

# Detection of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) in *Saccharum* spp. in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco

## Detección del *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) en *Saccharum* spp. en México y origen filogenético de un aislado de Jalisco

**Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán\***, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán, Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Km 35 carretera Colima-Manzanillo, CP. 28100, Tecomán-Colima; **Francisco Javier Delgado-Virgen**, Instituto Tecnológico de Colima. Avenida Tecnológico No. 1, CP. 28976, Villa de Álvarez, Colima; **Jeovani Francisco Cervantes-Preciado, José Concepción García-Preciado**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Km 35 carretera Colima-Manzanilla, CP. 28100, Tecomán-Colima; **Vania Sbeyde Farías-Cervantes**, Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, CP. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. \*Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx.

**Recibido:** 11 de Septiembre, 2017.

**Aceptado:** 16 de Octubre, 2017.

Bermúdez-Guzmán MJ, Delgado-Virgen FJ, Cervantes-Preciado JF, García-Preciado JC, Farías-Cervantes VS. 2017. Detection of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) in *Saccharum* spp. in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 16-34.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1709-2

Primera publicación DOI: 06 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 06, 2017.

**Resumen.** El *virus de mosaico de la caña de azúcar* (SCMV) es uno de los principales agentes virales que infectan a caña de azúcar (*Saccharum* spp.). En México la detección del SCMV se ha basado en sintomatología típica de la enfermedad, por lo que la información no es concluyente, además hay poca información sobre su origen filogenético.

**Abstract.** *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) is one of the main viral agents that infect sugarcane (*Saccharum* spp.). SCMV detection in Mexico has been based on typical symptomatology of the disease, which is not conclusive. Additionally, there is limited information about their phylogenetic origin. The objective of this work was to detect the presence and distribution of SCMV in the sugarcane growing areas of the Mexican Pacific using RT-PCR, and to determine the phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. The results showed the wide distribution of SCMV in sugarcane areas of the Mexican Pacific. The virus was found in 33 of the 242 samples analyzed, corresponding to 13.63%. The varieties Mex 69-290 and CP 72-2086 presented the most severe mosaic symptoms. Phylogenetic analysis using partial HC-Pro sequences of SCMV isolate from Jalisco (JalMex-126) suggests a close relationship

El objetivo del trabajo fue detectar mediante RT-PCR la presencia y distribución del SCMV en las zonas cañeras de los estados de Colima, Jalisco y Nayarit, México y determinar el origen filogenético de un aislado de Jalisco. Los resultados obtenidos demuestran la amplia distribución del SCMV en la región cañera del Pacífico de México. De las 242 muestras analizadas se detectó al virus en 33 de ellas, lo que corresponde a un 13.63%. Las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086 fueron las que presentaron los síntomas de mosaico más severos. El análisis filogenético con la secuencia parcial HC-Pro del SCMV aislado de Jalisco (JalMex-126) sugiere una estrecha relación con aislados de la India, Australia, China y Argentina, por lo que probablemente compartan un origen genético común y se hayan dispersado a través de germoplasma de caña de azúcar infectado.

**Palabras clave:** caña de azúcar, virus, RNA, filogenia.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por fitopatógenos constituyen un factor importante para la producción de caña de azúcar. En México, aproximadamente el 80% de las enfermedades que afectan este cultivo son de origen fúngico, el 20% restante es causado por bacterias, virus y fitoplasmas (CONADESUCA, 2015). Entre las primeras epidemiologías sobre el cultivo de la caña de azúcar reportadas en el mundo a comienzos del siglo XX están las ocasionadas por virus, causando grandes pérdidas económicas (Grisham, 2000). El *Virus del mosaico de la caña de azúcar* (SCMV), agente causal de la enfermedad del mosaico, es uno de los patógenos virales de mayor importancia económica a nivel mundial (Gonçalves *et al.*, 2012). La enfermedad fue responsable de drásticas epidemias en Argentina,

with isolates from India, Australia, China and Argentina, and thus likely share a common genetic origin and have been dispersed to through infected sugarcane germplasm.

**Key words:** sugarcane, virus, RNA, phylogeny.

## INTRODUCTION

Diseases caused by phytopathogens are an important factor for sugarcane production. In Mexico, approximately 80% of the diseases that affect this crop are fungal in origin, and the remaining 20% is caused by bacteria, viruses and phytoplasmas (CONADESUCA, 2015). Some of the first epidemiologies on the sugarcane crop reported in the world in the beginning of the 20th Century include those caused by viruses, causing large economic losses (Grisham, 2000). The *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), causal agent of the mosaic disease, is one of the most economically important causal agents of the mosaic disease worldwide (Gonçalves *et al.*, 2012). The disease caused drastic outbreaks in Argentina, Brazil, Cuba, Puerto Rico, and the United States (Koike and Gillaspie, 1989; Yang and Mirkov, 1997). This led to the introduction of interspecific hybrids of the genus *Saccharum* (mosaic-tolerant) imported from Java, in order to control the rapid spread of the disease in noble canes (*S. officinarum*) obtained back then in those countries (Koike and Gillaspie, 1989). In susceptible varieties infected with SCMV, yield losses are estimated in 11-50% (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2005). In Mexico, the first report (based on symptoms) of this virus affecting sugarcane was carried out in 1929, in El Potrero, Veracruz. In 1947, over 80% of the areas planted with native sugarcane varieties, from the Independencia Mill in the municipal area of Martínez de la Torre, presented the disease

Brasil, Cuba, Puerto Rico y Estados Unidos (Koike y Guillaspie, 1989; Yang y Mirkov, 1997). Lo anterior condujo a la introducción de híbridos interespecíficos del género *Saccharum* (tolerantes al mosaico) importados de Java, con el fin de controlar la rápida propagación de la enfermedad en las cañas nobles (*S. officinarum*) obtenidas en aquel entonces en esos países (Koike y Gillaspie, 1989). En variedades susceptibles infectadas con SCMV las pérdidas en rendimiento se estiman de 11-50% (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2005). En México, el primer reporte (basado en sintomatología) de este virus afectando a caña de azúcar fue realizado en 1929, en El Potrero, Veracruz. En 1947 más del 80% de las áreas plantadas con variedades de caña de azúcar criollas, del Ingenio Independencia en el municipio de Martínez de la Torre, presentaron la enfermedad (CONADESUCA, 2015). En ese mismo país el primer reporte (basado en métodos moleculares) del SCMV afectando plantas de maíz fue realizado en el año 2006 (Espejel *et al.*, 2006), sin embargo, no hay información cuantitativa sobre los daños que ocasiona esta enfermedad en los cultivos de caña de México.

