensayo fue rodeado de caña de azúcar altamente infectada con mosaico de manera de generar una mayor presión viral, estrategia similar a la empleada por Gilbert y colaboradores (2005) que ubicaron el ensayo de cañas transgénicas resistentes al SCMV próximo a plantaciones de maíz con síntomas de mosaico. En la Figura 4.4 se puede observar que hay plantas con síntomas (cuadrados rojos) diseminados por todo el ensayo aunque no en forma homogénea, debido probablemente a la diferencia en susceptibilidad al mosaico en los cinco genotipos ensayados (Tabla 4.1). Esto indica que hubo una población activa de áfidos presente en el ensayo a campo que funcionó como vector de la enfermedad, aunque no es posible inferir si los pulgones se distribuyeron homogéneamente en todo el ensayo. Se realizaron observaciones visuales para la presencia de sintomatología de mosaico, técnica simple y rápida que sin embargo ya había demostrado tener una alta correlación con resultados de RT-PCR en el muestreo a gran escala (Capítulo II) y con resultados de inmunoensayos de “leaf printing” (datos no mostrados).

La infección con mosaico en los controles no transgénicos de las variedades NA 84-3013, NA 84-3419 y CP 72-2086 fue mayor al promedio de sus respectivos eventos (Tabla 4.3). Estas variedades mostraron un número considerable de eventos con porcentajes de infección inferiores a los controles no transgénicos calculando un intervalo de confianza al 95% para la significancia estadística (Tabla 4.5). En total 151 eventos de 4 variedades permanecieron sanos después del ensayo de inoculación artificial y del ensayo a campo. Una limitación del presente ensayo es que no se tiene un control de la población de insectos vectores y si estos son virulíferos o no, por lo

que no es posible garantizar que todos los eventos o todas las plantas hayan sido expuestos al virus. Por esta razón hay que ser cautos en la interpretación de las diferencias de proporciones de plantas sanas entre los controles y los eventos.

La falta de repeticiones de los eventos representa una limitación al análisis estadístico de los datos de infección (Dra Mónica Balzarini, comunicación personal). Sin embargo, luego de un año de multiplicación a campo generalmente se cuenta con suficientes tallos maduros para plantar un ensayo en bloques completamente aleatorizados con 3 o más repeticiones (Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009), que resultaría en datos de infección adecuados para un análisis estadístico robusto. Dicho ensayo, que incluirá la evaluación de 86 eventos promisorios (no se infectaron con mosaico y mostraron un buen desempeño agronómico) queda por fuera de los objetivos de esta Tesis.

La desventaja de la plantación en verano es que el cultivo no completa un ciclo anual de crecimiento de la misma manera que la mayoría de los lotes comerciales (habitualmente plantados entre Agosto y Septiembre), por lo que los parámetros productivos no pueden ser medidos en dicho ensayo. Sin embargo, se puede obtener una estimación del desempeño agronómico comparando las parcelas transgénicas con las no transgénicas por su porte, vigor y macollaje, criterios visuales utilizados por los mejoradores en el programa de mejoramiento de la Chacra Experimental. El cultivo de tejidos y/o la transformación genética puede ser fuente de variabilidad, lo que resulta en que un porcentaje de los eventos transgénicos de caña obtenidos muestran fenotipos distintos a los de la variedad madre transformada (Arencibia *et al.*, 1999, Carmona *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009, Vickers *et al.*, 2005b, Zucchi *et al.*, 2002). En línea con lo reportado por otros autores, en el presente estudio se observó que al menos la mitad de los eventos testeados mostraban menor vigor, desarrollo o tallos más delgados que las parcelas plantadas con los controles no transgénicos propagados a partir de yemas de campo. Otra característica observada en ciertos eventos, que ya había sido registrada en plantas transgénicas tolerantes a herbicida desarrolladas en la Chacra Experimental, es una mayor susceptibilidad a la enfermedad de la roya (*Puccinia melanocephala* H. & P. Sydow). Estas observaciones remarcan la necesidad de evaluar un número grande de eventos bajo las condiciones habituales de crecimiento del cultivo para seleccionar aquellos que expresen adecuadamente el fenotipo conferido por el

transgén y que conserven las características agronómicas del genotipo transformado (Gilbert *et al.*, 2005, Gilbert *et al.*, 2009).

Debido al gran número de eventos ensayados en invernáculo y a campo, se confirmó la transgénesis solo en aquellos eventos que mostraron resistencia a mosaico y buen desempeño agronómico. De 87 eventos putativos analizados, 86 resultaron en un producto de amplificación por PCR con iniciadores específicos para la construcción pUBI VIR3 NptII, evidenciando un bajo porcentaje de escapes (1,1%) en esta etapa de la selección de eventos.

Se confirmó por RT-PCR la transcripción de ARN mensajero a partir del casete de resistencia a virus en un número seleccionado de eventos de las cinco variedades de caña transformadas (Fig. 4.6). Sin embargo, cuando los mismos eventos son analizados por “Northern blot” con una sonda que hibrida al ARN mensajero del casete de resistencia viral, no se observa ninguna banda discreta de alto peso molecular (Fig. 4.7). Esto indicaría que no hay una acumulación estable del transcripto o que se acumula en cantidades inferiores al límite de detección de la prueba. Este resultado es esperable si la construcción tipo horquilla presente en pUBI VIR3 NptII desencadena adecuadamente el silenciamiento génico (Prins *et al.*, 2008).

La presencia de siRNAs provenientes de la construcción tipo horquilla de pUBI VIR3 NptII representaría una clara evidencia de que se desencadena el silenciamiento a partir de las secuencias virales allí incluidas. Para detectar dichos siRNA se realizó un “Northern blot” para ARNs pequeños (gel de polyacrilamida 17,5%) y se utilizó como sonda radiactiva (^{32}P) el fragmento del gen P3 clonado en el plásmido pUBI VIR3 NptII. En la Fig. 4.8 se observa una banda débil de un tamaño estimado de 24 nucleótidos solo para la planta control infectada con mosaico y para el evento IAF 32.1. En el evento IAF 20.3 se observan dos bandas débiles que se estima que corresponderían a siRNAs de 21 y 24 nucleótidos respectivamente debido a la clara separación electroforética de las mismas (Dunoyer *et al.*, 2010b). Estas bandas se encuentran cercanas al límite de detección del protocolo ensayado, por lo que teóricamente sería posible detectar ARNs pequeños en las demás muestras mejorando las condiciones experimentales. Dicho experimento no se pudo repetir por limitaciones de tiempo durante la estadía del doctorando en el CICVyA, en donde fueron realizados los ensayos (la Chacra Experimental no cuenta con sala de material radiactivo).

Cabe notar que la acumulación de siRNA provenientes de una construcción tipo horquilla es condición necesaria pero no suficiente para generar un fenotipo de resistencia. Shimizu y colaboradores (2011) reportaron la obtención de plantas transgénicas de arroz que expresaban construcciones tipo horquilla generadas a partir de todos los genes del *Rice stripe virus* (RSV). A pesar de que todas las líneas transgénicas acumulaban siRNAs específicos de cada construcción, observaron un fenotipo de resistencia para dos de los genes virales, un fenotipo de resistencia moderada para otros dos genes virales y un fenotipo susceptible para los restantes 3 genes virales utilizados en la construcción. En un estudio similar, Lin y colaboradores (2011) analizaron la eficacia de construcciones generadas a partir de 10 fragmentos que cubren todo el genoma del begomovirus *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) para conferir resistencia vía el desencadenamiento de silenciamiento génico y encontraron que dos construcciones otorgan resistencia, otras dos construcciones retrasan la aparición de síntomas, mientras que el resto de las construcciones no afectaban a la infección viral.

El fenotipo de resistencia o tolerancia en una planta conferido por un transgén de resistencia resulta de una compleja interacción de varios factores. Entre ellos figuran la identidad de secuencia entre el transgén y el virus infectante, la región viral seleccionada para ser incluida en la construcción de resistencia, los efectos del cultivo de tejidos y el silenciamiento de transgenes en las plantas transformadas, la susceptibilidad natural al virus del genotipo de planta transformado, la patogenicidad del virus y su capacidad de interferir con el mecanismo de silenciamiento génico a través de supresores del silenciamiento virales, la interacción con el sistema de inmunidad innata presente en las plantas y posiblemente otros factores (Ali *et al.*, 2010, Bucher *et al.*, 2006, Harrison, 2002, Prins, 2003, Prins *et al.*, 2008, Shimizu *et al.*, 2011, Voinnet, 2005). Debido a la complejidad de estas interacciones, resulta de importancia evaluar un número grande de eventos bajo condiciones controladas y bajo las condiciones en las que se desarrolla el cultivo habitualmente para realizar una adecuada selección de aquellos eventos que expresan el fenotipo de resistencia deseado y conservan las características agronómicas del genotipo transformado.

Conclusiones Generales

V. Conclusiones Generales

La caña de azúcar es un cultivo de importancia económica mundial ya que produce la mayor parte del azúcar de consumo y además se perfila como uno de los cultivos más eficientes para la producción de bioenergía. La producción de caña de azúcar se ve limitada por factores abióticos y bióticos. Los programas de mejoramiento genético buscan incorporar mejores características agronómicas y sanitarias a genotipos adaptados a cada agroecosistema, aunque la caña, un híbrido interespecífico de genoma aneuploide y aloploiploide, representa un reto importante a las técnicas clásicas de mejoramiento. La Biotecnología, a través del desarrollo de plantas transgénicas, se ha convertido en una herramienta poderosa para incorporar genes y caracteres de interés agronómico, saltando las barreras reproductivas que limitan la base del germoplasma disponible para los mejoradores.

Entre las enfermedades virales de caña de azúcar, el mosaico es la de mayor importancia a nivel mundial, siendo causada por los potyvirus SCMV y SrMV. Aunque existen fuentes de resistencia a la enfermedad dentro del germoplasma del género *Saccharum*, muchas variedades de caña de azúcar se utilizan a nivel comercial por su buen desempeño agronómico, aunque muestran distintos grados de susceptibilidad a la enfermedad. La transgénesis, explotando el mecanismo de silenciamiento génico, podría subsanar esta deficiencia sanitaria y aumentar la vida útil de las variedades desarrolladas.

En la presente Tesis se propusieron los siguientes objetivos: 1) Desarrollar un protocolo rápido y económico para la amplificación y secuenciación de secuencias virales a partir de muestras de caña de azúcar con sintomatología de mosaico, 2) Realizar un amplio muestreo de los agentes causales del mosaico en la Argentina y países limítrofes y realizar una caracterización de la diversidad genética a nivel de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína de cápside, 3) Clasificar los agentes causales del mosaico en grupos discretos y seleccionar las regiones virales más conservadas para ser utilizadas en el diseño de un transgén de resistencia amplia y duradera, 4) Obtener plantas de caña de azúcar transgénicas que expresen el transgén de resistencia y evaluar su desempeño en un ensayo de infección artificial en invernáculo y en un ensayo a campo bajo condiciones naturales de infección.

En el Capítulo I se describe el desarrollo de un protocolo de extracción rápida de ácidos nucleicos a partir de hojas de caña de azúcar con sintomatología de mosaico. Se obtuvo un protocolo simple, económico, que minimiza los riesgos de contaminación cruzada y permite a una persona extraer hasta 200 muestras por día. A partir de los extractos crudos de hoja es posible amplificar ARN viral por RT-PCR en un solo paso o amplificar secuencias de ADN insertadas en el genoma vegetal (transgenes). Los productos de amplificación se pueden secuenciar directamente con los iniciadores utilizados en la amplificación. El protocolo desarrollado resultó en una publicación original (Gómez *et al.*, 2009) y viabilizó un estudio a gran escala de la variabilidad genética del mosaico en la región. Dicho protocolo puede ser de gran utilidad a la comunidad de investigadores que trabajan en aspectos relacionados con la biología molecular de la caña de azúcar.

En el Capítulo II se describe el muestreo y análisis por RT-PCR para la presencia del SCMV y el SrMV de 567 plantas con síntomas de mosaico pertenecientes a 102 genotipos distintos de caña colectadas en 104 sitios de muestreo en Argentina, Bolivia, Uruguay y Paraguay. Se determinó que el principal agente causal del mosaico en la región es el SCMV (94,5% de las muestras), con un porcentaje bastante menor del SrMV (3,4% de las muestras) y niveles bajos de coinfección (0,5%). La secuenciación de un fragmento del gen de la proteína de cápside de las muestras virales y su análisis filogenético permitió clasificarlas en cuatro grupos discretos, utilizando como valor de corte una identidad de secuencia de 0,91: SrMV grupo HS y dentro del SCMV grupos SCE, MZ y W, este último un nuevo grupo propuesto dentro de la clasificación del SCMV. La secuenciación de un fragmento del gen P3 de un subset de muestras representativo de todos los grupos virales permitió identificar una región evolutivamente conservada de interés para el diseño de un transgén de resistencia. Se secuenció además el genoma completo de dos muestras del SCMV, una perteneciente al grupo SCE y otra al grupo W, lo que permitió una caracterización más profunda de los virus estudiados. Las secuencias virales obtenidas fueron depositadas en GenBank, totalizando 501 secuencias. En conclusión, fue posible clasificar los agentes causales del mosaico en grupos discretos y en vistas de diseñar una construcción de resistencia que contemple la variabilidad genética de los mismos.

En el Capítulo III se describe el diseño y obtención de una construcción para desencadenar en cañas transgénicas el silenciamiento génico contra los virus del

mosaico. Se eligió una construcción tipo horquilla en la que se clonan tres fragmentos de cDNA viral dispuestos en dirección sentido y antisentido a ambos lados de un intrón. Este tipo de construcciones han demostrado ser las más eficientes para desencadenar el silenciamiento génico y se espera que confieran una resistencia amplia y duradera contra el mosaico. Este representa el primer informe de una construcción diseñada para otorgar resistencia al SCMV y SrMV simultáneamente en caña de azúcar. Utilizando el gen selector NptII en experimentos de transformación biolística se obtuvieron 395 eventos putativos a partir de cinco variedades de caña que presentan diferentes niveles de susceptibilidad a la enfermedad. Se seleccionaron variedades que tuvieron importancia económica y cuya adopción decayó por la susceptibilidad al mosaico o variedades que están cobrando importancia económica pero que son susceptibles. En conclusión, fue posible obtener cañas transgénicas que incorporaron el transgén de resistencia, aunque la eficiencia de transformación fue variable entre los genotipos dependiendo principalmente del tipo y la calidad de callos que generaban.

En el Capítulo IV se describe la caracterización fenotípica de los eventos obtenidos en el laboratorio. Se rusticaron en invernáculo un gran número de plantines pertenecientes a 395 eventos putativos, registrándose 3530 plantines sobrevivientes a la aclimatación en tierra. Se realizó un ensayo de inoculación artificial con un extracto infectivo de SCMV (grupo SCE). Por motivos que no están del todo claros, la eficiencia de infección fue baja, 9% en promedio para los controles no transgénicos y de 11% en promedio para los transgénicos, por lo que no se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Se decidió plantar en un ensayo a campo todos los eventos que no se infectaron en el ensayo de inoculación artificial. El ensayo fue plantado con parcelas no replicadas que contenían entre 1 y 18 plantas transgénicas por evento, según la capacidad de regeneración que había demostrado cada evento en el cultivo de tejidos. El ensayo fue rodeado de plantas de caña altamente infectadas con mosaico y se seleccionó una fecha de plantación (enero) para que coincida el pico máximo de población de áfidos vectores con el estadio joven de la caña, cuando es más susceptible a la enfermedad. Se registró la aparición de síntomas visuales en cada planta en dos fechas. Se evaluó la proporción de plantas sanas en los controles no transgénicos y la proporción de plantas sanas para cada evento, que fue comparado con el control no transgénico correspondiente. Dos variedades mostraron niveles de infección muy bajos en los

controles no transgénicos por lo que es difícil extraer conclusiones con significancia estadística. En las tres variedades más susceptibles transformadas (NA 84-3013, NA 84-3419 y CP 72-2086) se observaron un total de 9 eventos con proporción de plantas enfermas no significativamente distinta de los controles, 41 eventos con una proporción estadísticamente menor a los controles y 34 eventos resistentes al mosaico bajo las condiciones ensayadas. La multiplicación a campo del material sembrado permitirá la implementación en futuras campañas de ensayos con réplicas y con un mayor poder de discriminación a nivel estadístico.

En una caracterización molecular de un subset de eventos, se determinó por RT-PCR que hay transcripción activa a partir del casete de resistencia viral, pero que no se acumula en niveles detectables por “Northern blot”. Se realizó un “Northern blot” para detectar siRNA generados a partir del casete de resistencia pero solo se pudo detectar bandas débiles del tamaño esperado para 2 de los 9 eventos ensayados. Sería conveniente repetir este experimento con las condiciones optimizadas para obtener señales más robustas a partir de las muestras y confirmar el desencadenamiento del silenciamiento génico.

Los resultados reportados en la presente Tesis han contribuido significativamente al conocimiento sobre los agentes causales del mosaico de la caña de azúcar y su diversidad genética en la región. La estrategia de transgénesis adoptada y los eventos obtenidos han demostrado resultados promisorios, que sin embargo requieren de una mayor caracterización a nivel fenotípico y molecular para identificar eventos resistentes al mosaico y que conserven las características agronómicas del genotipo transformado.

Maximiliano de Vos

John L. J.

