

¹SECUENCIACION DEL VIRUS SCMV-CAM6

Flores Peña B. E. ⁽¹⁾; Silva Rosales L. ⁽²⁾; Alcalá Briseño R. I. ⁽²⁾

⁽¹⁾Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

⁽²⁾Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

RESUMEN

En el presente trabajo se hizo la primera parte del trabajo de secuenciar el virus del mosaico de la caña aislado de caña proveniente de Camerún (SCMV-CAM6) que infecta caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y maíz (*Zea mays*). Su secuencia no ha sido reportada aún y para lograrlo se diseñaron oligos específicos en base a un alineamiento de las 13 secuencias conocidas de SCMV, disponibles en el banco de genes (Gene Bank). Se trabajó con 8 muestras de caña y maíz infectadas, a partir de las cuales se aisló RNA genómico viral y de la planta y se realizó RT-PCR (transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa). Cada par de oligos se probó a diferentes temperaturas y concentraciones del cofactor Mg₂. Después de la ligación del gen viral en un vector, la transformación de células de *E. coli* con el vector más inserto, su clonación, purificación y digestión de los plásmidos correspondientes, se obtuvieron solo dos que contenían el inserto deseado y que correspondían a una proteína viral HcPro.

INTRODUCCION

El virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) es un *Potyviriidae* que tiene un impacto en la economía mundial pues afecta la producción de maíz y caña de azúcar provocando pérdidas significativas, principalmente en E.U.A., Brasil, España, Alemania, Austria, China e India según Lubberstedt y Alcalá (2006, 2009). En México se detectó el virus de SCMV por primera vez a finales de los ochenta en Guanajuato. Uno de los problemas es que se encuentra relacionado con la necrosis letal del maíz provocada por la interacción del SMVC con el Malclomovirus (MCMV), responsable de el virus de mosaico clorótico del maíz y el potyvirus del mosaico del enanismo del maíz (MDMV) causando pérdidas en la producción nacional. La producción de cereales en México en el año 2004 representa el 1.44% de la producción mundial (FAO, 2005), de la cual 22,000 ton son de maíz (FAO, 2005) y representa una entrada de 35,514 millones de pesos para el año 2005 (CNSPM, 2005), México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en producción de maíz. Los principales estados productores de maíz en el país son: Jalisco 15%, Sinaloa 13%, Chiapas 10%, México 9%, Michoacán 7%, Guanajuato 6%, Veracruz 5% y el resto 35% (CNSPM, 2005). Algunos de los usos más importantes de la producción del maíz es el consumo humano con el 59.7%, 23.2% en el sector agropecuario, 10.4% en derivados de la industria química, el 2.4% en la industria de cereales y otros con el 3.3%.

La familia *Potyviriidae* comprende virus de genoma RNA de cadena sencilla positiva (RNSs+) con partículas flexibles filamentosas. La familia cuenta con 212 especies descritas en siete géneros (ICTV, 2005): *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus*, *Brambyvirus* y *Bymovirus*; pueden tener un genoma monopartita (*potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus* y *Brambyvirus*) y bipartita (*Bymovirus*). Los potyvirus tienen alrededor de 100 especies. Contienen un único marco de lectura que codifica para 10 proteínas y dos regiones 5' y otra 3' no traducibles (UTR) en sus extremos. La región 5' terminal cuenta con una proteína viral unida al genoma (VPg) que cumple como función de una caperuza y en su extremo 3' terminal una cola poliadenilada Poli-A. Las partículas virales miden aproximadamente 700 nm de largo y 11 nm de diámetro.

El genero de los *Potyvirus* tiene el mayor numero de especies de la familia y representan una cuarta parte de los virus vegetales reportados (ICTV, 2005), por lo que es uno de los géneros que causa mas perdidas económicas a nivel mundial (Alcala-Briseño, 2009). Estos virus pueden ser transmitidos de manera mecánica y por áfidos de manera no persistente con un amplio rango de hospederos. Su propagación en el áfido no se ha controlado por lo cual la solución se ha centrado en la creación de plantas resistentes al virus (Lubberstedt, 2006).