El síntoma general causado por el SCMV en caña de azúcar se caracteriza principalmente por presentar decoloraciones en la lámina foliar, en la cual se observan zonas de color verde normal alternado con áreas verde pálido o amarillentas; estas decoloraciones son resultado de los niveles de variación en la concentración de la clorofila en la hoja (Grisham, 2000; CONADESUCA, 2015). Los síntomas de esta enfermedad también pueden ser causados por otros virus y pueden confundirse con el mosaico estriado (SCSMV) o el mosaico del sorgo (SrMV), los cuales también infectan a caña de azúcar (Viswanathan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009). Además, las plantas asintomáticas también pueden resultar positivas al SCMV (Xu *et al.*, 2008). En México, son escasos los reportes sobre la detección del SCMV por métodos moleculares, y mayorita-

(CONADESUCA, 2015). In that same country, the first report (based on molecular methods) of SCMV affecting maize plants was carried out in 2006 (Espejel *et al.*, 2006), although there is no quantitative information on the damages this disease causes in sugarcane plantations in Mexico.

The general symptom caused by SCMV is characterized mostly by the paling of the leaf blade, which presents normally green colored areas, alternated with pale or yellow-green areas; these areas are a result of the variations in the levels of chlorophyll in the leaf (Grisham, 2000; CONADESUCA, 2015). The symptoms of this disease may also be caused by other viruses and may be confused with the *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) or the *Sorghum mosaic virus* (SrMV), which also affect sugarcane plants (Viswanathan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009). Asymptomatic plants can also be positive for SCMV (Xu *et al.*, 2008). In Mexico, reports on the detection of SCMV by molecular methods are scarce, and have mainly been based on symptoms (CONADESUCA 2015), so there is no certainty that the visual damage of the mosaic truly corresponds to SCMV or any other virus that presents similar symptoms. Several reports have standardized protocols to detect SCMV using RT-PCR (Smith and Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010). Smith and Van de Velde (1994) developed primers S400-551 and S400-910, which amplified a 359 bp fragment, which correspond to a partial region that codifies for the capsid protein (CP) of SCMV. In another study, Yang and Mirkov (1997) developed the primers SCMV-F3/SCMV-R3, which amplify a roughly 900 bp band, which corresponds to a region that codifies for the CP protein of SCMV. Xie *et al.* (2009) designed the set of oligonucleotides SCMV-F1/SCMV-R1 based on sequences deposited in the NCBI database; these primers amplified a 720 bp fragment, which corresponds to a partial region of the HC-Pro protein of SCMV. Recently,

riamente se han basado en síntomas (CONADESU-CA 2015), por lo que no hay certeza de que el daño visual de mosaico corresponda realmente al SCMV o algún otro virus que manifiesta síntomas similares. Existen varios reportes que han estandarizado protocolos para la detección del SCMV mediante RT-PCR (Smith y Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010). Smith y Van de Velde (1994) desarrollaron los iniciadores S400-551 y S400-910, los cuales amplifican un fragmento de 359 pb, correspondiente a una región parcial que codifica para la proteína de la cápside (CP) del SCMV. En otro estudio, Yang y Mirkov (1997) desarrollaron los cebadores SCMV-F3/SCMV-R3, los cuales amplifican una banda de aproximadamente 900 pb, correspondiente a una región que codifica para la proteína CP del SCMV. Xie *et al.* (2009), diseñaron el juego de oligonucleótidos SCMV-F1/SCMV-R1 basados en secuencias depositadas en la base de datos de NCBI; dichos iniciadores amplifican un fragmento de 720 pb, correspondiente a una región parcial de la proteína HC-Pro del SCMV. Recientemente, Filippone *et al.* (2010) optimizaron un protocolo para detectar al SCMV utilizando los oligonucleótidos descritos previamente por Yang y Mirkov (1997) y Smith y Van de Velde (1994), respectivamente.

Por otra parte, resulta importante conocer el origen filogenético del SCMV para conocer probables ingresos de esta enfermedad a México. En el año 2012 se reportó un análisis filogenético de 185 secuencias CP del SCMV provenientes de varios países, sugiriendo diferentes orígenes filogeográficos de dos aislados mexicanos que contemplo ese estudio (Chaves y Ortiz, 2012). Por otra parte, los resultados de Xie *et al.* (2016) del análisis filogenético de 24 aislados de SCMV provenientes de China y diversos países del mundo revelaron que podrían dividirse en dos grupos, los cuales fueron asociados con la especie vegetal hospedera del SCMV. Más recientemente, los resultados de Moradi *et al.* (2017) a partir de secuencias CP del SCMV de

Filippone *et al.* (2010) optimized a protocol to detect SCMV using the oligonucleotides described earlier by Yang by Mirkov (1997) and Smith and Van de Velde (1994), respectively.

On the other hand, it is important to know the origin of SCMV in order to know possible entries of this disease into Mexico. In the year 2012, a phylogenetic analysis was reported, with 185 SCMV CP sequences from several countries, suggesting different phylogeographic origins of two Mexican isolates that this study considered (Chaves and Ortiz, 2012). On the other hand, the results produced by Xie *et al.* (2016) on the phylogenetic analysis of 24 SCMV isolates from China and other countries revealed that they could be divided into two groups, which were related to the SCMV host plant species. More recently, results by Moradi *et al.* (2017) from CP sequences of SCMV from various countries suggest five divergent evolutionary lineages, where the geographic origin and/or SCMV host plants are partially related. Due to this, the aim of this study is to detect, using RT-PCR, the presence and distribution of the SCMV in the sugarcane producing areas of the Mexican Pacific, and to establish the phylogenetic origin of one isolate from the state of Jalisco. The information produced in this work may be used by the Sugarcane Research and Development Center (*Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar*, CIDCA), both in its quarantine station for the exchange of germplasm, and in the genetic breeding program, in which the selection and elimination of clones susceptible to SCMV are routine procedures.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

In the year 2014, foliar samples were collected from diverse varieties of sugarcane planted

varios países sugieren cinco linajes evolutivos divergentes, donde se relacionan parcialmente el origen geográfico y/o plantas hospederas del SCMV. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue detectar mediante RT-PCR la presencia y distribución del SCMV en las zonas cañeras del Pacífico de México y determinar el origen filogenético de un aislado del estado de Jalisco. La información generada en este trabajo podrá ser utilizada por el Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA), tanto en su estación cuarentenaria para el intercambio de germoplasma, como dentro del programa de mejoramiento genético, en el que la selección y eliminación de clones susceptibles al SCMV son procedimientos rutinarios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Durante el año 2014 se colectaron muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit (Figura 1). Las plantas presentaron sintomatología típica de mosaico o fueron asintomáticas. Las muestras se envolvieron en bolsas plásticas, fueron colocadas en hieleras con refrigerantes térmicos y se trasladaron al laboratorio de biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán del INIFAP ubicado en el km 35 de la carretera Colima-Manzanillo en Colima.