Max Gómez

Materiales y Métodos

1. Colección de muestras a campo

Se tomaron muestras de caña de azúcar de entre tres y seis meses de edad con sintomatología de mosaico. La muestra consiste en una sección de aproximadamente 20 cm de la porción basal de la lámina de la hoja 0 o +1 (ésta última es la primer hoja con la lígula completamente visible). Las muestras de hoja se conservan a 4°C desde el momento de la recolección hasta su llegada al laboratorio, en donde son procesadas de acuerdo al protocolo rápido de extracción viral y el tejido restante se conserva a -80°C. El tiempo máximo transcurrido entre la recolección de las muestras y su procesamiento o almacenamiento en el freezer fue de 7 días.

2. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos totales se utilizó el protocolo de CTAB modificado (Doyle y Doyle, 1987). Se parte de 0,1 g de hoja de caña de azúcar triturada en un mortero preenfriado a -80 °C y se realizan dos extracciones sucesivas 1:1 vol/vol con cloroformo/isoamílico (24:1). El precipitado final se resuspende en 40 µl de agua libre de nucleasas. El ADN obtenido fue utilizado como templado para las reacciones de amplificación por PCR.

La extracción de ARN total se realizó utilizando el RNeasy Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen Sciences, Maryland, EEUU). Alternativamente, se utilizó el protocolo de Trizol (Invitrogen, Life Technologies Corporation, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se parte de 0,1 g de hoja de caña de azúcar congelada y molida y el ARN extraído se resuspende en 40 µl de agua libre de RNasas.

3. Protocolo de RT-PCR de fragmentos del genoma viral

3.1. Amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside del SCMV y SrMV para diagnóstico

Se amplificaron fragmentos de 850-900 pb correspondientes al gen de la proteína de cápside del SrMV con los iniciadores SrMV F3 y SrMV R3 (Yang y Mirkov, 1997) y del SCMV con los iniciadores SCMV F4 (Alegria *et al.*, 2003) y SCMV R3 (Yang y Mirkov, 1997). La reacción de RT-PCR (40 µl volumen final) contenía 2 µl de muestra del protocolo rápido de extracción viral (ver punto 4), 4 µl de Buffer PCR 10 X -KCl +Tween (Tris-base 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 8,8), una concentración final de 0,2 mM de dNTPs, 1 µM de cada iniciador, 2 mM de MgCl₂, 1 unidad de Taq DNA Polimerasa, 16 unidades de inhibidor de ribonucleasas Ribolock y 16 unidades de la transcriptasa reversa del M-MuLV “RevertAid H minus”. Para los iniciadores específicos del SCMV y del SrMV el programa de termociclado fue el siguiente: 42°C por 45 min., 95°C por 2 min., 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. y 72°C por 1 min. y una extensión final a 72°C por 5 min. Todas las enzimas fueron compradas a Fermentas, Lituania. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT), EE.UU.

Alternativamente se utilizaron los iniciadores degenerados oligo1n y oligo2n que detectan los potyvirus que infectan poáceas (Marie-Jeanne *et al.*, 2000) mediante la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside de aproximadamente 330 pb. Se utilizaron las mismas condiciones de amplificación con el siguiente programa de termociclado: 42°C por 45 min., 95°C por 2 min., 45 ciclos

de 94°C por 45 seg., 50°C por 2 min., 72°C por 50 seg., y una extensión final a 72°C por 5 min.

Los controles positivos del SrMV fueron provistos por el Dr. A. Castagnaro (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán) y los controles positivos de SCMV fueron colectados en la Chacra Experimental y confirmados serológicamente con un antisuero policlonal provisto por el Dr. M. Grisham (USDA, ARS Houma, Luisiana).

3.2. Amplificación de los genes HC-Pro y P3 del SCMV y del SrMV

Para amplificar un fragmento abarcando parte del gen HC-Pro y P3 se utilizaron los iniciadores degenerados Oli96 y Oli97 (Tabla M.1). La síntesis de cDNA y la amplificación fue realizada en un solo paso a partir de 2 µl de ARN total purificado con el “RNeasy Plant Mini Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen Sciences, Maryland, EEUU). Las condiciones de amplificación fueron iguales a las descriptas para el gen de la proteína de cápside excepto que se usó el Buffer PCR 10 X +KCl (Fermentas) y el siguiente programa de termociclado: 42°C por 45 min., 95°C por 2 min., 45 ciclos de 94°C por 30 seg., 45°C por 2 min., 72°C por 90 seg. y una extensión final a 72°C por 5 min.

3.3. Amplificación de los genes Nib y CP completos y de la región 3' UTR del SCMV

Se amplificaron los genes Nib, CP y región 3' UTR por medio de dos productos de RT-PCR parcialmente superpuestos con los iniciadores Oli5 / SCMV-WIIF1 y SCMV F4 / Oli95. Se utilizó el mismo protocolo de amplificación del punto 3.2 con una temperatura de anillamiento de 55°C.

3.4. Amplificación de un fragmento del gen de la proteína de cápside de SCSMV

Se amplificó un fragmento de 213 pb del gen de la proteína de cápside del *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) con los iniciadores Oli26 y Oli27 (Tabla M.1) a partir de 2 µl de ARN total purificado con el “RNeasy Plant Mini Kit”. Se realizó la síntesis de cDNA y amplificación en un solo paso como en el punto 3.1 pero con una temperatura de anillamiento de 50°C. Los controles positivos fueron provistos por los Drs. Jean-Claude Girard y Philip Rott (CIRAD, Francia).

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador MyCycler Thermal cyler (Bio-Rad Laboratories Inc, EEUU). Se analizó una alícuota de 10 µl de producto de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El gel fue corrido en buffer TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y los fragmentos de ADN fueron visualizados con un transiluminador UV y documentados digitalmente con el software Doc-it (UVP, EEUU).

4. Protocolo rápido de extracción viral

Como material de partida se utiliza la porción basal (20 cm) de hojas jóvenes (hoja 0 o +1, siendo ésta última es la primer hoja con la lígula completamente visible) de plantas de caña de azúcar de entre tres y seis meses de edad conservada a 4°C por hasta un máximo de siete días. Para la extracción viral se utiliza una modificación del “rapid virus release protocol” (Thomson y Dietzgen, 1995) según lo detallado en el Capítulo I. Brevemente, se secciona un disco foliar de la porción basal de la lámina utilizando un tubo eppendorf conteniendo 500 µl de buffer TPS1 (Tris-HCl 100 mM, KCl 1,0 M, EDTA 10 mM, pH 8,4). Las muestras se incuban por

10 min. a 95°C, se mezclan en un vortex, se centrifugan brevemente y se guardan a -20°C hasta su utilización. El sobrenadante se puede incorporar directamente a la reacción de PCR o RT-PCR (Gómez *et al.*, 2009).

5. Detección de SCMV por métodos serológicos

Para la detección de la presencia de SCMV en hojas se utilizó la técnica de “Leaf Printing Immunoassay” (Guzmán y Victoria, 2001) modificada. Para ello se imprime la nervadura central de la hoja 0 o +1 en una membrana de nitrocelulosa presionándola manualmente y se incuba la membrana por una hora a 70°C en una estufa. La membrana se bloquea en buffer #1 (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) con 2% de leche en polvo (descremada) y luego se hibrida por 1 hora con el antisuero IgG anti-SCMV (Bioreba AG, Suiza) diluido 1:1000 en buffer #1 con leche en polvo 1%. Luego de 3 lavados de 15 minutos en buffer # 1, se hibrida por 1 hora con antisuero anti- IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:8000 en buffer #1 con leche en polvo 1%. Luego de tres lavados en buffer #1, se revela con 100 ml de buffer de revelado (Tris base 0,2 M, pH 9,1) conteniendo 15 mg naphthol-AS-fosfato disuelto en 250 µl de dimetilformamida, 0,1 g Fast Blue BB y 0,5 ml MgCl₂ 0,1M. Luego de 20 minutos de revelado en la oscuridad, la membrana se lava con agua y se aclara con lavandina 20% por 20 minutos. Estas incubaciones se realizan a temperatura ambiente agitando las muestras a 80 rpm. Los reactivos utilizados fueron de Sigma-Aldrich Co, EE.UU., excepto la lavandina (Ayudín S.A) y la leche en polvo descremada (Svelty, Nestle).

6. Secuenciación

6.1. Secuenciación de los productos de RT-PCR

Los productos de RT-PCR se enviaron a Macrogen Inc (Corea) donde se los purificó con el sistema “Exo-SAP-IT” (Affymetrix, EE.UU.) y secuenció utilizando “BigDye™ terminator technology” en un secuenciador ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems). Los productos de RT-PCR del gen de la proteína de cápside (850-900 pb) del SCMV y del SrMV fueron secuenciados directamente con los mismos iniciadores de amplificación, a excepción del iniciador sentido (SCMV F4) de SCMV, que fue modificado (Oli39) para cumplir con las especificaciones de secuenciación sugeridas por el proveedor (Tabla M.1).

Los productos de amplificación que incluyen fragmentos de los genes HcPro y P3 de SCMV y SrMV amplificados con los iniciadores Oli96 y Oli97, así como los fragmentos de CP de potyvirus que infectan *Poaceae* amplificados con los iniciadores Oli40 y Oli41, fueron secuenciaron con los iniciadores universales M13F y Promotor T3. Los iniciadores Oli40 y Oli96 cuentan en su extremo 5' con la secuencia del iniciador M13F, mientras que los iniciadores Oli41 y Oli97 cuentan en su extremo 5' con la secuencia del iniciador Promotor T3, lo que permite el uso de estos iniciadores universales para secuenciar los productos de RT-PCR obtenidos.

Los fragmentos de amplificación de los genes NIb, CP y de la región 3'UTR del SCMV fueron secuenciados con los mismos iniciadores usados en la amplificación y con iniciadores que hibridan internamente en la secuencia.

6.2. Secuenciación del genoma completo de SCMV

Para la secuenciación del genoma completo del SCMV se obtuvieron 9 fragmentos parcialmente superpuestos mediante la técnica de RT-PCR (ver punto 3) a partir de los iniciadores que se detallan en la tabla M.1. Los iniciadores fueron diseñados utilizando el software Bioedit (Hall, 1999) y Vector NTI (Invitrogen Corporation,

EEUU) a partir de un alineamiento de 12 genomas completos del SCMV aislados de caña de azúcar comercial y maíz (entradas de GenBank GU474635, EU091075, AY149118, AY042184, AF494510, AM110759, AY569692, AJ278405, AJ310105, AJ310104, AJ310103 y AJ310102).

Las secuencias fueron curadas manualmente, descartándose las secuencias de baja calidad o que presentaran cromatogramas superpuestos. Las secuencias sentido y antisentido obtenidas fueron ensambladas utilizando el software Seqman Pro del paquete Lasergene 7 (DNASTar Inc), que tiene en cuenta la calidad de cada base para recortar los extremos y definir el consenso.

7. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Las secuencias ensambladas fueron comparadas contra las depositadas en GenBank con el software BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Las secuencias fueron alineadas con el algoritmo ClustalW a través del software Bioedit (Hall, 1999). Los extremos de las secuencias alineadas fueron recortados para que todas las secuencias tuvieran el mismo largo. Las matrices de identidad y gráficos de entropía se construyeron utilizando también el software Bioedit.

Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el algoritmo “Neighbor Joining” (Saitou y Nei, 1987) con el software MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), calculando los valores de “Bootstrap” (Felsenstein, 1985) sobre un total de 1000 remuestreos. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método de Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980) en el caso de secuencias nucleotídicas y matrices de Dayhoff en el caso de secuencias aminoacídicas (Dayhoff *et al.*, 1972).

Para identificar posibles muestras recombinantes de SCMV se utilizó la herramienta Virus Genotyper (Rozanov *et al.*, 2004) del “National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formgape.cgi>).

8. Clonado de un transgén de resistencia al mosaico

Para construir los plásmidos que llevan las secuencias derivadas del genoma viral se utilizaron técnicas clásicas de clonado; enzimas de restricción, PCR y “overlapping” PCR (Sambrook y Russell, 2001). Todos los fragmentos presentes en las construcciones finales fueron primero clonados en pBluescript SK y secuenciados para confirmar su identidad y orientación.

Como resultado final de una serie de 13 pasos de clonado, se obtuvieron 4 plásmidos para la transformación biolística de caña de azúcar. Los plásmidos pUBI VIR3 y pUBI VIR3 NptII portan tres fragmentos del genoma viral (ver mas abajo), mientras que los plásmidos pUBI VIR2 y pUBI VIR2 NptII portan dos fragmentos virales, ya que se excluyó el fragmento del gen de la proteína de cápside de SCMV grupo MZ. Los plásmidos denominados “NptII” portan el gen de resistencia a geneticina como marcador selectivo en plantas, mientras que los que no lo llevan pueden ser utilizados para cotransformar con otros genes selectores de interés localizados en un plásmido o fragmento independiente.

Tabla M.1. Iniciadores para RT-PCR y secuenciación. Código IUPAC para bases degeneradas.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Aplicación	Posición de hibridación en genoma viral y orientación (*)	Referencia
SrMV F3	AAGCAACAGCACAAGCAC	RT-PCR de CP de SrMV y secuenciación	8429, sentido	Yang y Mirkov, 1997
SrMV R3	TGACTCTCACCGACATTCC	RT-PCR de CP de SrMV y secuenciación	9281, antisentido	Yang y Mirkov, 1997
SCMV R3	AGCTGTGTGCTCTCTGTATTCTC	RT-PCR de CP de SCMV	9265, antisentido	Yang y Mirkov, 1997
SCMV F4	GTTTTYACCAAGCTGGAACAGTC	RT-PCR de CP de SCMV	8384, sentido	Alegria y otros, 2003
Oli48	GTGTGTCTCTCTGTATTCTC	Secuenciación SCMV	9267, antisentido	Este trabajo
Oli39	GTTTTYACCAAGCTGG	Secuenciación SCMV	8384, sentido	Este trabajo
Oligo1n	ATGGTHTGGTGYATHGARAAYGG	RT-PCR de potyvirus de <i>Poaceae</i>	8881, sentido	Marie-Jeanne y otros, 2000
Oligo2n	TGCTGCKGTCATYTG	RT-PCR de potyvirus de <i>Poaceae</i>	9190, antisentido	Marie-Jeanne y otros, 2000
Oli40	GTAAAACGACGGCCAGTATGGTH TGGTGYATHGARAAYGG	RT-PCR de potyvirus de <i>Poaceae</i> (Oligo1n) con adaptador para secuenciación	8881, sentido	Este trabajo
Oli41	ATTAACCCTCACTAAAGTGCTGCK GCYTTTCATYTG	RT-PCR de potyvirus de <i>Poaceae</i> (Oligo2n) con adaptador para secuenciación	9190, antisentido	Este trabajo
Oli96	GTAAAACGACGGCCAGTATGCAY GTNATHGAYTCDTAYGG	RT-PCR gen P3 de SCMV y SrMV con adaptador para secuenciación	2098, sentido	Este trabajo
Oli97	ATTAACCCTCACTAAAGTCDSVYT CRTAYTCVTCBTCTCT	RT-PCR gen P3 de SCMV y SrMV con adaptador para secuenciación	3094, antisentido	Este trabajo
Oli26	AGCGGAAACCCATAATACC	RT-PCR de CP de SCSMV	9308, sentido	Este trabajo
Oli27	CAGGTCCGTGTCCTCATCTC	RT-PCR de CP de SCSMV	9501, antisentido	Este trabajo
Oli5	TTTTGGCACTGTGATTTTGC	RT-PCR de Nib de SCMV y secuenciación	8654, antisentido	Este trabajo
SCMV- WIIIF1	GGTTGATTTCAGCTCCCAAAGGTTT GT	RT-PCR de Nib de SCMV y secuenciación	6759, sentido	Este trabajo
Oli95	TCACCAAGAGACTCGCAGCA	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	9549, antisentido	Este trabajo
Oli90	AAACAACAAAACACTCAACACAACA	Amplificación y secuenciación del genoma	1, sentido	Este trabajo

	CAAC	completo SCMV grupo W		
Oli91	AARTTAYGTAGATCAATTA AAC	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	2691, sentido	Este trabajo
Oli92	GATATTAGATGCGTAGCTGAT	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	2841, antisentido	Este trabajo
Oli93	GAYTTYCCACCATTYCCWATGCG	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	6376, sentido	Este trabajo
Oli94	CCYTTTGGTGCYGTBACRCT	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	6493, antisentido	Este trabajo
SCMV-WIIF1	CACTATAATCGTCACTATGAATGA	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	3045, sentido	Este trabajo
SCMV-WIIR1	TGCGGATGCATTGAACCATCAAA	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	4774, antisentido	Este trabajo
SCMV-WIIF2	AGGCAGCATTATGTGTTTCGCAT	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	4628, sentido	Este trabajo
SCMV-WIIR2	ATCGCCATTTCTTTGGGTGCTGT	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	6499, antisentido	Este trabajo
SCMV-WIIR1	TCCTGTGGGCGGTTGTGAACCTT	Amplificación y secuenciación del genoma completo SCMV grupo W	8534, antisentido	Este trabajo
SCMV-WIIR2	CCTCCTCTTTTATGCCTGACCCTA	Amplificación y secuenciación del genoma completo de SCMV-W	8290, antisentido	Este trabajo
Oli142	CCGTATCTTGGCATGTATCG	Diagnóstico de transgénicas transformadas c/ pUBI VIR3 NptII	-	Este trabajo
Oli144	CAGTCATGGGCAGAATTGTC	Diagnóstico de transgénicas transformadas c/ pUBI VIR3 NptII	-	Este trabajo
Oli1	ACCAGATCTCCCCAAATCCAC	RT-PCR de ARNm de transgénicas transformadas c/ pUBI VIR3 NptII	-	Este trabajo
SCMV-R	TATAACTGGCTCGATCGCGACTT	RT-PCR de ARNm de transgénicas transformadas c/ pUBI VIR3 NptII	-	Este trabajo

(*) Posiciones de hibridación en base a los genomas completos del SCMV aislamiento Brisbane (GenBank AJ278405), SrMV aislamiento H (GenBank U57358) y SCSMV aislamiento PAK (GenBank GQ388116).