El SCMV no se distingue del MDMV, pues ambos infectan con sintomatologías muy parecidas diferenciables sólo sus secuencias nucleótídicas (Ignjatovic et al. 1995), indicativo de sus relaciones filogenéticas cercanas (Shukla et al., 1989). Actualmente se conocen 13 genomas SCMV (Bj, Bris, GD, HN, HZ, JAL, LP, SDSp, SX, VER, XgS y YH) de cuatro de los cinco continentes, (Manuscrito en preparación, Silva Rosales, et al.). Secuenciar el genoma de Camerún del continente Africano ayudará a entender mejor la evolución de SCMV, también a generar plantas resistentes al patógeno y evitar perdidas en los cultivos.

OBJETIVO

Iniciar la Secuenciación del genoma completo del virus del mosaico del maíz de Camerún 6 (SCMV-CAM6).

PROCEDIMIENTO

Se aisló RNA total (siguiendo el método de Trizol), de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y de maíz (*Zea mays*), usando como control positivo aquellas que ya estaban infectadas y comprobadas para el SCMV-Ver. Se realizo RT de cada una de las muestras, usando el oligo dT (oligo 3') complementario a la cola poli-A del RNA, agregando 0.5 µL (200 U/µL) de enzima RT Super Strip II (Invitrogen) y siguiendo las especificaciones del proveedor. Para realizar la PCR se agregaron 2µL de la reacción de RT, 0.5 µL del oligo 3'(10pmol/ µL), 0.5 µL del oligo 5'(10pmol/µL) y 0.1 µL de Taq DNA polimerasa (Fermentas o Invitrogen a 5U/µL) ó 0.25 µL de DNA Taq Pol Platinum (5U/µL), la cual es una polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen). Después de cada extracción de RNA y PCR se hizo una electroforesis en geles de agarosa 0.8% o 1%, para comprobar que la PCR fuese exitosa.

Se realizaron diversas PCR usando algunos de los oligos ya diseñados anteriormente en el laboratorio de Interacción Planta-virus del CINVESTAV Irapuato (89 y 93), que podrían identificar al *Potyvirus* SCMV-CAM. Debido a que no fue así surgió la necesidad de diseñar nuestros propios oligos (Figura 1). Esto se hizo a partir de un alineamiento realizado en Geneious de los 13 genomas reportados del SCMV seleccionando las regiones más conservadas, de aproximadamente cada 1000 bp. Se buscó una Tm similar con la ayuda del software AmplifyX entre cada par de oligos. Posteriormente se mandaron sintetizar los oligos al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Tabla 1) y se realizaron diluciones para ajustar la concentración de los mismos a 10pmol/µL.

TABLA 1.

Nombre del oligo	Tm	Secuencia
Oligo 1*	60.61	AAAAACAACAAAACACTCAACACAACAC
Oligo 1 R	54.69	GCCATTCTCTTACCACATTC
Oligo 2.1 F	60.33	CTACTACTCACACAGAGCACACACC
Oligo 3.2 R	57.65	GGTGGTGTTGTGTTTCGGT
Oligo 4F	52.43	CCTCCAACAAAAGGACA
Oligo 5R	56.49	CAGCGCCTAAATCTACGC
Oligo 6 F	63.56	CAATTAAACCAATCGTGGGCAG
Oligo 7.1 R	63.56	CCCGAACCAACAGCTCCTC

Oligo 8.1 F	61.62	CATTCGAGAACTGGTGGGC
Oligo 2 *	61.48	CTCAATTTGTACTTGGTTAACGCTTC
Oligo 9.2 F	68.46	CGCATCGGGAAAACAATGAAAGG
Oligo 10 R	68.46	GTTGCTTGACTCCCAAACC
Oligo 11.1 F	63.01	CACCAAGGGAAGAACAAGCG
Oligo 12 R	64.72	GGTGCTGTCACGCTGCTCTC
Oligo 13.1 F*	60.9	GGGTGTGCTTGGTTGGAG
Oligo 14.3 R*	60.62	GGTGCTGCTGTGAAAGTGC
Oligo 89	59.81	TACAAAATGATTCTGACGGGG
Oligo 93	57.41	GTCGTAGTCCACCGAGTAGC
Oligo 15.4 R	66.13	GGAATGGGTCACTCAAAGCCG
Oligo 16.2 F	67.32	CCTCTTCTTGATTCTGTGCC
Oligo 17 F	60.74	GGCTTCTCGAAATGCAAC
Oligo 381	61.06	CTTGCCATTGTGTTGCCTT
Oligo 383	76.50	ATGGCGGGCTCTTGGACTCACGTGACATAC

*Oligos diseñados por la Doctora Aurora Londoño.