### Extracción y cuantificación del RNA total

Se tomaron aproximadamente 200 mg de varias partes del tejido foliar de una misma planta. Estas hojas se pulverizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue depositado en un tubo de 1.5 mL y se homogeneizó con 500 µL del

commercially in the states of Colima, Jalisco and Nayarit (Figure 1). Plants displayed typical mosaic symptoms or they were asymptomatic. The samples taken were wrapped in plastic bags, placed in coolers with thermal refrigerants and were transferred to the Laboratory of Plant Biotechnology from Campo Experimental Tecomán of INIFAP, located on km 35 of the Colima-Manzanillo highway, in Colima.

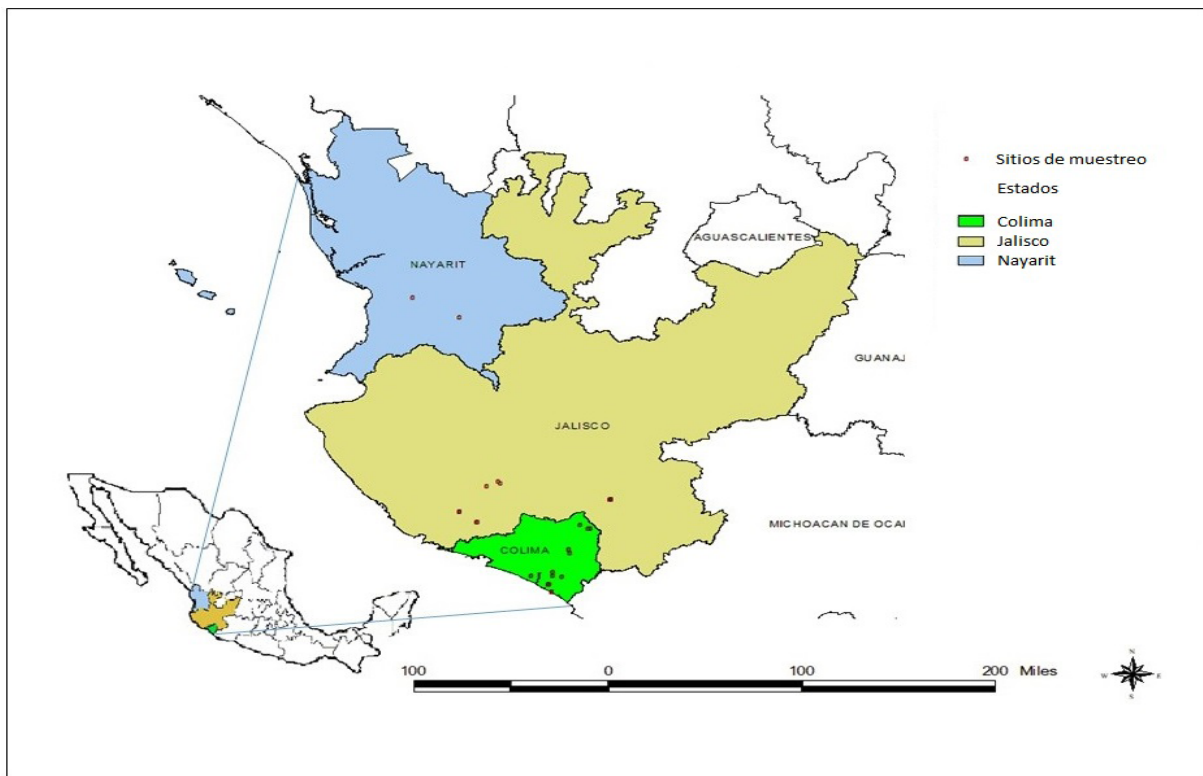
### Extraction and quantification of the total RNA

Approximately 200 mg were taken from several parts of the foliar tissue of one same plant. These leaves were pulverized using liquid nitrogen until a fine powder was formed, which was deposited in a 1.5 mL tube, and homogenized with 500 µL of the Tripure reagent (Roche). Manufacturer recommendations were taken for the extraction of total RNA. Finally, the RNA obtained was resuspended in RNase free water (0.01% DEPC) and stored at -70°C. Quantification was carried out using a NanoDrop (Thermo Scientific) spectrophotometer using 1 µL of the total RNA extracted, and the  $A_{260:280}$  y  $A_{260:230}$  ratio was measured to determine its purity.

### Cloning a fragment of SCMV in pGEM-T Easy

In order to have a positive control for the detection of the virus, the PCR product of 720 bp, which corresponds to a sugarcane foliage sample, obtained in a location of the state of Jalisco, was purified from agarose gel using the “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN) kit, following manufacturer instructions. Later, the fragment was cloned using the “pGEM-T Easy” (Promega) system, and was transformed into *E. coli* JM109 cells (Promega), which were previously made competent using  $CaCl_2$  according to Riley *et al.*, 2008. A DNA





**Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo donde se colectaron hojas de caña de azúcar.**  
**Figure 1. Geographic location of the sampling sites from which sugarcane leaves were collected.**

reactivo Tripure (Roche). Se siguieron las recomendaciones del fabricante para la extracción del RNA total. Finalmente, el RNA obtenido fue re-suspendido en agua libre de RNasa (0.01% DEPC) y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) utilizando  $1\ \mu\text{L}$  del RNA total extraído y se midieron las relaciones de  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  para determinar su pureza.

### Clonación de un fragmento del SCMV en pGEM-T Easy

Con el objetivo de contar con un control positivo para la detección del virus, el producto de PCR de 720 pb correspondiente a una muestra de follaje de caña de azúcar, obtenida de una localidad

fragment insert cloned in the vector was verified by purification of plasmid DNA from the recombinant cells and the subsequent digestion reaction with enzymes *EcoR* I and *Not* I.