El plásmido final de transformación pUBI VIR3 NptII consta de dos casetes de expresión; uno de resistencia a antibiótico utilizado para la selección de callos de caña de azúcar transformados y el otro de expresión de secuencias derivadas de los virus del SCMV y del SrMV en un casete tipo horquilla o “hairpin” en inglés (Eamens *et al.*, 2008, Waterhouse *et al.*, 2001). Se utilizó el promotor de gen de la actina de arroz (McElroy *et al.*, 1991) para dirigir la expresión del gen de resistencia a antibiótico NptII y el terminador de la transcripción NOS del gen nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*, ambos clonados a partir del plásmido pGREEN0029 (Hellens *et al.*, 2000). Se utilizó el promotor del gen de ubiquitina de maíz junto con el primer exón y primer intrón clonado a partir del plásmido pAHC20 (Christensen y Quail, 1996) para dirigir la expresión del casete de resistencia a virus, junto con el terminador de la transcripción 35S del virus CaMV (*Cauliflower mosaic virus*). Se clonaron río abajo del promotor de la ubiquitina del maíz tres fragmentos de los genomas virales en orientaciones opuestas a ambos lados del intrón IVS 6 de maíz: 1) un fragmento de 395 pb del gen P3 de SCMV grupo SCE, 2) un fragmento de 318 pb del gen de la proteína de cápside de SrMV, y 3) un fragmento de 316 pb del gen de la proteína de cápside de SCMV grupo MZ (no homólogo al fragmento de SrMV).

9. Cultivo de tejidos de caña de azúcar y transformación

9.1. Obtención de callos de caña para transformación biobalística

Se corta la sección apical (llamada cogollo) de rebrotes tiernos de plantas de caña de azúcar de campo y se trasladan al laboratorio para su desinfección. Se remueven las hojas externas hasta un diámetro aproximado de 15 mm, se incuban en Iperlate 0,15% por 20 min. (Agro-Care Chemical Industry Group Limited) y, luego de un enjuague con agua destilada, se incuban con etanol 70% por un minuto y con hipoclorito de sodio al 30% por 30 min. Trabajando en un flujo laminar se enjuagan tres veces con agua deionizada (milliQ) estéril y se remueven las hojas externas hasta un diámetro aproximado de 10 mm. A continuación se corta la sección central del cogollo desinfectado en discos de 2 mm de espesor que se distribuyen en placas de Petri con medio MSE3 Cx2 (Murashige y Skoog, 1962). El medio MSE3cx2 contiene sacarosa 20 g/L, caseína 0,5g/L, sales MS 4,33 g/L, FeSO₄/EDTA 0,1 mM, vitaminas MS, el antibiótico cefotaxima 200 mg/L, la hormona 2,4-D 3 mg/L y agar 9 g/L. Los explantos se incuban en la oscuridad y a 28-30° C durante 2 a 3 meses y se repican a medio fresco cada dos semanas. Luego de dos a tres meses de cultivo *in vitro*, se obtienen callos de tipo embriogénico que son fácilmente distinguibles por ser blancos, globulares y friables. Estos callos se separan con un bisturí y se usan como tejido blanco para transformación por biobalística.

9.2. Transformación por biobalística

Para la transformación por biobalística se utilizó un cañón génico del tipo “Particle Inflow Gun” (Finer *et al.*, 1992) fabricado en la Chacra Experimental. En dicho cañón, un pulso de gas helio acelera partículas de tungsteno recubiertas del plásmido utilizado para la transformación hacia el tejido blanco, que se encuentra en una cámara bajo un vacío parcial. Se utilizaron los siguientes parámetros de bombardeo: 8 bar de presión de gas helio, 50 milisegundos de apertura de válvula solenoide, 720 mmHg de presión de vacío en la cámara de los explantos, 12 cm de distancia al explanto y 30 segundos de tiempo de liberación del vacío.

Se utilizó el protocolo estándar de transformación utilizado en la Chacra Experimental, que es una adaptación del protocolo reportado por Bower y Birch en (1992). Para ello se repican los callos a medio osmótico MSE3O (medio MSE3cx2 contiene 36,4 g/L de sorbitol y manitol, que inducen la plasmólisis celular) y se incuban por 4 horas. Una hora antes del bombardeo se abren las placas en el flujo laminar para eliminar el exceso de humedad de los callos. Cada placa se bombardea con 0,5 µg de partículas de tungsteno M10 suspendidas en etanol (Bio-Rad Laboratories Inc, EEUU) sobre las que se precipitó previamente 4 µg de plásmido utilizando espermidina 0,1 M y cloruro de calcio 2,5 M. Luego de cada disparo, los callos permanecen en medio MSE3O por 4 horas más y se repican a medio de descanso MSE3cx2 y se incuban en la oscuridad por 3 o 4 días. Finalmente, los callos se transfieren a medio selectivo MSE3Gen45 conteniendo 45 mg/L del antibiótico geneticina y se incuban en la oscuridad a 28–30° C. Se realizan repiques a medio fresco cada 2 semanas. Para inducir la regeneración, los callos transformados con las construcciones que portan el gen selectivo NptII y que crecen activamente en el medio selectivo se repican a un medio de regeneración MSRGen45 y se incuban a 28 ° C y a la luz (16 horas de luz y 8 de oscuridad). Dicho medio tiene la misma composición que el medio MSE3cx2, excepto por la ausencia de la hormona 2,4-D y por la presencia del antibiótico geneticina (45 mg/l) utilizado como agente selectivo.

Los plantines que regeneran a partir de callos y desarrollan un adecuado sistema radicular son rusticados en invernáculo en una mezcla de mantillo, cachaza y tierra negra. Las plantines son regados regularmente y podados para estimular un crecimiento vigoroso.

9.3. Expresión transitoria del gen reportero *uidA*

Se confirmó la eficiencia de la transferencia de ADN biológicamente activo a los núcleos de células de callos de caña de azúcar mediante ensayos de transformación transitoria con el gen reportero *uidA* presente en el plásmido pDMC207 (McElroy *et al.*, 1995). A los 3 días del bombardeo, los callos transformados con este plásmido fueron incubados por 16 hs a 37°C en buffer de revelado (sustrato X-gluc 0,01 mg/ml, Triton X-100 1%, ferrocianuro y ferricianuro de potasio 5 mM, buffer fosfato 50 mM, pH 7,0), que resulta en la tinción de azul de las células en las que el plásmido ingresa en el núcleo y es expresado correctamente (Jefferson *et al.*, 1987).

10. Caracterización molecular de los eventos de caña de azúcar transgénicos

10.1. Confirmación de la transgénesis por PCR

Se preparó un extracto crudo de ácidos nucleicos a partir de un disco foliar de caña de azúcar de campo siguiendo el protocolo descrito en el punto 4. La mezcla de PCR (25 µl volumen final) contenía 1,25 µl de muestra del protocolo rápido de extracción viral, 4 µl de Buffer PCR 10 X -KCl +Tween (Tris-base 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 8,8), una concentración final de 0,2 mM de dNTPs, 1 µM de los iniciadores Oli142 y Oli144, 2 mM de MgCl₂ y 1 unidad de Taq DNA Polimerasa. Se utilizó un programa de termociclado estándar y los productos de amplificación fueron analizados según fue descrito en el punto 3. Los iniciadores mencionados dan lugar a un producto de amplificación de 580 pb a partir de la construcción pUBI VIR3 NptII.

10.2. Confirmación de la expresión del casete de resistencia viral por RT-PCR en caña de azúcar transgénica

Se amplificó por RT-PCR un fragmento del ARN mensajero generado a partir del promotor de la ubiquitina que dirige la expresión del casete de resistencia viral presente en el plásmido de transformación pUBI VIR3 NptII. Se utilizó 1,5 µl ARN total de caña de azúcar transgénica aislado con el reactivo de Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizaron las condiciones de amplificación descritas en el punto 3.1, excepto que se usaron los iniciadores Oli1 y SCMV-R (Tabla M.1). El iniciador Oli1 hibrida dentro del primer exón del promotor de la ubiquitina y el iniciador SCMV-R hibrida dentro de la repetición directa correspondiente al gen P3 del SCMV. En los eventos donde se inserta el casete de resistencia a virus se amplifican un fragmento de 418 pb a partir de un ARN mensajero maduro y un fragmento de 1445 pb si no se produce el “splicing” del primer intrón de la ubiquitina. Los productos de amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 1%.

10.3. Análisis de la transcripción del casete de resistencia a virus mediante “Northern blot”

Se corrió 6 µg de ARN total purificado con Trizol en un gel de agarosa al 1% con MOPS 1X (MOPS 20 mM pH 7,0; acetato de sodio 2mM, EDTA 1 mM pH 8,0) como buffer de corrida. El ARN se transfirió a una membrana Hybond N+ (GE Healthcare Life Sciences, EEUU) por capilaridad según lo descrito por Sambrook y Russell en 2001. La membrana fue prehibridada con la solución Ultrahyb (Ambion, Life Technologies, EEUU) e hibridada con la misma una sonda radiactiva. Como sonda se utilizó un fragmento del gen P3 de SCMV clonado en pUBI VIR3 NptII obtenido por amplificación por PCR utilizando los iniciadores SCMV-R y SCMV-F-XbaI-BamHI. El producto de amplificación de 409 pb fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y purificado con el kit “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas, Lituania). La sonda fue marcada radiactivamente con ³²Pα dCTP utilizando el kit “Prime-a-Gene Labeling System”, según las especificaciones del fabricante (Promega Corporation, EEUU). Luego de la hibridación con la sonda radiactiva se realizaron exposiciones durante períodos variables y las autoradiografías obtenidas fueron escaneadas utilizando el equipo Typhoon 9400 (GeHealthcare). El análisis de las imágenes adquiridas de esta manera se realizó utilizando el programa ImageQuant™ TL (GeHealthcare).

Para controlar la integridad de las muestras de ARN sembradas, se hibridó la misma membrana con una sonda marcada radiactivamente de 310 pb amplificado a partir del gen “housekeeping” 25S rARN de caña de azúcar con los iniciadores 25SrRNA2F y 25SrRNA2R1 (Iskandar *et al.*, 2004).

10.4. Detección de ARNs pequeños derivados del casete de resistencia viral por “Northern blot”

Se corrió entre 13 y 26 µg de ARN total purificado con Trizol en un gel desnaturante de poliacrilamida 17,5% (bisacrilamida/acrilamida 19:1, urea 7 M), en buffer TBE 0,5X. Una vez finalizada la corrida se tiñó el gel en una solución de BrEt 40 mg/l y se adquirió la imagen con un equipo Typhoon 9400. El ARN se transfirió a una membrana de nylon Hybon-NX (GE Healthcare Life Sciences, EE.UU.) por electrotransferencia. La prehibridación se realizó durante 2 horas a 42°C en buffer de prehibridación (SSC 5X, Na₂HPO₄ 20 mM pH 7,2, SDS 7%, solución de Denhardt 2X, 0,04 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturizado) y se realizó la hibridación durante la noche a 42°C. Se utilizó la misma sonda radiactiva que en el punto 10.4 y se adquirieron las imágenes de según lo detallado en el mismo punto.

11. Inoculación artificial de plantas de caña de azúcar en invernáculo con SCMV

Para la preparación de un extracto infectivo de SCMV, se trituran en una licuadora hojas de caña de azúcar con sintomatología de mosaico con 1:5 peso/volumen de buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 y Na₂SO₃ al 0,13 %.

Para la inoculación artificial de plantas de caña en el estadio de 4-6 hojas, se espolvorean las hojas 0 o +1 con el abrasivo carborundo (mesh 240) y se las frota utilizando un guante previamente mojado con el extracto infectivo fresco mantenido en hielo. Se evalúa visualmente la aparición de síntomas (mosaico de colores verde claro y oscuro en la lámina de las hojas) cada 15 días. Se determina la presencia del SCMV utilizando la técnica de “leaf printing inmununoassay” (Guzmán y Victoria, 2001).

12. Evaluación a campo de la resistencia a mosaico de las plantas transgénicas obtenidas

Se plantó el 25/01/2011 un ensayo a campo en un terreno perteneciente a la Chacra Experimental Santa Rosa, ubicado a 4 km de la Colonia Santa Rosa, Salta (coordenadas de GPS, S: 23, 395425° , O: 64,395538°). El suelo es aluvial profundo con estratificación bien definida y se lo encuentra en paisaje parcialmente estabilizado del antiguo ambiente de acumulación del Río Colorado. Los materiales aluviales son de granulometría arenosa, con algunas intercalaciones limosas. Se transplantaron a campo plantines transgénicos provenientes de invernáculo a razón de un plantín cada 60 cm. Se incluyeron plantines no transgénicos provenientes de cultivo *in vitro* y plantines provenientes de yemas libres de virus para ser usados como controles de la infección natural. Se plantó una parcela no replicada conteniendo entre 1 y 18 plantines de cada evento, según la cantidad de material disponible originado en el laboratorio de biotecnología. Para aumentar la presión de virus en el ensayo, tanto las borduras (tres surcos) como las cabeceras (de cinco metros de largo) y tres surcos internos fueron plantados con plantines con sintomatología de mosaico de la variedad altamente susceptible NA 84-3013. Se realizaron evaluaciones visuales para la presencia de síntomas de mosaico, registrándose para cada planta la presencia/ausencia de los mismos. Al año de implantado el ensayo se realizó junto con el mejorador de la Chacra Experimental Santa Rosa una evaluación visual de cada parcela para seleccionar los eventos que no se infectaron con mosaico y se destacaban por sus características agronómicas (vigor, macollage, número de tallos por cepa, ausencia de clorosis u otras enfermedades sintomáticas), con el objetivo de multiplicarlos en un segundo ensayo a campo.

Para el análisis estadístico de los datos de campo se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012). Para cada una de las cinco variedades, se estimaron intervalos de confianza (IC) al 95% para la proporción de plantas sanas en los controles no transgénicos. Se seleccionaron aquellos eventos que presentaron más de tres plantas, dado que la presencia de menos cantidad de plantas hace que la estimación de la proporción de plantas sanas o enfermas sea imprecisa. Luego, se calculó la proporción de plantas sanas para cada uno de los eventos. Si la proporción de plantas sanas de un evento se encuentra dentro del IC (95%) para la proporción de plantas controles sanas de su misma variedad, entonces no hay evidencia suficiente para decir que la proporción de plantas sanas del evento es estadísticamente diferente de la proporción de plantas sanas control.