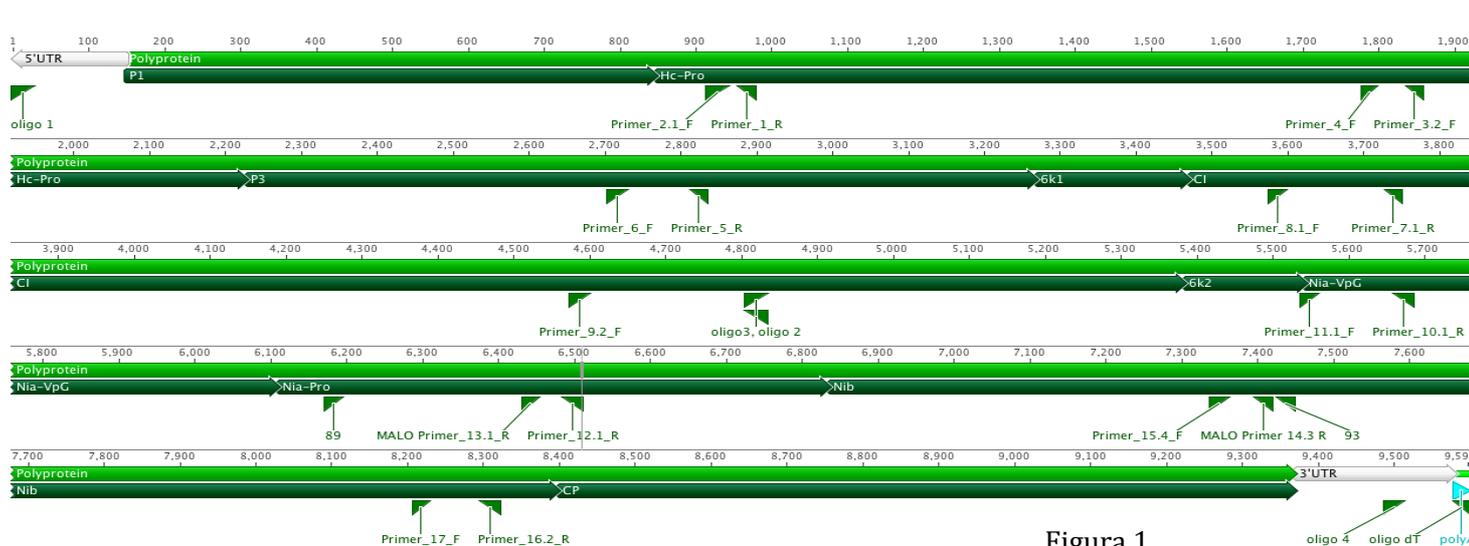


Figura 1

Con los oligos diseñados se realizó un PCR en gradiente para determinar la temperatura adecuada para cada par y en algunos casos se cambio la concentración de $MgCl_2$ para obtener una banda mas específica. Para identificar si había amplificado o no después de cada PCR se hacían electroforesis en geles de agarosa de 0.8% o 1%. En caso de amplificación se cargaba toda la muestra en otro gel y se cortaban las bandas del segmento deseado en un transiluminador de luz azul (Invitrogen). La Nanda de los geles de agarosa se purificó utilizando el kit GFXTM (GE Healthcare). Una vez obtenido el PCR se realizo la clonación en el plásmido pGEM-t Easy (Promega) o PCR TOPO (Invitrogen). Posteriormente se realizó la transformacion en células de *E. coli* DH5a por electroporación (~250 V), y se crecieron en agar LB/Cb₁₀₀/IPTG/X-Gal por toda la noche. Para realizar la extracción del plásmido se uso el kit

GeneJET plasmid miniprep (Fermentas) seguida de una digestión del plásmido con la enzima de restricción *EcoR1* (Fermentas) para comprobar el tamaño del inserto.