### Analysis of sequences

The plasmid from the DNA fragment cloned in *E. coli* was sequenced in a ABI PRISM 310 Genetic Analyzer in both strands with the method of termination with Applied Biosystems' Big Dye. The editing and assembling of the "forward" and "reverse" sequences was carried out using the program CLC Main Workbench 7. Finally, the similarity of the sequences obtained was compared with those reported for SCMV in the National Center for Biotechnology Information (NCBI)

del estado de Jalisco fue purificada a partir del gel de agarosa con el kit “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el fragmento se clonó con el sistema de “pGEM-T Easy” (Promega) y se transformó en células de *E. coli* JM109 (Promega), las cuales se hicieron competentes previamente con  $\text{CaCl}_2$  de acuerdo a Riley *et al.*, 2008. La comprobación del inserto clonado en el vector se realizó mediante la extracción de DNA plasmídico (Engebrecht *et al.*, 2001) a las colonias recombinantes y posterior reacción de digestión con las enzimas *EcoR* I y *Not* I.

### Análisis de secuencias

El DNA plasmídico del fragmento clonado en *E. coli* fue secuenciado en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en ambas direcciones por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems. La edición y el ensamblado de las secuencias “forward” y “reverse” se realizó con el programa CLC Main Workbench 7. Finalmente se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para SCMV en la base de datos del “National Center for Biotechnology information” (NCBI) empleando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

### Detección del SCMV por RT-PCR

La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realizó utilizando el kit “Reverse Transcription System” (Promega). El RNA fue desnaturado a 70 °C durante 10 min; la mezcla de reacción RT se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , amortiguador RT 1 X, 1 mM de cada dNTP, 1  $\text{u}/\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasa RNasin® recombinante, 15  $\text{u}/\mu\text{g}$  de transcriptasa inversa AMV, 0.5  $\mu\text{g}$  de mezcla de oligonucleótidos por  $\mu\text{g}$  de RNA y 5  $\mu\text{L}$  de RNA total (1.5  $\mu\text{g}$  aproximadamente). La mezcla anterior

database, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### Detección de SCMV by RT-PCR

The reverse transcription reaction (RT) of the total RNA was carried out using the Reverse Transcription System (Promega) kit. The RNA was denaturalized at 70°C for 10 min; the RT reaction mixture was carried out in a volume of 20  $\mu\text{L}$  containing 5 mM of  $\text{MgCl}_2$ , buffer RT 1 X, 1 mM of each dNTP, 1  $\text{u}/\mu\text{L}$  of recombinant RNasin® ribonuclease inhibitor, 15  $\text{u}/\mu\text{g}$  of AMV reverse transcriptase AMV, 0.5  $\mu\text{g}$  of oligonucleotide mixture by  $\mu\text{g}$  of RNA and 5  $\mu\text{L}$  of total RNA (1.5  $\mu\text{g}$  approximately). This mixture was incubated at room temperature for 10 min and then at 42°C for 45 min. Immediately, it was incubated at 95°C for 5 min, and finally 0-5°C for 5 min. The resulting cDNA were used as a mold for the amplification by PCR with the oligonucleotides described by Xie *et al.* (2009). The final volume of the reaction mixture was 25  $\mu\text{L}$ , containing 12.5  $\mu\text{L}$  of REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1  $\mu\text{M}$  of each oligonucleotide, 3  $\mu\text{L}$  of cDNA and molecular grade water. The reaction mixture was incubated in a thermocycler (Labnet) with the following program: one cycle of 50°C for 30 min and 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 5 min. Electrophoresis was carried out on agarose gel at 1% with TAE buffer 1 X and 12.5  $\mu\text{L}$  of the PCR products were used; the samples were run with a voltage of 120 V. Finally, the gels were stained with BrEt and observed using a transilluminator with UV light (UVP) for the analysis of results.

### Phylogenetic analysis

All bioinformatic analysis were carried out using CLC Workbench software version 7.0.3.

fue incubada a temperatura ambiente por 10 min y luego a 42°C durante 45 min. Inmediatamente después se incubó a 95°C durante 5 min y finalmente 0-5°C por 5 min. Los cDNA resultantes fueron utilizados como molde para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos descritos por Xie *et al.* (2009). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1 µM de cada oligonucleótido, 3 µL de cDNA y H<sub>2</sub>O grado molecular. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50°C por 30 min y 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 1 min seguido de una extensión final a 72°C por 5 min. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y fueron cargados 12.5 µL de los productos de PCR; las muestras se corrieron con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñeron con BrEt y se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados.

### Análisis filogenético

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron con el software CLC Workbench versión 7.0.3. Se seleccionaron y descargaron secuencias del análisis BLAST en NCBI con los mayores porcentajes de identidad con la secuencia de SCMV denominada JalMex-126 (KT334297) y se emplearon otras más de la misma base de datos (Cuadro 2). Para todas las muestras se realizaron PCR *in silico*, con los primers para SCMV descritos por Xie *et al.* (2009). En todas las secuencias en las que se generaron fragmentos de 720 pb, estos fueron extraídos y almacenados en una base de datos local. Las secuencias que no generaron el fragmento esperado fueron alineadas con las generadas en la base de datos. Se seleccionaron y guardaron las

Sequences of the BLAST analysis were selected and downloaded in NCBI with the highest percentages of identity with the SCMV sequence, which named JalMex-126 (KT334297) and others from the same database were used (Table 2). For all samples, PCR *in silico* were carried out with the primers for SCMV described by Xie *et al.* (2009). In all the sequences in which 720 bp fragments were produced, these were extracted and stored in a local database. The sequences that did not generate the expected fragment were aligned with those generated in the database. The aligned regions of these sequences were selected and stored. The region HC-Pro of PRSV (NC\_001785) was used as an external group. Multiple alignments of sequences were carried out using the MUSCLE algorithm, and the maximum likelihood and Neighbor-joining methods were used for the construction of the phylogenetic tree. General Time Reversible (GTR) was used as a model of substitution of nucleotides. The bootstrap analysis was carried out with 1,000 repetitions, and finally, the phylogenetic tree was edited using the software TreeGraph 2.

## RESULTS

### Symptoms

The symptoms related to the presence of SCMV were found in the foliar samples collected from sugarcane plants of different varieties in the states of Colima, Jalisco, and Nayarit, Mexico. Also, variations were observed in the mosaic patterns (Figure 2 A). Other samples with mosaics were found to have symptoms, such as white stripes in ribs, lesions from pustules, chlorosis, necrosis and corrugated leaves (Figure 2 B).



regiones alineadas de estas secuencias. Se utilizó como grupo externo la región HC-Pro del PRSV (NC\_001785). Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias con el algoritmo MUSCLE y se empleó el método de máxima verosimilitud y Neighbor-joining para la construcción del árbol filogenético. Se utilizó “General Time Reversible” (GTR) como modelo de sustitución de nucleótidos. El análisis bootstrap se realizó con 1,000 réplicas y finalmente el árbol filogenético fue editado con el software TreeGraph 2.