Bibliografía

- ACHON, M., SOBREPÈRE, M. y MINGUELL, R. 2003. Molecular and biological properties of a sugarcane mosaic potyvirus isolate from Spain. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 110, 324-331.
- ACHON, M. A., SERRANO, L., ALONSO-DUENAS, N. y PORTA, C. 2007. Complete genome sequences of *Maize dwarf mosaic* and *Sugarcane mosaic virus* isolates coinfecting maize in Spain. *Arch Virol*, 152, 2073-8.
- ADAMS, M., ANTONIW, J. y BEAUDOIN, F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol Plant Pathol*, 6, 471-487.
- ADAMS, M. J., ANTONIW, J. F., BAR-JOSEPH, M., BRUNT, A. A., CANDRESSE, T., FOSTER, G. D., MARTELLI, G. P., MILNE, R. G. y FAUQUET, C. M. 2004a. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149, 1045-1060.
- ADAMS, M. J., ANTONIW, J. F. y FAUQUET, C. M. 2004b. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch Virol*, 150, 459-79.
- AGRAWAL, P. K., KOHLI, A., TWYMAN, R. M. y CHRISTOU, P. 2005. Transformation of Plants with Multiple Cassettes Generates Simple Transgene Integration Patterns and High Expression Levels. *Molecular Breeding*, 16, 247-260.
- AHLOOWALIA, B. S. y MARETZKI, A. 1983. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Reports*, 2, 21-25.
- ALEGRIA, O. M., ROYER, M., BOUSALEM, M., CHATENET, M., PETERSCHMITT, M., GIRARD, J. C. y ROTT, P. 2003. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six *Sugarcane mosaic virus* isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Arch Virol*, 148, 357-72.
- ALEMAN-VERDAGUER, M., GOUDOU-URBINO, C., DUBERN, J., BEACHY, R. y FAUQUET, C. 1997. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, N1b and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *J Gen Virol*, 78, 1253-1264.
- ALI, N., DATTA, S. K. y DATTA, K. 2010. RNA interference in designing transgenic crops. *GM Crops*, 1, 207-13.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. y LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403-410.
- ANINO, P. y ITURREGUI, M. E. 2011. Complejo Azucarero. In: SECRETARÍA DE POLÍTICA ECONÓMICA, S. D. P. E. (ed.).
- ARENCIBIA, A., VÁZQUEZ, R. I., PRIETO, D., TÉLLEZ, P., CARMONA, E. R., COEGO, A., HERNÁNDEZ, L., DE LA RIVA, G. A. y SELMAN-HOUSEIN, G. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*, 3, 247-255.
- ARENCIBIA, A. D., CARMONA, E. R., CORNIDE, M. T., CASTIGLIONE, S., O'RELLY, J., CHINEA, A., ORAMAS, P. y SALA, F. 1999. Somaclonal variation in insect - resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. *Transgenic Research*, 8, 349-360.
- ARENCIBIA, A. D., CARMONA, E. R., TELLER, P., CHAN, M.-T., YU, S.-M., TRUJILLO, L. E. y ORAMAS, P. 1998. An efficient protocol for sugarcane

- (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* *Transgenic Research*, 7, 213-222.
- ARGOS, P. 1988. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16, 9909-9916.
- BAILEY, R. A. y FOX, P. H. 1980. The susceptibility of varieties to mosaic and the effect of planting date on mosaic incidence in South Africa. *South African Sugar Technologists Association*, 54, 161-167.
- BALAMURALIKRISHNAN, M., DORAISAMY, S., GANAPATHY, T. y VISWANATHAN, R. 2003. *Sugarcane mosaic virus* infection progress in relation to age of sugarcane. *Sugar Tech*, 5, 21-24.
- BALAMURALIKRISHNAN, M., DORAISAMY, S., GANAPATHY, T. y VISWANATHAN, R. 2004. Comparison of Antibody- and Genome-Based Diagnostic Techniques for *Sugarcane mosaic virus* in Sugarcane. *Phytoparasitica*, 32, 52-56.
- BASNAYAKE, S., MOYLE, R. y BIRCH, R. 2011. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Reports*, 30, 439-448.
- BASNAYAKE, S. W. V., MORGAN, T. C., WU, L. y BIRCH, R. G. 2012. Field performance of transgenic sugarcane expressing isomaltulose synthase. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 217-225.
- BLANC, S., AMMAR, E. D., GARCIA-LAMPASONA, S., DOLJA, V. V., LLAVE, C., BAKER, J. y PIRONE, T. P. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol*, 79 (Pt 12), 3119-22.
- BLANC, S., LOPEZ-MOYA, J. J., WANG, R., GARCIA-LAMPASONA, S., THORNBURY, D. W. y PIRONE, T. P. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, 231, 141-7.
- BOWER, R. y BIRCH, R. G. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant Journal*, 2, 409-416.
- BRAVO-ALMONACID, F., RUDOY, V., WELIN, B., SEGRETIN, M., BEDOGNI, M., STOLOWICZ, F., CRISCUOLO, M., FOTI, M., GOMEZ, M., LÓPEZ, M., SERINO, G., CABRAL, S., DOS SANTOS, C., HUARTE, M. y MENTABERRY, A. 2012. Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. *Transgenic Research*, 21, 967-982.
- BUCHER, E., LOHUIS, D., VAN POPPEL, P. M., GEERTS-DIMITRIADOU, C., GOLDBACH, R. y PRINS, M. 2006. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *J Gen Virol*, 87, 3697-701.
- CARMONA, E. R., ARENCIBIA, A. D., LOPEZ, J., SIMPSON, J., VARGAS, D. y SALA, F. 2005. Analysis of genomic variability in transgenic sugarcane plants produced by *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Plant Breeding*, 124, 33-38.
- CASTAGNARO, A. P., FILIPPONE, M. P., NOGUERA, A. S., PERERA, M. F., VELLICCE, G. R., MAMANÍ, A. I., ONTIVERO, M. I., ARIAS, M. E., RACEDO, J., GARCÍA, M. G., PAZ, N., DÍAZ, M. E., SENDÍN, L. N., PARDO, E. M., ORCE, I. G., ROCHA, C. M. L., SEPÚLVEDA TUSEK, M., MARTÍNEZ ZAMORA, G., SALAZAR, S. M., DANTUR, K. I., RIGANO, L., TORRES, P., CHALFOUN, N. R., MARAÑO, M. R., VOJNOV, A., PLOPER, L. D. y DÍAZ RICCI, J. C. 2011. Biotecnología para el desarrollo y

- sostenibilidad agroindustrial del Noroeste Argentino. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 22.
- CRAIG, W., TEPFER, M., DEGRASSI, G. y RIPANDELLI, D. 2008. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Euphytica*, 164, 853-880.
- CHARE, E. R. y HOLMES, E. C. 2006. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch Virol*, 151, 933-46.
- CHATENET, M., MAZARIN, C., GIRARD, J., FERNANDEZ, E., GARGANI, D., RAO, G., ROYER, M., LOCKHART, B. y ROTT, P. 2005. Detection of sugarcane streak mosaic virus in sugarcane from several Asian countries. *Sugar Cane International*, 23, 12-15,28.
- CHEN, J., CHEN, J. y ADAMS, M. J. 2002. Characterisation of potyviruses from sugarcane and maize in China. *Arch Virol*, 147, 1237-46.
- CHEN, W. H., DAVEY, M. R., POWER, J. B. y COCKING, E. C. 1988. Control and Maintenance of Plant Regeneration in Sugarcane Callus Cultures. *Journal of Experimental Botany*, 39, 251-261.
- CHEONG, E., MOCK, R. y LI, R. 2012. Elimination of five viruses from sugarcane using in vitro culture of axillary buds and apical meristems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-7.
- CHRISTENSEN, A. H. y QUAIL, P. H. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res*, 5, 213-8.
- CHUNG, B. Y., MILLER, W. A., ATKINS, J. F. y FIRTH, A. E. 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5897-902.
- D'HONT, A., GRIVET, L., FELDMANN, P., RAO, S., BERDING, N. y GLASZMANN, J. C. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet*, 250, 405-13.
- D'HONT, A., LU, Y. H., FELDMANN, P. y GLASZMANN, J. C. 1993. Cytoplasmic diversity in sugar cane revealed by heterologous probes. *Sugar Cane*, 1, 12-15.
- DAYHOFF, M. O., SCHWARTZ, R. M. y ORCUTT, B. C. 1972. A Model of Evolutionary Change in Proteins. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5, 345-352.
- DEL VAS, M., DISTÉFANO, A. J., ROVERE VÁZQUEZ, C. y HOPP, E. 2008. Técnicas de ingeniería genética para conferir resistencia a virus en plantas. In: LEVITUS, G., ECHENIQUE, V., RUBINSTEIN, C., HOPP, E. & MROGINSKI, L. (eds.) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA.
- DESBIEZ, C., GAL-ON, A., GIRARD, M., WIPF-SCHEIBEL, C. y LECOQ, H. 2003. Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* Symptom Severity in Tolerant Zucchini Cultivars Is Related to a Point Mutation in P3 Protein and Is Associated with a Loss of Relative Fitness on Susceptible Plants. *Phytopathology*, 93, 1478-1484.
- DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZALEZ, L., TABLADA, M. y ROBLEDO, C. W. 2012. InfoStat versión 2012. Córdoba: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
<http://www.infostat.com.ar>
- DOYLE, J. J. y DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, 11-15.

- DUNOYER, P., BROSNAN, C. A., SCHOTT, G., WANG, Y., JAY, F., ALIOUA, A., HIMBER, C. y VOINNET, O. 2010a. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J*, 29, 1699-1712.
- DUNOYER, P., SCHOTT, G., HIMBER, C., MEYER, D., TAKEDA, A., CARRINGTON, J. C. y VOINNET, O. 2010b. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science's STKE*, 328, 912.
- EAMENS, A., WANG, M. B., SMITH, N. A. y WATERHOUSE, P. M. 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol*, 147, 456-68.
- ELLIOTT, A. R., CAMPBELL, J. A., BRETTELL, R. I. S. y GROF, C. P. L. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 739-743.
- ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G. A., VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I., PRIETO-SAMSONOV, D. L., DE LA RIVA, G. A. y SELMAN-HOUSEIN, G. 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium* - mediated transformation. *Planta*, 206, 20-27.
- EWING, B. y GREEN, P. 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, 8, 186-194.
- FALCO, M. C. y SILVA-FILHO, M. C. 2003. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 761-766.
- FALCO, M. C., TULMANN NETO, A. y ULIAN, E. C. 2000. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *Plant Cell Reports*, 19, 1188-1194.
- FAWCETT, G. L. 1922. Enfermedades de la Caña de Azúcar en Tucumán. *Revista Industrial y Agrícola de Tucuman* 13, 1-46.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- FERNANDEZ, E., GIRARD, J. C., ROYER, M. y ROTT, P. 2006. Molecular diagnosis and genetic diversity of the causal agents of mosaic and streak mosaic of sugarcane *VIIIth ISSCT Pathology Workshop* Petit-Bourg, Guadeloupe.
- FERREIRA, S. A., PITZ, K. Y., MANSHARDT, R., ZEE, F., FITCH, M. y GONSALVES, D. 2002. Virus Coat Protein Transgenic Papaya Provides Practical Control of *Papaya ringspot virus* in Hawaii. *Plant Disease*, 86, 101-105.
- FIGUEREDO, L., HENÁNDEZ, L. y LINARES, B. 2004. Relación Epidemiológica entre áfidos (*Homoptera: Afidedae*) y enfermedades virales en el cultivo de caña de azúcar en los valles de los ríos Turbio y Yaracui, Venezuela. *Caña de Azúcar*, 22, 5-19.
- FINER, J., VAIN, P., JONES, M. y MCMULLEN, M. 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports*, 11, 323-328.
- FRALEY, R. T., ROGERS, S. G., HORSCH, R. B., SANDERS, P. R., FLICK, J. S., ADAMS, S. P., BITTNER, M. L., BRAND, L. A., FINK, C. L., FRY, J. S., GALLUPPI, G. R., GOLDBERG, S. B., HOFFMANN, N. L. y WOO, S. C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 4803-4807.
- FRANKS, T. y BIRCH, R. G. 1991. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Aust. J. Plant Physiol*, 18, 471-480.

- GALLO-MEAGHER, M. y IRVINE, J. 1993. Effects of tissue type and promoter strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 12, 666-670.
- GALLO-MEAGHER, M. y IRVINE, J. 1996. Herbicide Resistant Transgenic Sugarcane Plants Containing the bar Gene. *Crop Science*, 36, 1367.
- GAO, B., CUI, X. W., LI, X. D., ZHANG, C. Q. y MIAO, H. Q. 2011. Complete genomic sequence analysis of a highly virulent isolate revealed a novel strain of *Sugarcane mosaic virus*. *Virus Genes*, 43, 390-7.
- GEMECHU, A. L., CHIEMSOMBAT, P., ATTATHOM, S., REANWARAKORN, K. y LERSRUTAIYOTIN, R. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *Sugarcane mosaic virus* isolated from sugarcane and maize in Thailand. *Arch Virol*, 151, 167-72.
- GIBBS, A. J., OHSHIMA, K., PHILLIPS, M. J. y GIBBS, M. J. 2008. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS ONE*, 3, e2523.
- GILBERT, R. A., GALLO-MEAGHER, M., COMSTOCK, J. C., MILLER, J. D., JAIN, M. y ABOUZID, A. 2005. Agronomic Evaluation of Sugarcane Lines Transformed for Resistance to *Sugarcane mosaic virus* Strain E. *Crop Science*, 45, 2060-2067.
- GILBERT, R. A., GLYNN, N. C., COMSTOCK, J. C. y DAVIS, M. J. 2009. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. *Field Crops Research*, 111, 39-46.
- GLYNN, N. C., GILBERT, R. A., COMSTOCK, J. C. y DAVIS, M. J. 2010. Transmission of a *Sugarcane yellow leaf virus* resistance transgene to sexual progeny and screening by kanamycin inoculation. *Field Crops Research*, 119, 308-313.
- GÓMEZ, M., RAGO, A. M. y SERINO, G. 2009. Rapid identification of viruses causing sugarcane mosaic by direct sequencing of RT-PCR products from crude extracts: A method for large scale virus surveys. *J Virol Methods*, 157, 188-194.
- GONÇALVES, M. C., PINTO, L. R., SOUZA, S. C. y LANDELL, M. G. A. 2011. Virus Diseases of Sugarcane. A Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 108-116.
- GONÇALVES, M. C., SANTOS, A. S., MAIA, I. G., CHAGAS, C. M. y HARAKAVA, R. 2007. Characterization of an isolate of *Sugarcane mosaic virus* breaking down resistance of commercial sugarcane varieties. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 32-39.
- GRISHAM, M. P. 2000. Mosaic. In: ROTT, P., BAILEY, R. A., COMSTOCK, J. C., CROFT, B. J. & SAUMTALLY, A. S. (eds.) *A Guide to Sugarcane Diseases*. Montpellier, France: CIRAD and ISSCT.
- GRISHAM, M. P. y PAN, Y. B. 2007. A Genetic Shift in the Virus Strains that Cause Mosaic in Louisiana Sugarcane. *Plant Disease*, 91, 453-458.
- GRISONI, M., MOLES, M., FARREYROL, K., RASSABY, L., DAVIS, R. y PEARSON, M. 2006. Identification of potyviruses infecting vanilla by direct sequencing of a short RT-PCR amplicon. *Plant Pathology*, 55, 523.
- GRIVET, L., DANIELS, C., GLASZMANN, J. C. y D'HONT, A. 2004. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. *Ethnobotany Res Appl*, 2, 9-17.
- GROENEWALD, J. y BOTHA, F. 2001. Manipulating sucrose metabolism with a single enzyme: pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (PFP). *Proc S Afr Sugar Technol Assoc*, 75, 101-103.

- GUIDERDONI, E. y DEMARLY, Y. 1988. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 71-88.
- GUZMÁN, R. M. L. y VICTORIA, K. J. I. 2001. Evaluación de cinco enfermedades de la caña de azúcar mediante las técnicas de "dot-blot" y "tissue-blot" a partir de la misma muestra de tejido. *Fitopatol. Colomb*, 25, 103-110.
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41, 95-98.
- HAMERLI, D. y BIRCH, R. G. 2011. Transgenic expression of trehalulose synthase results in high concentrations of the sucrose isomer trehalulose in mature stems of field-grown sugarcane. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 32-37.
- HARBORNE, K. M. 1988. Population dynamics of the main aphid vectors of sugarcane mosaic virus in Natal. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association*, 62, 195-198.
- HARRISON, B. 2002. Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica*, 124, 181-192.
- HELLENS, R. P., EDWARDS, E. A., LEYLAND, N. R., BEAN, S. y MULLINEAUX, P. M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42, 819-832.
- INGELBRECHT, I. L., IRVINE, J. E. y MIRKOV, T. E. 1999. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiol*, 119, 1187-98.
- INIA 1976. Informe Final Segunda Reunion de Los Paises Del Cono Sur Sobre "pulgonos Del Trigo". Chile: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- ISKANDAR, H., SIMPSON, R., CASU, R., BONNETT, G., MACLEAN, D. y MANNERS, J. 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 325-337.
- JAIN, M., CHENGALRAYAN, K., ABOUZID, A. y GALLO, M. 2007. Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants. *Plant Cell Reports*, 26, 581-590.
- JEFFERSON, R. A., KVANAGH, T. A. y BEVAN, M. W. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387-405.
- JOYCE, P. A., MCQUALTER, R. B., HANDLEY, J. A., DALE, J. L., HARDING, R. M. y SMITH, G. R. 1998. Transgenic sugarcane resistant to *Sugarcane mosaic virus*. *Proc. Aust. Soc. Sugarcane Technol*, 20, 204-210.
- JULIEN, M. H. R., IRVINE, J. E. y BENDA, G. T. A. 1989. Sugarcane anatomy, morphology and physiology. In: RICAUD, C., EGAN, B. T., GILLASPIE JR, A. G. & HUGHES, C. G. (eds.) *Diseases of Sugarcane*. Amsterdam: Elsevier.
- KASSCHAU, K. D., CRONIN, S. y CARRINGTON, J. C. 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, 228, 251-62.
- KIM, J., GALLO, M. y ALTPETER, F. 2011. Analysis of transgene integration and expression following biolistic transfer of different quantities of minimal expression cassette into sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-6.

- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- KING, A. M. Q., E. LEFKOWITZ, et al. (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.
- KOIKE, H. y GILLASPIE, A. G. 1989. Mosaic. In: RICAUD, C., EAGAN, B. T. & GILLASPIE, A. G. (eds.) *Diseases of Sugarcane—Major Diseases* Amsterdam: Science Publishers.
- KOIKE, H. y TIPPETT, R. L. 1971. Influence of strains of mosaic virus on stands, stubbing ability, and yields of sugarcane varieties. *Proc Am Soc Sugar Cane Tech*, 1, 57-62.
- LAIN, S., RIECHMANN, J. L. y GARCIA, J. A. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res*, 18, 7003-6.
- LAKSHMANAN, P. 2006. Somatic embryogenesis in sugarcane—An addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities,’ in vitro cell. *Dev. Biol. Plant* 41(4):345–363; 2005. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42, 201-205.
- LAKSHMANAN, P., GEIJSKES, R. J., WANG, L., ELLIOTT, A., GROF, C. P., BERDING, N. y SMITH, G. R. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep*, 25, 1007-15.
- LECOQ, H., MOURY, B., DESBIEZ, C., PALLOIX, A. y PITRAT, M. 2004. Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res*, 100, 31-9.
- LEIBBRANDT, N. B. y SNYMAN, S. J. 2003. Stability of Gene Expression and Agronomic Performance of a Transgenic Herbicide-Resistant Sugarcane Line in South Africa. *Crop Sci*, 43, 671-677.
- LEVERINGTON, K. C. 1987. Varieties and their relationship to the control of diseases and pests. *Cupersucar International Sugarcane Breeding Workshop*, 149-159.
- LIN, C. Y., TSAI, W. S., KU, H. M. y JAN, F. J. 2011. Evaluation of DNA fragments covering the entire genome of a monopartite begomovirus for induction of viral resistance in transgenic plants via gene silencing. *Transgenic Res*.
- LIU, X., WANG, X., ZHAO, Y., ZHENG, C. y ZHOU, G. 2003. Complete nucleotide sequence of a potyvirus causing maize dwarf mosaic disease in central China. *Acta Virol*, 47, 223-7.
- LOCKHART, B. E. y AUTREY, J. C. 2000a. Mild mosaic pp. . In: ROTT, P., BAILEY, R. A., COMSTOCK, J. C., CROFT, B. J. & SAUMTALLY, A. S. (eds.) *A Guide to Sugarcane Diseases*. Montpellier, France: CIRAD and ISSCT.
- LOCKHART, B. E. y AUTREY, J. C. 2000b. Sugarcane bacilliform virus. In: ROTT, P., BAILEY, R. A., COMSTOCK, J. C., CROFT, B. J. & SAUMTALLY, A. S. (eds.) *A Guide to Sugarcane Diseases*. Montpellier, France: CIRAD and ISSCT.
- LUTCKE, H. A., CHOW, K. C., MICKEL, F. S., MOSS, K. A., KERN, H. F. y SCHEELE, G. A. 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J*, 6, 43-8.
- MA, H., ALBERT, H. H., PAULL, R. y MOORE, P. 2000. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. *Aust. J. Plant Physiol*, 27, 1021-1030.
- MANICKAVASAGAM, M., GANAPATHI, A., ANBAZHAGAN, V. R., SUDHAKAR, B., SELVARAJ, N., VASUDEVAN, A. y

- KASTHURIRENGAN, S. 2004. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Reports*, 23, 134-143.
- MARIE-JEANNE, V., IOOS, R., PEYRE, J., ALLIOT, B. y SIGNORET, P. 2000. Differentiation of poaceae potyvirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. *Journal of Phytopathology*, 148, 141-151.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, B., LLAVE, C., ATENCIO, F. A., DÍAZ-RUIZ, J. R. y LÓPEZ-ABELLA, D. 2001. La transmisión de los potyvirus por pulgones (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16, 2.
- MCELROY, D., BLOWERS, A. D., JENES, B. y WU, R. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 231, 150-160.
- MCELROY, D., CHAMBERLAIN, D. A., MOON, E. y WILSON, K. J. 1995. Development of gusA reporter gene constructs for cereal transformation: Availability of plant transformation vectors from the CAMBIA Molecular Genetic Resource Service. *Molecular Breeding*, 1, 27-37.
- MCQUALTER, R. B., CHONG, B. F., MEYER, K., VAN DYK, D. E., O'SHEA, M. G., WALTON, N. J., VIITANEN, P. V. y BRUMBLEY, S. M. 2005. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. *Plant Biotechnology Journal*, 3, 29-41.
- MCQUALTER, R. B., DALE, J. L., HARDING, R. M., MCMAHON, J. A. y SMITH, G. R. 2004. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a *Fiji disease virus* (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55, 139-145.
- MING, R., MOORE, R., WU, K., D'HONT, A., GLASZMANN, J. C., MIRKOV, T., DA SILVA, J., JIFON, J., RAI, M., SCHNELL, R., BRUMBLEY, S., LAKSHMANAN, P., COMSTOCK, J. y PATTERSON, A. 2006. Sugarcane Improvement through breeding and biotechnology. *Plant breeding Reviews*, 27, 15-118.
- MOLINARI, H. B. C., MARUR, C. J., DAROS, E., DE CAMPOS, M. K. F., DE CARVALHO, J. F. R. P., FILHO, J. C. B., PEREIRA, L. F. P. y VIEIRA, L. G. E. 2007. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 130, 218-229.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- NAVAS-CASTILLO, J., CAMERO, R., BUENO, M. y MORIONES, E. 2000. Severe Yellowing Outbreaks in Tomato in Spain Associated with Infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, 84, 835-837.
- NOONE, D. F., SRISINK, S., TEAKLE, D. S., ALLSOPP, P. G. y TAYLOR, P. W. J. 1994. Ability to Transmit *Sugarcane mosaic virus* and Seasonal Phenology of Some Aphid Species (*Hemiptera: Aphididae*) in the Isis and Bundaberg Districts of Queensland. *Australian Journal of Entomology*, 33, 27-30.
- OGWOK, E., ODIPIO, J., HALSEY, M., GAITÁN-SOLÍS, E., BUA, A., TAYLOR, N. J., FAUQUET, C. M. y ALICAI, T. 2012. Transgenic RNA interference (RNAi)-derived field resistance to cassava brown streak disease. *Molecular Plant Pathology*.
- ORTEGO, J., DIFABIO, M. y DURANTE, M. 2004. Nuevos registros y actualización de la lista faunística de los pulgones (*Hemiptera: Aphididae*) de la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63.

- PADHI, A. y RAMU, K. 2011. Genomic evidence of intraspecific recombination in sugarcane mosaic virus. *Virus Genes*, 42, 282-5.
- PENG, Y. H., KADOURY, D., GAL-ON, A., HUET, H., WANG, Y. y RACCAH, B. 1998. Mutations in the HC-Pro gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J Gen Virol*, 79 (Pt 4), 897-904.
- PERERA, M. F., FILIPPONE, M. P., RAMALLO, C. J., CUENYA, M. I., GARCIA, M. L., PLOPER, L. D. y CASTAGNARO, A. P. 2009. Genetic diversity among viruses associated with sugarcane mosaic disease in tucuman, Argentina. *Phytopathology*, 99, 38-49.
- PÉREZ, D., PAREDES, V. Y G. RODRÍGUEZ 2011. Biocombustibles en la Argentina y Tucumán, cifras en la Industria en el período 2009-2011. *Reporte Agroindustrial. Estadísticas y márgenes de cultivos tucumanos.*, 52, 1-9.
- PRINS, M. 2003. Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends Biotechnol*, 21, 373-5.
- PRINS, M., LAIMER, M., NORIS, E., SCHUBERT, J., WASSENEGGER, M. y TEPFER, M. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol*, 9, 73-83.
- RAGO, A. M. 2008. *Caña de Azúcar: Guía de las enfermedades mas comunes en Argentina*, Córdoba, INTA.
- RAMGAREEB, S., SNYMAN, S., VAN ANTWERPEN, T. y RUTHERFORD, R. 2010. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 175-181.
- ROACH, B. T. y DANIELS, J. 1987. A review of the origin and improvement of sugarcane. *Cupersucar International Sugarcane Breeding Workshop*, 1, 1-31.
- ROTT, P., FERNANDEZ, E. y GIRARD, J. C. 2008. Mosaic diseases in sugarcane. In: RAO, G. P., KHURANA, P. S. M. & LENARDON, S. L. (eds.) *Characterization, diagnosis and management of plant viruses. Industrial crops*. Houston Studium Press LLC.
- ROVERE, C. V., DEL VAS, M. y HOPP, H. E. 2002. RNA-mediated virus resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 167-172.
- ROZANOV, M., PLIKAT, U., CHAPPEY, C., KOCHERGIN, A. y TATUSOVA, T. 2004. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucleic Acids Research*, 32, W654-W659.
- SAITOU, N. y NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406-25.
- SAMBROOK, J. y RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York, CSHL press.
- SANFORD, J. C. y JOHNSTON, S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance—Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 113, 395-405.
- SAWAZAKI, H. E., GONÇALVES, C. R. N. C. B., POLEZ, V. L. P., SÁ, L. A. N., VEIGA, R. F. A. y GRANDI, S. H. R. 2012. Molecular characterization of *Sugarcane streak mosaic virus*. *XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia*. , 38 (supplement).
- SENGAR, R. S., SENEGAR, K. y GARG, S. K. 2011. Biotechnological Approaches for High Sugarcane Yield. *Plant Sciences Feed*, 1, 101-111.
- SHARP, G. L., MARTIN, J. M., LANNING, S. P., BLAKE, N. K., BREY, C. W., SIVAMANI, E., QU, R. y TALBERT, L. E. 2002. Field Evaluation of

- Transgenic and Classical Sources of *Wheat streak mosaic virus* Resistance. *Crop Sci.*, 42, 105-110.
- SHIMIZU, T., NAKAZONO-NAGAOKA, E., UEHARA-ICHIKI, T., SASAYA, T. y OMURA, T. 2011. Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to rice stripe virus. *Plant Biotechnol J*, 9, 503-12.
- SHUKLA, D., TOSIC, M., JILKA, J., FORD, R., TOLER, R. y LANGHAM, M. 1989. Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum, and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology*, 79, 223-229.
- SHUKLA, D. D., FRENKEL, M. J., MCKERN, N. M., WARD, C. W., JILKA, J., TOSIC, M. y FORD, R. E. 1992. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. *Arch Virol Suppl*, 5, 363-73.
- SINGH, B. U., PADMAJA, P. G. y SEETHARAMA, N. 2004. Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (*Homoptera: Aphididae*), in sorghum: a review. *Crop Protection*, 23, 739-755.
- SINGH, D. y RAO, G. 2009. Molecular evidence of aphid transmission of Sugarcane mosaic virus by RT-PCR assays. *Sugar Cane International*, 27, 153-155, 163.
- SNYMAN, S., MEYER, G., RICHARDS, J., HARICHARAN, N., RAMGAREEB, S. y HUCKETT, B. 2006. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Reports*, 25, 1016-1023.
- SOOKNANDAN, S., SNYMAN, S. J., POTIER, B. A. M. y HUCKETT, B. I. 2003. Progress in the development of mosaic resistant sugarcane via transgenesis. *Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar Technologists Association*, 77, 624-627
- SOUSA, I., LENARDON, S., GIOLITTI, F., OLIVEIRA, E., CARNEIRO, N. y GOMES, E. Year. Identification of the potyvirus species in maize, sorghum and sugarcane from Brazil. *In: Congreso Brasileiro de Genética*. 51, 2005 Sao Paulo, Brasil. .
- SOUZA, G., BERGES, H., BOCS, S., CASU, R., D'HONT, A., FERREIRA, J., HENRY, R., MING, R., POTIER, B., VAN SLUYS, M.-A., VINCENTZ, M. y PATERSON, A. 2011. The Sugarcane Genome Challenge: Strategies for Sequencing a Highly Complex Genome. *Tropical Plant Biology*, 4, 145-156.
- SPEDALETTI, Y. A., ZIMMERMANN, J. M. y SERINO, G. 2008. Ingeniería genética de la caña de azúcar en la Chacra Experimental Agrícola. *XV Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar*. San Miguel de Tucumán.
- SRIKANTH, J., SUBRAMONIAN, N. y PREMACHANDRAN, M. 2011. Advances in Transgenic Research for Insect Resistance in Sugarcane. *Tropical Plant Biology*, 4, 52-61.
- SRISINK, S., TAYLOR, P., STRINGER, J. y TEAKLE, D. 1994. An abrasive pad rubbing method for inoculating sugarcane with sugarcane mosaic virus. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45, 625-631.
- SYLLER, J. 2005. The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 119-130.

- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. y KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- TAPARIA, Y., FOUAD, W., GALLO, M. y ALTPETER, F. 2012. Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48, 15-22.
- TENNANT, P., FERMIN, G., FITCH, M. M., MANSHARDT, R. M., SLIGHTOM, J. L. y GONSALVES, D. 2001. Papaya Ringspot Virus Resistance of Transgenic Rainbow and SunUp is Affected by Gene Dosage, Plant Development, and Coat Protein Homology. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 645-653.
- THOMSON, D. y DIETZGEN, R. G. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J Virol Methods*, 54, 85-95.
- THOMSON, D. y HENRY, R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques*, 19, 394-7, 400.
- TIWARI, A., BHARTI, Y., TRIPATHI, S., MISHRA, N., LAL, M., RAO, G., SHARMA, P. y SHARMA, M. 2010. Review Article: Biotechnological approaches to improve sugarcane crop with special reference to disease resistance. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 45, 235-249.
- UI-TEI, K., NAITO, Y., TAKAHASHI, F., HARAGUCHI, T., OHKI-HAMAZAKI, H., JUNI, A., UEDA, R. y SAIGO, K. 2004. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 32, 936-48.
- VÁZQUEZ DE RAMALLO, N. E. 1967. Incidencia del mosaico en los rendimientos de algunas variedades de caña de azúcar. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 45, 153-166.
- VÁZQUEZ DE RAMALLO, N. E. 1981. Razas del mosaico de la caña de azúcar. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 58, 57-68.
- VICKERS, J. E., GROF, C. P. L., BONNETT, G. D., JACKSON, P. A., KNIGHT, D. P., ROBERTS, S. E. y ROBINSON, S. P. 2005a. Overexpression of Polyphenol Oxidase in Transgenic Sugarcane Results in Darker Juice and Raw Sugar. *Crop Sci.*, 45, 354-362.
- VICKERS, J. E., GROF, C. P. L., BONNETT, G. D., JACKSON, P. A. y MORGAN, T. E. 2005b. Effects of tissue culture, biolistic transformation, and introduction of PPO and SPS gene constructs on performance of sugarcane clones in the field. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 57-68.
- VISWANATHAN, R., KARUPPAIAH, R. y BALAMURALIKRISHNAN, M. 2009. Identification of new variants of SCMV causing sugarcane mosaic in India and assessing their genetic diversity in relation to SCMV type strains. *Virus Genes*.
- VOINNET, O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*, 6, 206-20.
- WANG, J.-G., ZHENG, H.-Y., CHEN, H.-R., ADAMS, M. J. y CHEN, J.-P. 2010. Molecular Diversities of *Sugarcane mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* Isolates from Yunnan Province, China. *Journal of Phytopathology*, 158, 427-432.
- WANG, M.-L., GOLDSTEIN, C., SU, W., MOORE, P. H. y ALBERT, H. H. 2005. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. *Transgenic Res*, 14, 167-178.

- WATERHOUSE, P. M. y HELLIWELL, C. A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet*, 4, 29-38.
- WATERHOUSE, P. M., WANG, M. B. y LOUGH, T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411, 834-42.
- WATT, D., SWEBY, D., POTIER, B. y SNYMAN, S. 2010. Sugarcane genetic engineering research in South Africa: From gene discovery to transgene expression. *Sugar Tech*, 12, 85-90.
- WENG, L.-X., DENG, H.-H., XU, J.-L., LI, Q., ZHANG, Y.-Q., JIANG, Z.-D., LI, Q.-W., CHEN, J.-W. y ZHANG, L.-H. 2011. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified cry1Ac provide effective control against stem borers in field trials. *Transgenic Research*, 20, 759-772.
- WENG, L.-X., DENG, H., XU, J.-L., LI, Q., WANG, L.-H., JIANG, Z., ZHANG, H. B., LI, Q. y ZHANG, L.-H. 2006. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. *Pest Management Science*, 62, 178-187.
- WESLEY, S. V., HELLIWELL, C. A., SMITH, N. A., WANG, M. B., ROUSE, D. T., LIU, Q., GOODING, P. S., SINGH, S. P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P. A., ROBINSON, S. P., GLEAVE, A. P., GREEN, A. G. y WATERHOUSE, P. M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*, 27, 581-90.
- WU, Y., ZHOU, H., QUE, Y., CHEN, R. y ZHANG, M. 2008. Cloning and identification of promoter Prd29A and its application in sugarcane drought resistance. *Sugar Tech*, 10, 36-41.
- XU, D. L., PARK, J. W., MIRKOV, T. E. y ZHOU, G. H. 2008. Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. *Arch Virol*, 153, 1031-9.
- XU, D. L., ZHOU, G. H., XIE, Y. J., MOCK, R. y LI, R. 2010. Complete nucleotide sequence and taxonomy of *Sugarcane streak mosaic virus*, member of a novel genus in the family *Potyviridae*. *Virus Genes*, 40, 432-439.
- XU, P., ZHANG, Y., KANG, L., ROOSSINCK, M. J. y MYSORE, K. S. 2006. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol*, 142, 429-40.
- YANG, Z. N. y MIRKOV, T. E. 1997. Sequence and Relationships of Sugarcane Mosaic and Sorghum Mosaic Virus Strains and Development of RT-PCR-Based RFLPs for Strain Discrimination. *Phytopathology*, 87, 932-939.
- ZHANG, L., XU, J. y BIRCH, R. G. 1999. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nat Biotech*, 17, 1021-1024.
- ZHANG, S.-Z., YANG, B.-P., FENG, C.-L., CHEN, R.-K., LUO, J.-P., CAI, W.-W. y LIU, F.-H. 2006. Expression of the *Grifola frondosa* Trehalose Synthase Gene and Improvement of Drought-Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 453-459.
- ZHONG, Y., GUO, A., LI, C., ZHUANG, B., LAI, M., WEI, C., LUO, J. y LI, Y. 2005. Identification of a naturally occurring recombinant isolate of *Sugarcane mosaic virus* causing maize dwarf mosaic disease. *Virus Genes*, 30, 75-83.
- ZHU, Y., MCCAFFERTY, H., OSTERMAN, G., LIM, S., AGBAYANI, R., LEHRER, A., SCHENCK, S. y KOMOR, E. 2011. Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. *Transgenic Research*, 20, 503-512.