RESULTADOS

De las 8 muestras tanto de maíz como de caña estudiadas con la combinación de oligos se lograron amplificar fragmentos con el par de oligos 3 (para amplificar HC-Pro), 5(para amplificar CI), 7 (para amplificar NIa) y oligos 381/383(para amplificar P1). Todos se clonaron con pGEM-t Easy y se lograron purificar los plásmidos de los pares 3 (plásmidos 10.1 y 10.2); del 7 (plásmidos 15.4) y los oligos 381/383(plásmidos 17.1,8.3,8.5) . Solo se digirieron los plásmidos 10.1, 10.2 y 17.1 para comprobar que realmente tuvieran el inserto (figura 2). Se comprobó que los plásmidos 10.1 y 10.2 correspondientes al par de oligos 3 (que amplifican para HcPro) tenían inserto y no así el plásmido 17.1. Los plásmidos 8.3, 8.5, 15.4 no tienen inserto esperado, y el 18.3 no pues es el control negativo (figura 3).

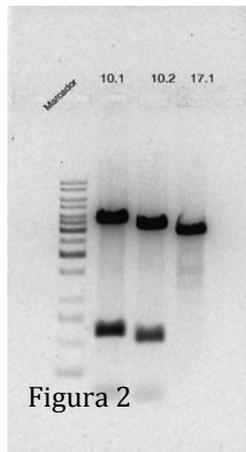


Figura 2

Para mandar a secuenciar se verificó la pureza de la muestra en el espectrofotómetro (nanodrop).Debido a que el equipo del instituto se encontraba descompuesto, y el espectrofotómetro UV-VIS estaba descalibrado, no se cuantificó el plásmido. Los plásmidos se enviaran a secuenciar posteriormente.

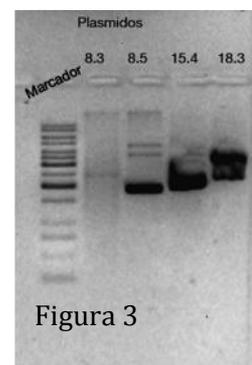


Figura 3

CONCLUSIONES

En las PCR se tuvieron muchos problemas, por que no amplificaban los segmentos deseados con los oligos diseñados , en algunos casos por que degradó el RNA de la muestra inicial y en otros se planteó la posibilidad de que la carga viral obtenida y/o la calidad del RNA y concentración no fue la suficiente como para amplificar por PCR. La pared celular de caña de azúcar es más resistente y la muestra es más difícil de moler en comparación con las de maíz. Se lograron obtener y purificar dos plásmidos que codifican para HcPro (Par de Oligos 3), sin embargo no se logro cuantificar para mandar a secuenciar, por falta de tiempo y por fallas del equipo. Sin embargo la experiencia obtenida en técnicas de laboratorio, los conocimientos adquiridos durante este verano de investigación y la visión del mundo de la investigación son una valiosa herramienta para mi desarrollo.

BIBLIOGRAFIA

Alcalá Briseño ,R. I. “Búsqueda de proteínas que interactúan con la región 5’del Virus del Mosaico de la Caña de azúcar que infecta maíz”.Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Guadalajara, Jalisco, 16-27, **2009**.

Comité Nacional Sistema Producto Maíz, “Logros y Perspectivas en la Producción de Maíz ,Estrategias para ordenar el mercado de maíz”, 6-16, **2005**

Lubberstedt T., Ingvaridsen C., Melchinger A.E., Xing Y., Salomon R. y Redinbaugh M.G., “Two chromosome segments confer multiple potyvirus resistance in maize”, Plant Breeding 125, 352-356 , **2006**.

Silva Rosales, “Manuscrito en preparación ” et al.

Baldauf, S., “Phylogeny for the faint of heart:a tutorial”, TRENDS in Genetics, 19, 345-351, **2003**.