## RESULTADOS

### Síntomas

Los síntomas relacionados con la presencia del SCMV se encontraron en las muestras foliares colectadas de caña de azúcar de diferentes variedades en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit, México; así mismo, se observaron variaciones en los patrones de mosaico observados (Figura 2 A). Otras muestras con mosaico también fueron detectadas con algunos síntomas como rayas blancas en nervaduras, lesiones por pústulas, clorosis, necrosis y hoja corrugada (Figura 2 B).

### Clonación de un fragmento del SCMV

El control positivo utilizado para detectar la presencia y distribución del SCMV en tres estados del Pacífico de México se obtuvo de una muestra con síntomas severos de mosaico procedente del estado de Jalisco. Se amplificó y clonó un fragmento de 720 pb; posteriormente, fueron obtenidas siete colonias recombinantes y se realizó el análisis restrictivo con *EcoR* I y *Not* I para comprobar la presencia del fragmento clonado (Figura 3), el cual finalmente fue secuenciado. El análisis BLAST de la

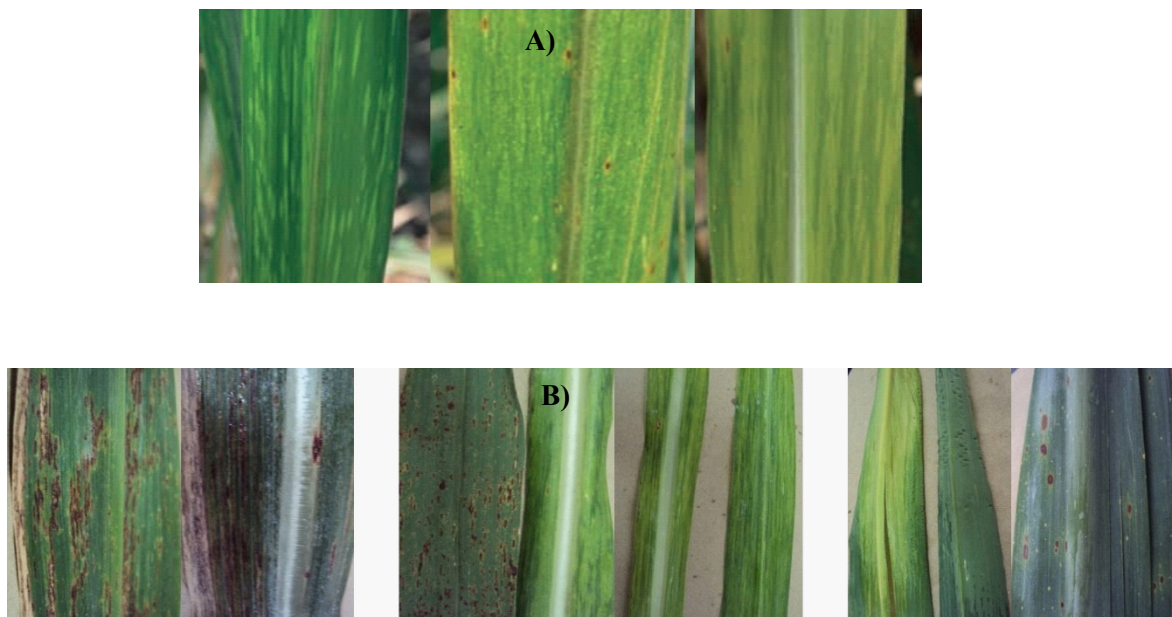
### Cloning a fragment of SCMV

The positive control used to detect the presence and distribution of SCMV in three states of the Mexican Pacific was obtained from a sample with severe mosaic symptoms from the state of Jalisco. A 720 bp fragment was amplified and cloned; later, seven recombinant colonies were obtained and a restrictive analysis was carried out with *EcoR* I and *Not* I to verify the presence of the cloned fragment (Figure 3), which was finally sequenced. The BLAST analysis of the sequence presented an identity of up to 95% with other SCMV accessions, and was placed in the NCBI database, under registration number KT334297. The sequence was established as belonging to a partial region of the HC-Pro gene of SCMV.

### Identification and distribution of SCMV in three states of the Mexican Pacific

All the products of RT-PCR that underwent electrophoresis in agarose gel that showed the amplification of fragments of 720 bp of SCMV with the set of oligonucleotides SCMV-F1/SCMV-R1 described by Xie *et al.* (2009) were considered as positive to the virus (Figure 4). A total of 242 foliar samples of diverse, commercially planted, symptomatic and asymptomatic sugarcane varieties, were analyzed for mosaic, as well as other symptoms described earlier.

Table 1 shows the wide distribution presented by SCMV in the tropical and subtropical regions of the Mexican Pacific covered by the present study. In the state of Colima, it was found in the varieties Mex 69-290 and CP 72-2086, among many others in the experimental stage. Also, in Jalisco it affected the same two varieties, as well as Atemex 96-40. Finally, in Nayarit variety Mex 69-290 was also the most affected. Table 1 shows the 33



**Figura 2. A) Diversidad de síntomas de mosaico en hojas de caña de azúcar. B) Diversidad de síntomas (patrón de mosaico, lesiones por pústulas, clorosis, necrosis, mancha café y hoja corrugada) en hojas de caña de azúcar positivas al SCMV por RT-PCR.**

**Figure 2. A) Diversity of the symptoms of mosaic in sugarcane leaves. B) Diversity of symptoms (mosaic pattern, lesions from pustules, chlorosis, necrosis, brown stain, and corrugated leaf) in sugarcane leaves that tested positive for SCMV using RT-PCR.**

secuencia presentó hasta un 95% de identidad con otras accesiones de SCMV y fue depositada en la base de datos de NCBI con el registro KT334297. Se determinó que la secuencia corresponde a una región parcial del gen HC-Pro del SCMV.

### **Identificación y distribución del SCMV en tres estados del Pacífico de México**

Todos los productos de RT-PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa que mostraron la amplificación de fragmentos de 720 pb del SCMV con el juego de oligonucleótidos SCMV-F1/SCMV-R1 descritos por Xie *et al.* (2009) fueron considerados como positivos al virus (Figura 4). En total se analizaron 242 muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente, sintomáticas y asintomáticas para

sugarcane plants that tested positive for SCMV and their geographic origin, corresponding to 13.63% of the total of plants analyzed. The varieties with the most severe viral symptoms and that tested positive for SCMV were Mex 69-290, CP 72-2086 and Atemex 96-40. Some samples presented clear mosaic symptoms, although they tested negative for the presence of the virus by RT-PCR.