ZUCCHI, M., ARIZONO, H., MORAIS, V., FUNGARO, M. y VIEIRA, M. 2002.
Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetics
and Molecular Biology*, 25, 91-96.

Apéndice I

Tabla A.1. Descripción de las muestras de caña de azúcar con sintomatología de mosaico colectadas en la campaña 2007-2008 y de las secuencias virales derivadas de las mismas. Los números de entrada de Genbank corresponden a la secuencia parcial del gen de la proteína de cápside al menos que se indique lo contrario en la columna “Notas sobre la secuenciación”.

Código de muestra	Número de entrada de GenBank	Región / Ingenio	Área / Parcela	Tipo de lote	Variedad de caña de azúcar	Coordenadas de GPS	Fecha de muestreo	RT-PCR			Clasificado como grupo viral:	Notas sobre la secuenciación
								SCMV	SrMV	Poaceae Potyvirus		
ARG-761 (07)	JX099773	Tucumán	EEOC, Santa Ana	Experimental	RA 96-46	S27 28.455 W65 40.556	19/01/2006	-	+		SrMV	
ARG-762 (07)	JX099774	Tucumán	Yaquilo	Experimental	TUC 96-42	S27 34.144 W65 36.880	05/01/2006	-	+		SrMV	
ARG-763 (07)	JX099775	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	CP 75-319	S27 00.961 W65 22.852	13/04/2007	-	+		SrMV	
ARG-766 (07)	JX237949	Chacra	Chacra Base	Experimental	FAM 80-112	S23 22.364 W64 28.194	23/05/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-767 (07)	JX237950	Chacra	Chacra Base	Experimental	CP 52-68	S23 22.364 W64 28.194	23/05/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-768 (07)	JX238177	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 56-26	S27 00.961 W65 22.852	13/04/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-769 (07)	JX238178	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 77-15	S27 00.961 W65 22.852	13/04/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-770 (07)	JX238179	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	FAM 86-275	S27 00.961 W65 22.852	13/04/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-771 (07)	JX237871	Tabacal	B50	Comercial	NA 84-3419	S23 14.959 W64 18.688	20/04/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-774 (07)	JX237872	Tabacal	K43	Comercial	NA 84-3419	S23 18.554 W64 17.040	24/04/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1	-	Tabacal	A21	Comercial	NA 84-3419	S23 16.840 W64 13.114	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-2	JX237873	Tabacal	A21	Comercial	NA 84-3419	S23 16.840 W64 13.114	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-3	JX237874	Tabacal	A21	Comercial	NA 84-3419	S23 16.840 W64 13.114	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-11	JX237875	Tabacal	A07	Comercial	NA 84-3419	S23 14.690 W64 14.259	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-12	JX237876	Tabacal	A07	Comercial	NA 84-3419	S23 14.690 W64 14.259	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-13	JX237877	Tabacal	A07	Comercial	NA 84-3419	S23 14.690 W64 14.259	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-21	JX237878	Tabacal	B09	Comercial	NA 84-3419	S23 15.865 W64 17.312	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-22	JX237879	Tabacal	B09	Comercial	NA 84-3419	S23 15.865 W64 17.312	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-23	JX237880	Tabacal	B09	Comercial	NA 84-3419	S23 15.865 W64 17.312	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-31	JX237881	Tabacal	B50	Comercial	NA 84-3419	S23 14.959 W64 18.688	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-32	JX237882	Tabacal	B50	Comercial	NA 84-3419	S23 14.959 W64 18.688	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-33	JX237883	Tabacal	B50	Comercial	NA 84-3419	S23 14.959 W64 18.688	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-51	JX237884	Tabacal	B62	Experimental	NA 03-1051	S23 15.087 W64 19.532	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-52	-	Tabacal	B62	Experimental	NA 03-1051	S23 15.087 W64 19.532	30/10/2007	-	-	-		No se dispone de información de secuencia
ARG-53	JX237885	Tabacal	D14	Comercial	NA 84-3419	S23 15.543 W64 20.876	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-54	JX237886	Tabacal	D14	Comercial	NA 84-3419	S23 15.543 W64 20.876	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-55	JX237887	Tabacal	D14	Comercial	NA 84-3419	S23 15.543 W64 20.876	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-63	JX237888	Tabacal	C69	Comercial	NA 84-3419	S23 13.138 W64 20.509	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-64	JX237889	Tabacal	C69	Comercial	NA 84-3419	S23 13.138 W64 20.509	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-65	JX237890	Tabacal	C69	Comercial	NA 84-3419	S23 13.138 W64 20.509	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-73	JX237891	Tabacal	C29	Comercial	NA 84-3419	S23 12.665 W64 19.002	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-74	JX237892	Tabacal	C29	Comercial	NA 84-3419	S23 12.665 W64 19.002	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-75	-	Tabacal	C29	Comercial	NA 84-3419	S23 12.665 W64 19.002	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-83	JX237893	Tabacal	C49	Comercial	NA 84-3419	S23 11.140 W64 19.174	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-84	JX237894	Tabacal	C49	Comercial	NA 84-3419	S23 11.140 W64 19.174	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-85	JX237895	Tabacal	C49	Comercial	NA 84-3419	S23 11.140 W64 19.174	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-93	-	Tabacal	G17	Comercial	NA 84-3419	S23 10.504 W64 26.100	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-94	JX237896	Tabacal	G17	Comercial	NA 84-3419	S23 10.504 W64 26.100	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-95	JX237897	Tabacal	G17	Comercial	NA 84-3419	S23 10.504 W64 26.100	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-103	JX237898	Tabacal	G70	Comercial	NA 84-3419	S23 12.669 W64 27.014	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-104	JX237899	Tabacal	G70	Comercial	NA 84-3419	S23 12.669 W64 27.014	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-105	-	Tabacal	G70	Comercial	NA 84-3419	S23 12.669 W64 27.014	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-108	JX237900	Tabacal	G26	Comercial	NA 84-3013	S23 13.853 W64 25.452	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-109	JX237901	Tabacal	G26	Comercial	NA 84-3013	S23 13.853 W64 25.452	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-110	JX237902	Tabacal	G26	Comercial	NA 84-3013	S23 13.853 W64 25.452	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-118	JX237903	Tabacal	H69	Comercial	NA 84-3419	S23 14.563 W64 24.410	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-119	JX237904	Tabacal	H69	Comercial	NA 84-3419	S23 14.563 W64 24.410	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-120	JX237905	Tabacal	H69	Comercial	NA 84-3419	S23 14.563 W64 24.410	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-128	JX237906	Tabacal	K23	Experimental	NA 96-122	S23 18.361 W64 17.017	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-129	JX237907 JX237864 JX238322	Tabacal	K23	Experimental	NA 96-122	S23 18.361 W64 17.017	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-130	JX237908 JX237868 JX238323	Tabacal	K23	Experimental	NA 96-122	S23 18.361 W64 17.017	30/10/2007	+	-		SCMV-W	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-131	JX237909 JX237869 JX238324	Tabacal	K23	Experimental	NA 96-122	S23 18.361 W64 17.017	30/10/2007	+	-		SCMV-W	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-132	-	Tabacal	K23	Experimental	NA 96-122	S23 18.361 W64 17.017	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-133	-	Tabacal	K23	Experimental	NA 96-122	S23 18.361 W64 17.017	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-138	JX237910	Tabacal	K43	Comercial	NA 84-3419	S23 18.554 W64 17.040	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-139	JX237911	Tabacal	K43	Comercial	NA 84-3419	S23 18.554 W64 17.040	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-140	JX237912	Tabacal	K43	Comercial	NA 84-3419	S23 18.554 W64 17.040	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-148	JX237913	Tabacal	K70	Comercial	NA 84-3419	S23 18.655 W64 20.198	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-149	JX237914	Tabacal	K70	Comercial	NA 84-3419	S23 18.655 W64 20.198	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-150	JX237915	Tabacal	K70	Comercial	NA 84-3419	S23 18.655 W64 20.198	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-158	JX237916	Tabacal	K30	Comercial	NA 84-3013	S23 18.094 W64 20.212	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-159	JX237917	Tabacal	K30	Comercial	NA 84-3013	S23 18.094 W64 20.212	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-160	JX237918	Tabacal	K30	Comercial	NA 84-3013	S23 18.094 W64 20.212	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-168	JX237919	Tabacal	K34	Comercial	NA 84-3013	S23 17.829 W64 22.150	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-169	-	Tabacal	K34	Comercial	NA 84-3013	S23 17.829 W64 22.150	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-170	JX237920	Tabacal	K34	Comercial	NA 84-3013	S23 17.829 W64 22.150	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-178	JX237921	Tabacal	K07	Comercial	NA 84-3013	S23 17.709 W64 18.867	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-179	JX237922	Tabacal	K07	Comercial	NA 84-3013	S23 17.709 W64 18.867	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-180	JX237923	Tabacal	K07	Comercial	NA 84-3013	S23 17.709 W64 18.867	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-188	-	Tabacal	K06	Comercial	NA 91-383	S23 17.764 W64 18.401	30/10/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-189	JX237924	Tabacal	K06	Comercial	NA 91-383	S23 17.764 W64 18.401	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-190	JX237925	Tabacal	K06	Comercial	NA 91-383	S23 17.764 W64 18.401	30/10/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-198	JX237926	Abra Grande	I 14	Comercial	NA 91-383	S23 03.514 W64 24.751	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-199	JX237927	Abra Grande	I 14	Comercial	NA 91-383	S23 03.514 W64 24.751	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-200	JX237928	Abra Grande	I 14	Comercial	NA 91-383	S23 03.514 W64 24.751	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-208	JX237929	Abra Grande	I 14	Comercial	NA 84-3013	S23 03.365 W64 24.462	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-209	JX237930	Abra Grande	I 14	Comercial	NA 84-3013	S23 03.365 W64 24.462	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-210	JX237931	Abra Grande	I 14	Comercial	NA 84-3013	S23 03.365 W64 24.462	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-218	JX237932	Abra Grande	I19	Comercial	NA 84-3013	S23 03.684 W64 24.144	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-219	-	Abra Grande	I19	Comercial	NA 84-3013	S23 03.684 W64 24.144	01/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-220	JX237933	Abra Grande	I19	Comercial	NA 84-3013	S23 03.684 W64 24.144	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-228	JX237934	Abra Grande	I15	Comercial	NA 84-3419	S23 03.437 W64 23.667	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-229	JX237935	Abra Grande	I15	Comercial	NA 84-3419	S23 03.437 W64 23.667	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-230	JX237936	Abra	I15	Comercial	NA 84-3419	S23 03.437 W64 23.667	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	

		Grande										
ARG-238	JX237937	Abra Grande	I24	Comercial	NA 84-3419	S23 03.158 W64 23.134	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-239	JX237938	Abra Grande	I24	Comercial	NA 84-3419	S23 03.158 W64 23.134	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-240	JX237939	Abra Grande	I24	Comercial	NA 84-3419	S23 03.158 W64 23.134	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-248	JX237940	Abra Grande	J02	Comercial	NA 84-3013	S22 57.608 W64 25.099	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-249	JX237941	Abra Grande	J02	Comercial	NA 84-3013	S22 57.608 W64 25.099	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-250	JX237942	Abra Grande	J02	Comercial	NA 84-3013	S22 57.608 W64 25.099	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-258	-	Abra Grande	J20	Comercial	NA 91-383	S22 59.445 W64 24.620	01/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-259	JX237943	Abra Grande	J20	Comercial	NA 91-383	S22 59.445 W64 24.620	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-260	JX237944	Abra Grande	J20	Comercial	NA 91-383	S22 59.445 W64 24.620	01/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-268	JX237945	Abra Grande	-	Comercial	NA 91-383	S23 01.481 W64 22.605	05/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-269	JX237946	Abra Grande	-	Comercial	NA 91-383	S23 01.481 W64 22.605	05/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-270	JX237947	Abra Grande	-	Comercial	NA 91-383	S23 01.481 W64 22.605	05/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-280	JX237948	Abra Grande	-	Comercial	NA 97-3152?	S23 01.501 W64 22.596	05/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-281	JX237951	Chacra	Desmonte, Ens. 95	Experimental	NA 94-1060	S23 22.914 W64 24.387	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-282	-	Chacra	Desmonte, Ens. 95	Experimental	NA 94-1060	S23 22.914 W64 24.387	06/11/2007	-	-	-		No se dispone de información de secuencia
ARG-286	JX237952	Chacra	Desmonte, Ens. 96	Experimental	NA 84-3013	S23 22.914 W64 24.387	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-287	JX237953	Chacra	Desmonte, Ens. 96	Experimental	NA 84-3013	S23 22.914 W64 24.387	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-291	JX237954	Chacra	Desmonte, Ens. 99	Experimental	CP 72-2086	S23 22.914 W64 24.387	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-292	JX237955	Chacra	Desmonte, Ens. 99	Experimental	CP 72-2086	S23 22.914 W64 24.387	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-296	JX237956	Chacra	Desmonte, Colección	Experimental	NA 86-2280?	S23 23.894 W64 23.568	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-297	-	Chacra	Desmonte, Colección	Experimental	NA 86-2280?	S23 23.894 W64 23.568	06/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-301	-	Chacra	Campamento, Ens 93	Experimental	CP 72-2086	S23 24.238 W64 26.354	06/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-302	JX237957	Chacra	Campamento, Ens 93	Experimental	CP 72-2086	S23 24.238 W64 26.354	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-306	JX237958	Chacra	Campamento, Ens 98	Experimental	NA 98-1432	S23 24.238 W64 26.354	06/11/2007	-	-	+	SCMV-MZ	
ARG-307	JX237959	Chacra	Campamento, Ens 98	Experimental	NA 98-1432	S23 24.238 W64 26.354	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-308	JX238337 JX238325	Chacra	Campamento, Ens 98	Experimental	NA 98-1432	S23 24.238 W64 26.354	06/11/2007	-	-	+	SCMV-MZ	Clasificación basada en unas 300 pb de CP y P3 parcial

ARG-334	JX237960	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 52-68	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-335	JX237961	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 52-68	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-340	JX237962	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 65-357	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-341	JX237963	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 65-357	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-345	JX237964 JX237865 JX238326	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 85-1625	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-346	-	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 85-1625	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	-	-	-		No se dispone de información de secuencia
ARG-349	-	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	CP 85-1625	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	-	-	-		No se dispone de información de secuencia
ARG-350	JX237965 JX238327	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	FAM 80-112	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	CP y P3 parcial
ARG-351	JX237966	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	FAM 80-112	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-356	JX237967	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	NA 84-2593	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-357	JX237968	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	NA 84-2593	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-361	JX237969	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 71-7	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-362	JX237970	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 71-7	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-366	JX237971	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 85-35	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-367	JX237972	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 85-35	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-371	-	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	L 61-43	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-372	-	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	L 61-43	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-376	JX237973	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 70-9	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-377	JX237974	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 70-9	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-381	JX237975	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 71-1262	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-382	JX237976	Chacra	Desmote, Colección	Experimental	TUC 71-1262	S23 24.079 W64 23.516	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-386	JX237977	Chacra	Chacra Base	Experimental	NA 88-948	S23 22.364 W64 28.194	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-387	JX237978	Chacra	Chacra Base	Experimental	NA 76-128	S23 22.364 W64 28.194	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-388	JX237979	Chacra	Chacra Base	Experimental	NA 87-838	S23 22.364 W64 28.194	06/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-389	-	Chacra	Chacra Base	Experimental	FAM 88-460	S23 22.364 W64 28.194	06/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-390	-	Chacra	Chacra Base	Experimental	CP 65-357	S23 22.364 W64 28.194	06/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
BOL-396	JX237980	Bolivia, Bermejo	Barretero	Comercial	CP 48-103	S22 36.099 W64 15.353	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-397	JX237981	Bolivia, Bermejo	Barretero	Comercial	CP 48-103	S22 36.099 W64 15.353	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-398	JX237982	Bolivia, Bermejo	Barretero	Comercial	CP 48-103	S22 36.099 W64 15.353	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-399	JX237983	Bolivia, Bermejo	Barretero	Comercial	CP 48-103	S22 36.099 W64 15.353	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-406	-	Bolivia, Bermejo	Colonia Linares	Comercial	CP 48-103	S22 38.960 W64 16.172	08/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia

BOL-407	JX237984	Bolivia, Bermejo	Colonia Linares	Comercial	CP 48-103	S22 38.960 W64 16.172	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-408	JX237985	Bolivia, Bermejo	Colonia Linares	Comercial	CP 48-103	S22 38.960 W64 16.172	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-409	JX237986	Bolivia, Bermejo	Colonia Linares	Comercial	CP 48-103	S22 38.960 W64 16.172	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-418	JX237987	Bolivia, Bermejo	Ingenio IABSA	Comercial	CP 65-357	S22 42.838 W64 16.923	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-419	JX237988	Bolivia, Bermejo	Ingenio IABSA	Comercial	CP 65-357	S22 42.838 W64 16.923	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-420	JX237989	Bolivia, Bermejo	Ingenio IABSA	Comercial	CP 65-357	S22 42.838 W64 16.923	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-421	JX237990	Bolivia, Bermejo	Ingenio IABSA	Comercial	?	S22 43.113 W64 17.173	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-422	JX237991	Bolivia, Bermejo	Ingenio IABSA	Comercial	?	S22 43.113 W64 17.173	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
BOL-423	JX237992	Bolivia, Bermejo	Ingenio IABSA	Comercial	?	S22 43.113 W64 17.173	08/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-426	JX237993	Ledesma	Paulina, 18-4-1	Comercial	CP 70-1133	S23 50.101 W64 45.170	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-427	JX237994	Ledesma	Paulina, 18-4-1	Comercial	CP 70-1133	S23 50.101 W64 45.170	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-428	JX237995	Ledesma	Paulina, 18-4-1	Comercial	CP 70-1133	S23 50.101 W64 45.170	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-436	-	Ledesma	Paulina, 18-5-9	Comercial	CP 70-1133	S23 50.250 W64 44.347	20/11/2007	-	-	+		No se dispone de información de secuencia
ARG-437	JX237996	Ledesma	Paulina, 18-5-9	Comercial	CP 70-1133	S23 50.250 W64 44.347	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-438	JX237997	Ledesma	Paulina, 18-5-9	Comercial	CP 70-1133	S23 50.250 W64 44.347	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-446	JX237998	Ledesma	Paulina, 21-2-1	Comercial	CP 70-1133	S23 51.191 W64 44.034	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-447	JX237999	Ledesma	Paulina, 21-2-1	Comercial	CP 70-1133	S23 51.191 W64 44.034	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-448	JX238000	Ledesma	Paulina, 21-2-1	Comercial	CP 70-1133	S23 51.191 W64 44.034	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-456	JX238001	Ledesma	Paulina 18-1-18	Comercial	CP 72-2086	S23 50.607 W64 45.354	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-457	JX238002	Ledesma	Paulina 18-1-18	Comercial	CP 72-2086	S23 50.607 W64 45.354	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-458	JX238003	Ledesma	Paulina 18-1-18	Comercial	CP 72-2086	S23 50.607 W64 45.354	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-466	JX238004	Ledesma	Paulina, parcel 10	Comercial	CP 70-1133	S23 50.053 W64 46.723	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-467	JX238005	Ledesma	Paulina, parcel 10	Comercial	CP 70-1133	S23 50.053 W64 46.723	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-468	JX238006	Ledesma	Paulina, parcel 10	Comercial	CP 70-1133	S23 50.053 W64 46.723	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-476	JX238007	Ledesma	Florencia 06-05-40	Comercial	CP 70-1133	S23 52.775 W64 48.781	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-477	JX238008	Ledesma	Florencia 06-05-31	Comercial	CP 72-2086	S23 53.212 W64 49.151	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-478	JX238009	Ledesma	Florencia 06-05-31	Comercial	CP 72-2086	S23 53.212 W64 49.151	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-479	JX238010	Ledesma	Florencia 06-05-31	Comercial	CP 72-2086	S23 53.212 W64 49.151	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-487	JX238011	Ledesma	Florencia, 16-06-47	Comercial	CP 72-2086	S23 56.933 W64 47.930	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-488	JX238012	Ledesma	Florencia, 16-06-47	Comercial	CP 72-2086	S23 56.933 W64 47.930	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-489	JX238013	Ledesma	Florencia, 16-06-47	Comercial	CP 72-2086	S23 56.933 W64 47.930	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-497	JX238014	Ledesma	Florencia, 20-03-25	Comercial	CP 70-1133	S23 54.766 W64 45.776	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-498	-	Ledesma	Florencia, 20-03-25	Comercial	CP 70-1133	S23 54.766 W64 45.776	20/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-499	JX238015	Ledesma	Florencia, 20-03-25	Comercial	CP 70-1133	S23 54.766 W64 45.776	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-507	JX238016	Ledesma	San Lorenzo 16-1-33	Comercial	CP 72-2086	S23 45.499 W64 43.911	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-508	JX238017	Ledesma	San Lorenzo 16-1-33	Comercial	CP 72-2086	S23 45.499 W64 43.911	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-509	JX238018	Ledesma	San Lorenzo 16-1-33	Comercial	CP 72-2086	S23 45.499 W64 43.911	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-517	JX238019	Ledesma	San Lorenzo 23-05-06	Comercial	CP 70-1133	S23 45.984 W64 42.736	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-518	JX238020	Ledesma	San Lorenzo 23-05-06	Comercial	CP 70-1133	S23 45.984 W64 42.736	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-519	JX238021	Ledesma	San Lorenzo 23-05-06	Comercial	CP 70-1133	S23 45.984 W64 42.736	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-527	JX238022	Ledesma	San Lorenzo 15-03-49	Comercial	CP 72-2086	S23 45.767 W64 45.486	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-528	JX238023	Ledesma	San Lorenzo 15-03-49	Comercial	CP 72-2086	S23 45.767 W64 45.486	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-529	JX238024	Ledesma	San Lorenzo 15-03-49	Comercial	CP 72-2086	S23 45.767 W64 45.486	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-537	JX238025	Ledesma	San Lorenzo 19-03-19	Comercial	CP 70-1133	S23 46.419 W64 46.937	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-538	JX238026	Ledesma	San Lorenzo 19-03-19	Comercial	CP 70-1133	S23 46.419 W64 46.937	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-539	JX238027	Ledesma	San Lorenzo 19-03-19	Comercial	CP 70-1133	S23 46.419 W64 46.937	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-545	JX238338	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	Q190	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	-	-	+	SrMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP
ARG-546	JX238339	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	Q190	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	-	-	+	SrMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP
ARG-550	JX238028	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 85-1602	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-551	JX238029	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 85-1602	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-552	JX238030	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 85-1602	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-555	JX238031	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-652	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-556	JX238032	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-652	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-560	JX238033	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-737	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-561	JX238034	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-737	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-565	JX238035	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-979	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-566	JX238036	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-979	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-570	JX238037	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1168	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-571	JX238038	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1168	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-575	JX238039	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 85-1602	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-576	JX238040	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 85-1602	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-580	JX238041	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1051	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-581	JX238042	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1051	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-582	JX238043	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1051	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-583	JX238044	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1051	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-586	JX238045	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1571	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-587	JX238046	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-1571	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-591	JX238047	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-2668	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-592	-	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 03-2668	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-596	JX238048	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-305	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-597	JX238049	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-305	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-601	JX238050	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-561	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-602	JX238051	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-561	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-606	JX238052	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-1278	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-607	JX238053	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-1278	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-611	JX238340	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-1535	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	-	-	+	SrMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP
ARG-612	JX238341	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-1535	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	-	-	+	SrMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP
ARG-616	JX238054	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-2137	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-617	JX238055	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-2137	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-618	JX238056	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-2137	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-622	JX238057	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	CP 72-2086	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-623	JX238058	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	CP 72-2086	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-624	JX238059	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	CP 72-2086	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-627	JX238060 JX237866 JX238328	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-2520	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-628	JX238061	Ledesma	Yapeyú, Colección	Experimental	NA 01-2520	S23 45.669 W64 46.684	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-630	JX238062	Ledesma	Caimán 04-01-08	Comercial	NA 85-1602	S23 44.507 W64 38.459	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-631	JX238063	Ledesma	Caimán 04-01-08	Comercial	NA 85-1602	S23 44.507 W64 38.459	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-632	JX238064	Ledesma	Caimán 04-01-08	Comercial	NA 85-1602	S23 44.507 W64 38.459	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-643	JX238065	Ledesma	Caimán 05-04-79	Comercial	NA 85-1602	S23 44.474 W64 38.151	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-644	JX238066	Ledesma	Caimán 05-04-79	Comercial	NA 85-1602	S23 44.474 W64 38.151	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-645	JX238067	Ledesma	Caimán 05-04-79	Comercial	NA 85-1602	S23 44.474 W64 38.151	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-653	-	Ledesma	Caimán 03-03-40	Comercial	NA 85-1602	S23 44.688 W64 39.373	20/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-654	-	Ledesma	Caimán 03-03-40	Comercial	NA 85-1602	S23 44.688 W64 39.373	20/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-655	JX238068	Ledesma	Caimán 03-03-40	Comercial	NA 85-1602	S23 44.688 W64 39.373	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-663	-	Ledesma	Caimán 02-04-58	Comercial	CP 72-2086	S23 44.930 W64 40.698	20/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-664	JX238069	Ledesma	Caimán 02-04-58	Comercial	CP 72-2086	S23 44.930 W64 40.698	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-665	JX238070	Ledesma	Caimán 02-04-58	Comercial	CP 72-2086	S23 44.930 W64 40.698	20/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-684	JX238071	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 88-1568	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-685	JX238072	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 88-1568	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-686	JX238073	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 88-1568	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-694	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1438	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-695	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1438	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-696	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1438	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-704	JX238074	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-1729	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-705	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-1729	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-709	JX238075	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	L 75-33	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-710	JX238076	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	L 75-33	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-711	JX238077	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	L 75-33	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-719	JX238078	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-375	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-720	JX238079	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-375	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-721	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-375	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-734	JX238080	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 85-1602	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-735	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 85-1602	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-736	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 85-1602	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-738	JX238081	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 01-292	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-739	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 01-292	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-740	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 01-292	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-747	JX238082	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-514	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-748	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-514	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-749	JX238083	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 02-514	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-757	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1447	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-758	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1447	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-759	-	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1447	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-767	JX238084	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1996	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-768	JX238085	Río Grande	Unidad de Manejo 7B	Experimental	NA 98-1996	S24 19.606 W64 49.471	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-772	JX238086	Río Grande		Comercial	L 75-33	S24 20.546 W64 48.717	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-773	-	Río Grande		Comercial	L 75-33	S24 20.546 W64 48.717	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-774	JX238087	Río Grande		Comercial	L 75-33	S24 20.546 W64 48.717	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-782	JX238088	Piquete		Comercial	CP 70-1133	S24 08.916 W64 40.887	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-783	JX238089	Piquete		Comercial	CP 70-1133	S24 08.916 W64 40.887	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-784	JX238090	Piquete	1-4-236	Comercial	CP 70-1133	S24 09.735 W64 40.498	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-785	JX238342	Piquete	1-4-236	Comercial	CP 70-1133	S24 09.735 W64 40.498	22/11/2007	-	-	+	SCMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP
ARG-786	-	Piquete	7-6	Comercial	TUC 67-24	S24 07.648 W64 40.805	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-787	JX238091	Piquete	7-6	Comercial	TUC 67-24	S24 07.648 W64 40.805	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-788	JX238092	Piquete	7-6	Comercial	TUC 67-24	S24 07.648 W64 40.805	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-796	JX238093	Piquete	11-04-10	Comercial	TUC 67-24	S24 05.358 W64 40.690	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-797	JX238094	Piquete	11-04-10	Comercial	TUC 67-24	S24 05.358 W64 40.690	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-801	JX238095	Piquete	15-02-04	Comercial	CP 72-2086	S24 05.032 W64 36.621	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-802	JX238096	Piquete	15-02-04	Comercial	CP 72-2086	S24 05.032 W64 36.621	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-803	JX238097	Piquete	15-02-04	Comercial	CP 72-2086	S24 05.032 W64 36.621	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-811	-	Piquete	15-9-109	Experimental	CP 70-1133	S24 07.100 W64 37.206	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuancia
ARG-812	JX238098	Piquete	15-9-109	Experimental	CP 70-1133	S24 07.100 W64 37.206	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-813	JX238099	Piquete	15-9-109	Experimental	CP 70-1133	S24 07.100 W64 37.206	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-821	JX238100	Piquete	15-9-109	Experimental	TUC 67-24	S24 07.100 W64 37.206	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-822	-	Piquete	15-9-109	Experimental	TUC 67-24	S24 07.100 W64 37.206	22/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuancia
ARG-823	JX238101	Piquete	15-9-109	Experimental	TUC 67-24	S24 07.100 W64 37.206	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-839	JX238102	Piquete	9-2-43	Comercial	CP 72-2086	S24 06.689 W64 39.725	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-840	JX238103	Piquete	9-2-43	Comercial	CP 72-2086	S24 06.689 W64 39.725	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-841	JX238104	Piquete	9-2-43	Comercial	CP 72-2086	S24 06.689 W64 39.725	22/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-854	JX238105	San Isidro	San Antonio	Comercial	CP 72-370	S24 41.452 W65 02.637	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-855	JX238106	San Isidro	San Antonio	Comercial	CP 72-370	S24 41.452 W65 02.637	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-856	JX238107	San Isidro	San Antonio	Comercial	CP 72-370	S24 41.452 W65 02.637	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-869	JX238108	San Isidro	Desmorte 9	Comercial	NA 76-128	S24 44.512 W65 02.643	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-870	JX238109	San Isidro	Desmorte 9	Comercial	NA 76-128	S24 44.512 W65 02.643	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-871	JX238110	San Isidro	Desmorte 9	Comercial	NA 76-128	S24 44.512 W65 02.643	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-879	JX238111	San Isidro	Desmorte 8 B	Comercial	CP 65-357	S24 46.081 W65 02.047	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-880	JX238112	San Isidro	Desmorte 8 B	Comercial	CP 65-357	S24 46.081 W65 02.047	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-881	JX238113	San Isidro	Desmorte 8 B	Comercial	CP 65-357	S24 46.081 W65 02.047	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-889	JX238114	San Isidro	A Norte	Comercial	CP 65-357	S24 46.081 W65 02.046	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-890	JX238115	San Isidro	A Norte	Comercial	CP 65-357	S24 46.081 W65 02.046	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-891	JX238116	San Isidro	A Norte	Comercial	CP 65-357	S24 46.081 W65 02.046	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-899	JX238117	San Isidro	Via Norte 3	Comercial	CP 65-357	S24 40.841 W65 02.363	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-900	JX238118	San Isidro	Via Norte 3	Comercial	CP 65-357	S24 40.841 W65 02.363	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-901	JX238119	San Isidro	Via Norte 3	Comercial	CP 65-357	S24 40.841 W65 02.363	27/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-914	JX238120 JX237867 JX238329	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-915	JX237863	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-		SCMV-W	Genoma completamente secuenciado
ARG-916	JX238122	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-917	-	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuancia
ARG-918	-	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuancia
ARG-919	JX238343	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	-	-	+	SCMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP

ARG-920	-	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-921	JX238344	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	-	-	+	SCMV	Clasificación basada en unas 300 pb de CP
ARG-922	-	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-923	-	El Talar	13-07-62	Comercial	CP 70-1133	S23 33.703 W64 21.163	30/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-925	JX238123	El Talar	14-03-35	Comercial	CP 70-1133	S23 33.132 W64 20.665	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-926	JX238124	El Talar	14-03-35	Comercial	CP 70-1133	S23 33.132 W64 20.665	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-927	JX238125	El Talar	14-03-35	Comercial	CP 70-1133	S23 33.132 W64 20.665	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-936	JX238126 JX237870 JX238331	El Talar	15-05	Comercial	CP 70-1133	S23 31.562 W64 19.332	30/11/2007	+	-		SCMV-W	CP, extremo 3' del genoma, y P3 parcial
ARG-937	JX238127	El Talar	15-05	Comercial	CP 70-1133	S23 31.562 W64 19.332	30/11/2007	+	-		SCMV-W	
ARG-938	JX238128	El Talar	27-1-3	Comercial	CP 70-1133	S23 33.699 W64 16.175	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-939	JX238129	El Talar	27-1-3	Comercial	CP 70-1133	S23 33.699 W64 16.175	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-940	JX238130	El Talar	27-1-3	Comercial	CP 70-1133	S23 33.699 W64 16.175	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-949	JX238131	El Talar	28-7-8 y 9	Comercial	CP 70-1133	S23 33.562 W64 15.909	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-950	JX238132 and JX238332	El Talar	28-7-8 y 9	Comercial	CP 70-1133	S23 33.562 W64 15.909	30/11/2007	+	-		SCMV-W	CP y P3 parcial
ARG-951	JX238133	El Talar	28-7-8 y 9	Comercial	CP 70-1133	S23 33.562 W64 15.909	30/11/2007	+	-		SCMV-W	
ARG-952	JX238134	El Talar	28-7-8 y 9	Comercial	CP 70-1133	S23 33.562 W64 15.909	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-962	JX238135	El Talar	12-04-51	Comercial	NA 97-3152	S23 34.218 W64 20.255	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-963	JX238136	El Talar	12-04-51	Comercial	NA 97-3152	S23 34.218 W64 20.255	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-964	JX238137	El Talar	12-04-51	Comercial	NA 97-3152	S23 34.218 W64 20.255	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-965	JX238138	El Talar	12-04-51	Comercial	NA 97-3152	S23 34.218 W64 20.255	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-976	JX238139	El Talar		Experimental	NA 97-2793	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-977	JX238140	El Talar		Experimental	NA 97-2793	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-W	
ARG-978	JX238141	El Talar		Experimental	NA 97-2793	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-979	JX238142	El Talar		Experimental	Bordura	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-980	JX238143	El Talar		Experimental	NA 97-2793	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-981	JX238144	El Talar		Experimental	NA 97-2793	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-W	
ARG-982	-	El Talar		Experimental	NA 85-1602	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-983	JX238145	El Talar		Experimental	NA 85-1602	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-984	JX238146	El Talar		Experimental	NA 97-3152	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-985	JX099772	El Talar		Experimental	NA 97-3152	S23 33.072 W64 20.091	30/11/2007	-	+		SrMV	
ARG-986	JX238147	Tucumán	Fronterita	Comercial	CP 65-357	S27 03.810 W65 28.316	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-987	JX238148	Tucumán	Fronterita	Comercial	CP 65-357	S27 03.810 W65 28.316	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-988	JX238149	Tucumán	Fronterita	Comercial	CP 65-357	S27 03.810 W65 28.316	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-996	JX238150	Tucumán	Leon Rouges	Comercial	CP 65-357	S27 14.331 W65 31.343	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-997	JX238151	Tucumán	Leon Rouges	Comercial	CP 65-357	S27 14.331 W65 31.343	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-998	JX238152	Tucumán	Leon Rouges	Comercial	CP 65-357	S27 14.331 W65 31.343	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1006	JX238153	Tucumán	Simoca	Comercial	L 75-33	S27 14.545 W65 24.977	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1007	JX238154	Tucumán	Simoca	Comercial	L 75-33	S27 14.545 W65 24.977	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1008	JX238155	Tucumán	Simoca	Comercial	L 75-33	S27 14.545 W65 24.977	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1016	JX238156	Tucumán	Simoca	Comercial	CP 65-357	S27 14.545 W65 24.977	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1017	JX238157	Tucumán	Simoca	Comercial	CP 65-357	S27 14.545 W65 24.977	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1018	-	Tucumán	Simoca	Comercial	CP 65-357	S27 14.545 W65 24.977	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1031	JX238158	Tucumán	Rio Colorado	Comercial	CP 65-357	S27 08.239 W65 20.949	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1032	JX238159	Tucumán	Rio Colorado	Comercial	CP 65-357	S27 08.239 W65 20.949	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1033	JX238160	Tucumán	Rio Colorado	Comercial	CP 65-357	S27 08.239 W65 20.949	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1041	JX238161	Tucumán	Bella Vista	Comercial	CP 65-357	S27 01.756 W65 17.568	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1042	JX238162	Tucumán	Bella Vista	Comercial	CP 65-357	S27 01.756 W65 17.568	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1043	JX238163	Tucumán	Bella Vista	Comercial	CP 65-357	S27 01.756 W65 17.568	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1051	JX238164	Tucumán	Lules	Comercial	CP 65-357	S26 56.417 W65 17.644	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1052	JX238165	Tucumán	Lules	Comercial	CP 65-357	S26 56.417 W65 17.644	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1053	JX238166	Tucumán	Lules	Comercial	CP 65-357	S26 56.417 W65 17.644	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1066	JX238167	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	CP 65-357	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1067	JX238168	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	CP 65-357	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1068	JX238169	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	CP 65-357	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1076	JX238170	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	NA 63-90	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1077	-	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	NA 63-90	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1078	-	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	NA 63-90	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1086	-	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	L 75-33	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1087	-	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	L 75-33	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1088	JX238171	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	L 75-33	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1096	JX238172	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	NA 85-1602	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1097	JX238173	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	NA 85-1602	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1098	JX238174	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	NA 85-1602	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1106	JX238175	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	RA 87-3	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1107	JX238176	Tucumán	INTA Famailla	Experimental	RA 87-3	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1112	JX238180	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CADMOS	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1113	JX238181	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CADMOS	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1117	JX238182	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 62-258	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1118	JX238183	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 62-258	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-1122	JX238184	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	PIMDER	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1123	JX238185	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	PIMDER	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1127	-	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 64-313	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1128	JX238186	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 64-313	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1132	JX238187	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CB 40-69	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1133	JX238188	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CB 40-69	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1137	JX238189	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 65-312	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1138	JX238190	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 65-312	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1142	-	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 80-1557	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1143	-	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 80-1557	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1147	JX238191	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CO 527	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1148	JX238192	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CO 527	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1152	JX099771	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 75-319	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	+		SrMV	No se dispone de información de secuencia para SCMV
ARG-1153	JX099770	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 75-319	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	-	+		SrMV	
ARG-1154	JX099769	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 75-319	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	-	+		SrMV	
ARG-1155	JX238193 JX099768	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 75-319	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	+		SCMV-SCE / SrMV	SCMV y SrMV
ARG-1156	JX099767	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	CP 75-319	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	-	+		SrMV	
ARG-1157	JX238194	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	HoCP 91-559	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1158	JX238195	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	HoCP 91-559	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1162	JX238196	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	FAM 81-276	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1163	JX238197	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	FAM 81-276	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1167	JX238198	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	M 377-56	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1168	JX238199	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	M 377-56	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1172	JX238200	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	Mex 31-45	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1173	JX238201	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	Mex 31-45	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1177	JX238202	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 56-26	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1178	-	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 56-26	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1182	JX238203	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 56-30	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1183	JX238204	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 56-30	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1187	JX238205	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 81-10	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1188	JX238206	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 81-10	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1192	JX238207	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 80-7	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1193	JX238208	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 80-7	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1197	JX238209	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 79-18	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-1198	-	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 79-18	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1202	JX238210	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 78-2	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1203	JX238211	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	TUC 78-2	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1207	JX238212	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 84-3013	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1208	JX238213	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	NA 84-3013	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1212	JX238214	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	L 60-25	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1213	JX238215	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	L 60-25	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1217	-	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	FAM 86-275	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1218	JX238216	Tucumán	INTA Famailla, Colección	Experimental	FAM 86-275	S27 00.961 W65 22.852	10/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1227	-	Tucumán	Alberdi	Comercial	CP 65-357	S27 34.144 W65 36.880	11/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1228	JX238217	Tucumán	Alberdi	Comercial	CP 65-357	S27 34.144 W65 36.880	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1229	JX238218	Tucumán	Alberdi	Comercial	CP 65-357	S27 34.144 W65 36.880	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1237	-	Tucumán	Los Córdoba	Comercial	CP 65-357	S27 29.756 W65 35.596	11/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1238	JX238219	Tucumán	Los Córdoba	Comercial	CP 65-357	S27 29.756 W65 35.596	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1239	-	Tucumán	Los Córdoba	Comercial	CP 65-357	S27 29.756 W65 35.596	11/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1252	JX238220	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	CP 65-357	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1253	JX238221	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	CP 65-357	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1254	JX238222	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	CP 65-357	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1262	JX238223	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-64	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1263	JX238224	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-64	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1264	JX238225	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-64	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1272	JX238226	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-59	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1273	JX238227	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-59	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1274	JX238228	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-59	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1282	JX238229	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-22	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1283	JX238230	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-22	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1284	JX238231	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-22	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1292	JX238232	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-13	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1293	JX238233	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-13	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1297	JX238234	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 99-19	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1298	JX238235	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 99-19	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1299	JX238236	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 99-19	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1307	JX238237	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-17	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1308	JX238238	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-17	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1309	JX238239	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 00-17	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1317	JX238240	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-14	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-1318	JX238241 JX238333	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-14	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	CP y P3 parcial
ARG-1320	JX238242	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-08	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1321	JX238243	Tucumán	EEAOC, Santa Ana	Experimental	TUC 01-08	S27 28.455 W65 40.556	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1325	-	Tucumán	Ingenio Trinidad	Comercial	CP 65-357	S27 22.712 W65 33.096	11/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1326	JX238244	Tucumán	Ingenio Trinidad	Comercial	CP 65-357	S27 22.712 W65 33.096	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1327	JX238245	Tucumán	Ingenio Trinidad	Comercial	CP 65-357	S27 22.712 W65 33.096	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1340	JX238246	Tucumán	Piedritas	Comercial	CP 65-357	S26 46.940 W65 07.079	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1341	JX238247	Tucumán	Piedritas	Comercial	CP 65-357	S26 46.940 W65 07.079	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1342	JX238248	Tucumán	Piedritas	Comercial	CP 65-357	S26 46.940 W65 07.079	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1356	JX238249	Tucumán	Macomitas	Comercial	CP 65-357	S26 45.512 W64 58.470	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1357	JX238250	Tucumán	Macomitas	Comercial	CP 65-357	S26 45.512 W64 58.470	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1358	JX238251	Tucumán	Macomitas	Comercial	CP 65-357	S26 45.512 W64 58.470	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1366	JX238252	Tucumán	Los Ralos	Comercial	CP 65-357	S26 53.108 W64 57.057	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1367	JX238253	Tucumán	Los Ralos	Comercial	CP 65-357	S26 53.108 W64 57.057	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1368	JX238254	Tucumán	Los Ralos	Comercial	CP 65-357	S26 53.108 W64 57.057	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1376	JX238255	Tucumán	El Empalme	Comercial	CP 65-357	S26 58.522 W65 00.742	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1377	JX238256	Tucumán	El Empalme	Comercial	CP 65-357	S26 58.522 W65 00.742	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1378	JX238257	Tucumán	El Empalme	Comercial	CP 65-357	S26 58.522 W65 00.742	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1386	JX238258	Tucumán	San Miguel	Comercial	CP 65-357	S26 54.057 W65 07.020	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1387	JX238259	Tucumán	San Miguel	Comercial	CP 65-357	S26 54.057 W65 07.020	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1388	JX238260	Tucumán	San Miguel	Comercial	CP 65-357	S26 54.057 W65 07.020	11/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1406	JX238261	Tucumán	EEAOC	Experimental	CP 65-357	S26 50.624 W65 07.607	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1407	-	Tucumán	EEAOC	Experimental	CP 65-357	S26 50.624 W65 07.607	12/12/2007	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1416	JX238262	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 00-64	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1417	JX238263	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 00-64	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1418	JX238264	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 00-64	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1426	JX238265	Tucumán	EEAOC	Experimental	CP 65-357	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1427	JX238266	Tucumán	EEAOC	Experimental	CP 65-357	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1428	JX238267	Tucumán	EEAOC	Experimental	CP 65-357	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1436	JX238268	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 01-22	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1437	JX238269	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 01-22	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1438	JX238270	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 01-22	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1446	-	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 95-24	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	-	-	-		No se dispone de información de secuencia
ARG-1447	JX099766	Tucumán	EEAOC	Experimental	TUC 95-24	S26 50.859 W65 07.489	12/12/2007	-	+		SrMV	
ARG-1448	JX238271	Tucumán	EEAOC, Colección	Experimental	L 75-33	S26 47.435 W65 11.446	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	

ARG-1449	JX238272	Tucumán	EAAOC, Colección	Experimental	L 75-33	S26 47.435 W65 11.446	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1450	JX238273	Tucumán	EAAOC, Colección	Experimental	L 75-33	S26 47.435 W65 11.446	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1458	JX238274	Tucumán	EAAOC, Colección	Experimental	CP 65-357	S26 47.435 W65 11.446	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1459	JX238275	Tucumán	EAAOC, Colección	Experimental	CP 65-357	S26 47.435 W65 11.446	12/12/2007	+	-		SCMV-SCE	
URU-1468	JX238276	Uruguay	ALUR, Colonia España	Comercial	CP68-350	S30 20.219 W57 37.018	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1469	JX238277	Uruguay	ALUR, Colonia España	Comercial	CP68-350	S30 20.219 W57 37.018	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1470	JX238278	Uruguay	ALUR, Colonia España	Comercial	CP68-350	S30 20.219 W57 37.018	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1475	JX238279	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	Bordura 1	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1476	JX238280	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	Bordura 1	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1480	JX238281	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	NCO 310	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1481	JX238282	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	NCO 310	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1485	JX238283	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	NA 63-90	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1486	JX238284	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	NA 63-90	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1490	JX238285	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	FAM 63-13	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1491	JX238286	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	FAM 63-13	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1495	JX238287	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	TUC 68-19	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1496	JX238288	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	TUC 68-19	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1500	JX238289	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	NA 56-62	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1501	JX238290	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	NA 56-62	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1505	JX238291	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	CP 52-68	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1506	JX238292	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	CP 52-68	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1510	JX238293	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	L 60-25	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1511	JX238294	Uruguay	ALUR, Experimental Ensayo 3	Experimental	L 60-25	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
URU-1515	-	Uruguay	ALUR, Ensayo 410	Experimental	TUC 74-69	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
URU-1516	JX238295	Uruguay	ALUR, Ensayo 410	Experimental	TUC 74-69	S30 19.869 W57 36.903	21/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1531	JX238296	Santa Fe	Tacuarendi, Multiplicación	Comercial	NA 85-144	S28 25.317 W59 15.536	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1532	JX238297	Santa Fe	Tacuarendi, Multiplicación	Comercial	NA 85-144	S28 25.317 W59 15.536	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1533	JX238298	Santa Fe	Tacuarendi, Multiplicación	Comercial	NA 85-144	S28 25.317 W59 15.536	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1543	JX238299	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 98-877	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1544	-	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 98-877	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1549	JX238300	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 97-723	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1550	JX238301	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 97-723	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1554	JX238302	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 94-850	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1555	JX238303	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 94-850	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1559	JX238304	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 97-395	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1560	JX238305	Santa Fe	Tacuarendi, Ens. comparativo	Experimental	FAM 97-395	S28 25.462 W59 15.381	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	

ARG-1563	JX238306	Santa Fe	Tacuarendí, Semillero Básico	Experimental	FAM 97-786	S28 25.260 W59 15.547	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1564	JX238307	Santa Fe	Tacuarendí, Semillero Básico	Experimental	FAM 97-786	S28 25.260 W59 15.547	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1568	JX238308	Santa Fe	Tacuarendí, Semillero Básico	Experimental	FAM 00-1842	S28 25.260 W59 15.547	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1569	JX238309	Santa Fe	Tacuarendí, Semillero Básico	Experimental	FAM 00-1842	S28 25.260 W59 15.547	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1573	-	Santa Fe	Tacuarendí, Semillero Básico	Experimental	NA 85-144	S28 25.260 W59 15.547	22/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1578	JX238310 JX238334	Santa Fe	El Rabón (Rene Broggi)	Comercial	FAM 81-701	S28 13.782 W59 16.545	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	CP y P3 parcial
ARG-1579	-	Santa Fe	El Rabón (Rene Broggi)	Comercial	FAM 81-701	S28 13.782 W59 16.545	22/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1580	JX238311	Santa Fe	El Rabón (Rene Broggi)	Comercial	FAM 81-701	S28 13.782 W59 16.545	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1588	-	Santa Fe	El Rabón (Rene Broggi)	Comercial	NA 85-144	S28 13.782 W59 16.545	22/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1589	-	Santa Fe	El Rabón (Rene Broggi)	Comercial	NA 85-144	S28 13.782 W59 16.545	22/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1590	-	Santa Fe	El Rabón (Rene Broggi)	Comercial	NA 85-144	S28 13.782 W59 16.545	22/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1598	JX238312	Santa Fe	EL Rabón (Enrique Zanier)	Comercial	NA 85-144	S28 09.587 W59 15.382	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1599	JX238313	Santa Fe	EL Rabón (Enrique Zanier)	Comercial	NA 85-144	S28 09.587 W59 15.382	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1600	JX238314	Santa Fe	EL Rabón (Enrique Zanier)	Comercial	NA 85-144	S28 09.587 W59 15.382	22/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
PAR-1609	JX238315	Paraguay	Ingenio Cencipirotá	Comercial	Bordura 2	S24 57.944 W57 33.430	23/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
PAR-1610	-	Paraguay	Ingenio Cencipirotá	Comercial	Bordura 2	S24 57.944 W57 33.430	23/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
PAR-1611	-	Paraguay	Ingenio Cencipirotá	Comercial	Bordura 2	S24 57.944 W57 33.430	23/01/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
PAR-1612	JX238316	Paraguay	Ingenio Cencipirotá	Comercial	Bordura 2	S24 57.944 W57 33.430	23/01/2008	+	-		SCMV-SCE	
PAR-1620	JX099757 JX238335	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	ROC 10	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	CP y P3 parcial
PAR-1621	-	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	ROC 10	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+			No se dispone de información de secuencia
PAR-1622	JX099765	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	NA 63-90	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	
PAR-1623	JX099764	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	NA 63-90	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	
PAR-1624	JX099763	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	NA 63-90	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	
PAR-1627	JX099762	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	NA 73-2596	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	
PAR-1628	JX099761	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	NA 73-2596	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	
PAR-1629	JX099758 JX238336	Paraguay	Estación Natalicio Talavera, Colección	Experimental	NA 73-2596	S25 39.916 W56 18.715	24/01/2008	-	+		SrMV	CP y P3 parcial
ARG-1639	JX238317	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1640	JX238318	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1641	JX238319	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1642	JX238320	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-		SCMV-SCE	

ARG-1643	JX238321	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-		SCMV-SCE	
ARG-1644	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 76-128	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1645	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 76-128	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1646	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 76-128	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1647	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 76-128	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1648	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 76-128	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1649	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1877	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1650	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1833	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1651	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1833	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1652	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1833	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1653	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1088	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1654	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1088	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1655	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1833	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1656	-	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1833	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1657	JX099760	Chacra	Desmorte	Experimental	NA 02-1833	S23 22.914 W64 24.387	12/11/2008	+	-			No se dispone de información de secuencia
ARG-1658	JX099759	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	+	+		SrMV	No se dispone de información de secuencia para SCMV
ARG-1659	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	-	+			No se dispone de información de secuencia
ARG-1660	-	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	-	+			No se dispone de información de secuencia
ARG-1661	JX099760	Tabacal	B61/62	Comercial	NA 97-3152	S23 15.087 W64 19.532	12/11/2008	-	+		SrMV	
ARG-1662	JX237862	Chacra	Chacra Base	Experimental	NA 84-3419	S23 22.364 W64 28.194	05/09/2010	+	-		SCMV-SCE	Genoma completamente secuenciado