### **Phylogenetic origin**

The phylogenetic analysis with the partial sequence HC-Pro of SCMV from Jalisco and other similar sequences from other countries is shown in Figure 5. The formation of two groups is observed, the first of which includes two sequences from Mexico, EU091075 and GU474635, whose percentages of identity with JalMex-126

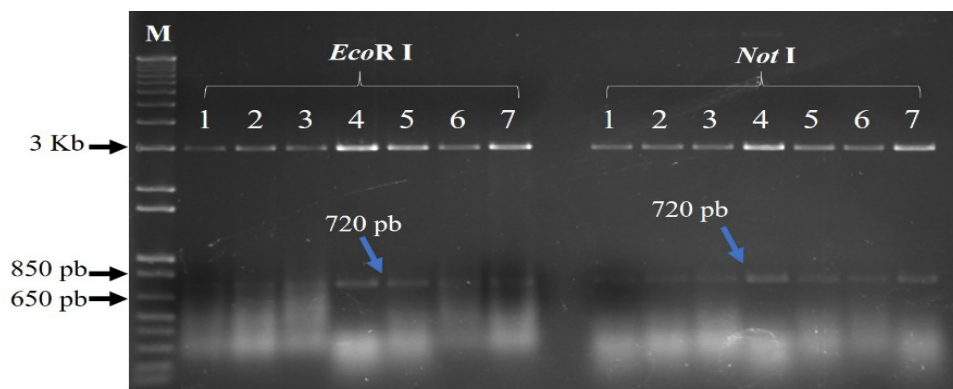


Figura 3. Digestión enzimática con *EcoR I* y *Not I* para liberación del inserto de 720 pb del fragmento parcial HC-Pro de SCMV clonado en el vector pGEM T Easy (Promega). 1-7: DNA plasmídico de colonias de *E. coli* recombinantes. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Figure 3. Enzyme digestion with *EcoR I* and *Not I* for the release of the insert of 720 bp of the partial fragment HC-Pro of SCMV cloned in the vector pGEM T Easy (Promega). 1-7: plasmid DNA of recombinant *E. coli* colonies. M: Molecular weight marker 1 Kb plus (Invitrogen).

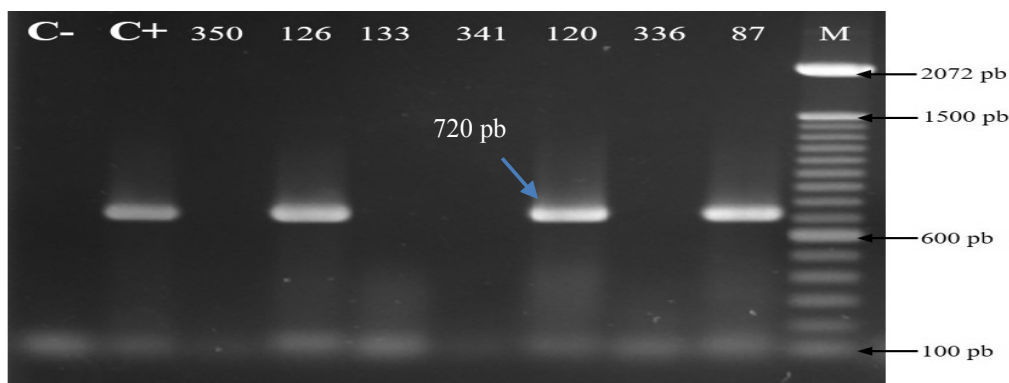


Figura 4. Detección del *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) mediante RT-PCR en muestras de caña de azúcar procedentes de tres estados del Pacífico mexicano. C-: control negativo ( $H_2O$ ). C+: Control positivo (DNA plasmídico). M: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Los números corresponden a diferentes muestras analizadas.

Figure 4. Detection of the *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) by RT-PCR in sugarcane samples from three states of the Mexican Pacific. C-: negative control ( $H_2O$ ). C+: Positive control (plasmid DNA). M: Molecular weight marker 100 pb (Invitrogen). Numbers correspond to different samples analyzed.

mosaico; además de la presencia de otros síntomas descritos anteriormente.

En el Cuadro 1 se observa la amplia distribución que presenta el SCMV en las regiones tropicales y subtropicales del Pacífico de México que abarcó el presente estudio. En el estado de Colima se detectó en las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086, entre otras más en etapa experimental. De igual manera, en

(isolate from this study) were 80.39 and 79.28%, respectively. This group also included another two sequences from China and Germany. In the second group is JalMex-126, along with two sequences from India, one from Australia, two from China, and one from Argentina, with which it shares identity percentages of between 92.5-95.14%, and therefore the viruses of this group may have a common

**Cuadro 1. Relación de muestras de follaje de caña de azúcar positivas al SCMV mediante RT-PCR en la región cañera del Pacífico de México.****Table 1. List of sugarcane foliage samples that tested positive for SCMV by RT-PCR in the sugarcane-producing region of the Mexican Pacific.**

| No. | Muestra | Estado  | Municipio           | Georeferencia                  | Variedad              |
|-----|---------|---------|---------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1   | 87      | Colima  | Colima              | N 19°11'33.0" W 103°43'15.4"   | CP 72-2086            |
| 2   | 88      | Colima  | Colima              | N 19°09'43.6" W 103°43'14.0"   | CP 72-2086            |
| 3   | 35      | Colima  | Cuauhtémoc          | N 19°24'34.14" W 103°38'19.79" | Mex 69-290            |
| 4   | 82      | Colima  | Cuauhtémoc          | N 19°22'36.61" W 103°33'37.49" | CP 72-2086            |
| 5   | 90      | Colima  | Cuauhtémoc          | N 19°22'09.12" W 103°34'49.81" | CP 72-2086            |
| 6   | 148     | Colima  | Tecomán             | N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"  | CP 72-2086            |
| 7   | 336     | Colima  | Tecomán             | N 18°52'40.12" W 103°51'50.62" | CP 72-2086            |
| 8   | 23      | Colima  | Tecomán             | N 18°56'37.4" W 103°46'26.03"  | Mex 69-290            |
| 9   | 33      | Colima  | Tecomán             | N 18°48'33.23" W 103°50'37.89" | Mex 69-290            |
| 10  | 146     | Colima  | Tecomán             | N 18°57'57.26" W 103°50'22.01" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 11  | 2       | Colima  | Tecomán             | N 18°56'06.52" W 104°00'03.54" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 12  | 37      | Colima  | Tecomán             | N 18°48'32.91" W 103°50'33.48" | Mex 69-290            |
| 13  | 133     | Colima  | Tecomán             | N 18°52'37.61" W 103°51'57.66" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 14  | 387     | Colima  | Tecomán             | N 18°57'56.03" W 103°50'22.02" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 15  | 350     | Jalisco | Autlán              | N 19°45'07.23" W 104°19'36.69" | Mex 69-290            |
| 16  | 342     | Jalisco | Cuautitlán          | N 19°26'49.58" W 104°24'10.45" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 17  | 344     | Jalisco | Cuautitlán          | N 19°26'54.74" W 104°23'40.70" | Mex 79-431            |
| 18  | 355     | Jalisco | El Grullo           | N 19°48'49.81" W 104°14'35.95" | Mex 69-290            |
| 19  | 349     | Jalisco | El Grullo           | N 19°47'44.20" W 104°13'38.63" | Atemex 96-40          |
| 20  | 413     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'07.39" W 104°32'11.61" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 21  | 341     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'08.14" W 104°32'11.61" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 22  | 369     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'11.23" W 104°32'10.97" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 23  | 340     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'05.15" W 104°32'06.51" | Atemex 96-40          |
| 24  | 114     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'43.00" W 103°24'31.01" | Atemex 96-40          |
| 25  | 120     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.90" W 103°24'29.40" | Atemex 96-40          |
| 26  | 125     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'24.12" W 103°25'03.64" | CP 72-2086            |
| 27  | 110     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'27.25" W 103°25'04.85" | CP 72-2086            |
| 28  | 113     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.9" W 103°24'29.7"   | Atemex 96-40          |
| 29  | 126     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.68" W 103°24'30.04" | Atemex 96-40          |
| 30  | 123     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.31" W 103°24'31.21" | Atemex 96-40          |
| 31  | 138     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.58" W 103°24'31"    | Atemex 96-40          |
| 32  | 186     | Nayarit | Santa María del Oro | N 21°17'56.3" W 104°32'14.9"   | Mex 69-290            |
| 33  | 170     | Nayarit | Xalisco             | N 21°27'50.1" W 104°53'11.4"   | <i>Saccharum</i> spp. |

Jalisco se presentó afectando a las mismas dos variedades, además de la Atemex 96-40. Finalmente, en Nayarit también la variedad Mex 69-290 fue la más afectada. En el cuadro 1 se muestra la relación de 33 plantas que resultaron positivas al SCMV y su origen geográfico, lo que representa un 13.63% del total analizado. Las variedades con síntomas

genetic origin. For both groups, the geographic origins of the isolates were very diverse. The main difference between these two groups formed lies in the type of virus host. The viral sequences of the first group had maize plants as hosts, except for the isolate from Germany, whose host is unknown. The rest of the HC-Pro sequences of SCMV that made

más severos de virosis y que resultaron positivas al SCMV fueron Mex 69-290, CP 72-2086 y Atemex 96-40. Algunas muestras presentaron síntomas claros de mosaico, sin embargo, resultaron negativas a la presencia del virus mediante RT-PCR.

### Origen filogenético

El análisis filogenético con la secuencia parcial HC-Pro del SCMV de Jalisco y otras secuencias similares de otros países se muestra en la Figura 5. Se observa la formación de dos grupos, el primero incluye dos secuencias de México, EU091075 y GU474635 cuyos porcentajes de identidad con Jal-Mex-126 (aislado de este estudio) fueron de 80.39 y 79.28%, respectivamente; en este grupo también se incluyeron otras dos secuencias procedentes de China y Alemania. En el segundo grupo se encuentra la secuencia JalMex-126, junto con dos secuencias de la India, una de Australia, dos de China y

up the second group come from diverse hybrids and sugarcane species (Table 2).

### DISCUSSION

The variety of symptoms present in the analyzed samples, combined with mosaic patterns, are possibly due to mixed infections with fungi, since some of the symptoms observed are from diseases such as brown spot, common rust, pokkah boeng, the causal agents of which are *Cercospora longipes*, *Puccinia melanocephala* and *Gibberella fujikuroi*, respectively (Raid and Comstock, 2000; Sauntally and Sullivan, 2000; Whittle and Irawan, 2000). However, molecular tests must be carried out to confirm the identity of these causal agents. On the other hand, according to Xie *et al.* (2009), the mosaic disease is caused by a complex of three viruses: the SCMV, the *Sorghum mosaic virus*

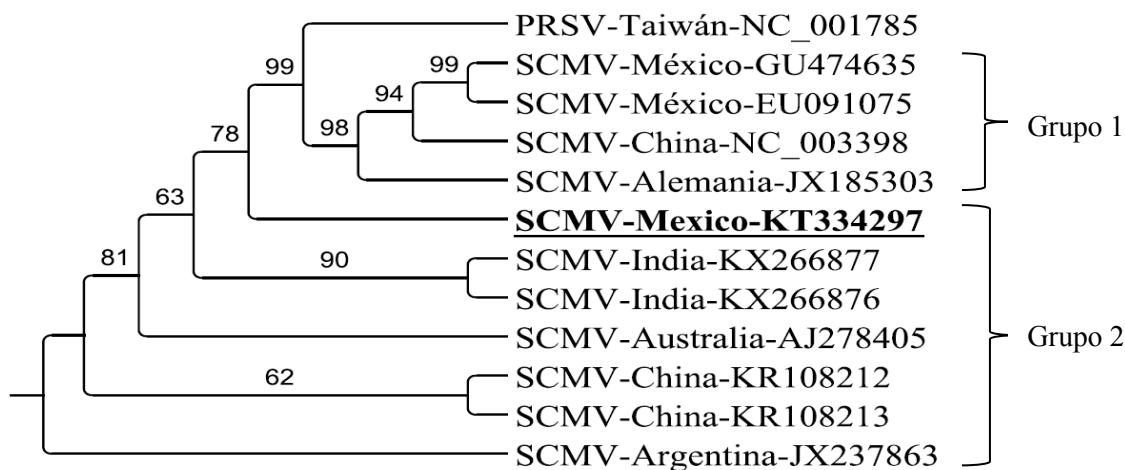


Figura 5. Árbol filogenético basado en el método de Neighbor-joining y máxima verosimilitud utilizando secuencias parciales del fragmento HC-Pro del SCMV. Las ramas con valores de bootstrap menores a 50% fueron colapsadas. Se utilizó como grupo externo al *Papaya ringspot virus* (PRSV). En negritas y subrayado se resalta el aislado de este estudio.

Figure 5. Phylogenetic tree based on the Neighbor-joining and maximum likelihood methods using partial sequences of the fragment HC-Pro of SCMV. Branches with bootstrap values below 50% were collapsed. The *Papaya ringspot virus* (PRSV) was used as an external group. The isolate of this study is highlighted in bold letters and underlined.



una de Argentina, con las que comparte porcentajes de identidad de entre 92.5-95.14%, por lo que los virus de este grupo podrían tener un origen genético común. Para ambos grupos, los orígenes geográficos de los aislados fueron muy diversos; la principal diferencia entre estos dos grupos que se formaron radica en el tipo de hospedero del virus. Las secuencias virales del primer grupo tuvieron como hospederos a plantas de maíz, exceptuando al aislado de Alemania cuyo hospedero se desconoce. El resto de secuencias de HC-Pro del SCMV que formaron el segundo grupo son provenientes de diversos híbridos y especies de caña de azúcar (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

La diversidad de síntomas presentes en las muestras analizadas combinados con patrones de mosaico, posiblemente se deban a infecciones mixtas con hongos, ya que algunos de los síntomas observados corresponden a enfermedades como mancha café, roya café y pokkah boeng, cuyos agentes causales son *Cercospora longipes*, *Puccinia*

(SrMV) and the *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV), the last two of which have not been reported as affecting sugarcane in Mexico. The fact that samples with mosaic characteristics turned out negative for the RT-PCR test for SCMV in this study may be due to its symptoms being related with the presence of some of the viruses mentioned earlier (Grisham, 1994; Xie *et al.*, 2009), or those samples with severe mosaics and positive to SCMV may contain mixed viral infections. Recently, Balarabe *et al.* (2014) mentioned that the *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) and the *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) cause mosaic disease in sugarcane in Nigeria. To this day, the presence of the SrMV has been confirmed in the United States, China, and Vietnam (Yang and Mirkov, 1997; Grisham and Pan, 2007; Ha *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016), whereas SCSMV is limited to the sugarcane producing areas of the Asian continent (Hall *et al.*, 1998; Hema *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2006). However, due to the proximity of Mexico to the United States, it is likely that SrMV is infecting sugarcane plants in our country.

The detection of SCMV by RT-PCR in this study confirms its wide distribution in the sugarcane

**Cuadro 2. Secuencias parciales del fragmento HC-Pro del SCMV obtenidas de la base de datos de NCBI y utilizadas en este estudio para el análisis filogenético.**

**Table 2. Partial sequences of the fragment HC-Pro of SCMV obtained from the NCBI database and used in this study for the phylogenetic analysis.**

| No. | Nombre del aislado | Origen    | Hospedero                                 | Año  | No. Acceso |
|-----|--------------------|-----------|---|------|------------|
| 1   | JalMex-126         | México    | <i>Saccharum</i> spp. (Var. Atemex 96-40) | 2015 | KT334297   |
| 2   | Brisbane           | Australia | <i>Saccharum</i> spp.                     | 2005 | AJ278405   |
| 3   | FZ-C1              | China     | <i>Saccharum</i> spp. (Var. Badila)       | 2014 | KR108212   |
| 4   | CBTCT-Seng         | India     | <i>Saccharum sinense</i>                  | 2014 | KX266877   |
| 5   | ARG-915            | Argentina | <i>Saccharum</i> spp.                     | 2007 | JX237863   |
| 6   | FZ-C2              | China     | <i>Saccharum</i> spp. (Var. Badila)       | 2014 | KR108213   |
| 7   | CBMungo            | India     | <i>Saccharum barberi</i>                  | 2014 | KX266876   |
| 8   | JAL-1              | México    | <i>Zea mays</i>                           | 2010 | GU474635   |
| 9   | SCMV-VER1          | México    | <i>Zea mays</i>                           | 2011 | EU091075   |
| 10  | Seehausen          | Alemania  | -   | 2012 | JX185303   |
| 11  | SCMVgp1            | China     | <i>Zea mays</i>                           | 2015 | NC_003398  |

*melanocephala* y *Gibberella fujikuroi*, respectivamente (Raid y Comstock, 2000; Saumtally y Sullivan, 2000; Whittle e Irawan, 2000); sin embargo, se deben realizar las pruebas moleculares para confirmar la identidad de estos agentes causales. Por otra parte, según Xie *et al.* (2009) la enfermedad del mosaico es ocasionada por un complejo de tres virus: SCMV, *Sorghum mosaic virus* (SrMV) y *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV), de los cuales los últimos dos no se han reportado afectando a caña de azúcar en México. Probablemente las muestras con características de mosaico que resultaron negativas a la prueba de RT-PCR para detectar SCMV en el presente estudio se deba a que sus síntomas estén asociados con la presencia de alguno de los virus antes mencionados (Grisham, 1994; Xie *et al.*, 2009), o incluso aquellas muestras con mosaicos severos y positivas al SCMV contengan infecciones virales mixtas. Recientemente Balarabe *et al.* (2014) mencionan que también el *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) y el *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) son responsables de la enfermedad del mosaico en caña de azúcar en Nigeria. Hasta el momento se ha reportado la presencia del SrMV en Estados Unidos, China y Vietnam (Yang y Mirkov, 1997; Grisham y Pan, 2007; Ha *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016), mientras que el SCSMV está limitado para las zonas cañeras del continente asiático (Hall *et al.*, 1998; Hema *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la cercanía de Estados Unidos con México sería muy probable que el SrMV se encuentre infectando a las plantas de caña de azúcar en nuestro país.

La detección del SCMV por RT-PCR en este estudio confirma su amplia distribución en las zonas cañeras de la región del Pacífico de México. El virus incluso está presente en el continente europeo, donde no se cultiva caña de azúcar, debido a la cantidad de especies vegetales que pueden servir como reservorios del mismo (Dallwitz, 1980; Dallwitz *et*

growing areas of the Mexican Pacific region. The virus is even present in the European continent, due to the amount of plant species that can act as reservoirs for it (Dallwitz, 1980; Dallwitz *et al.*, 1993; Brunt *et al.*, 1996). In Mexico, varieties Mex 69-290 and CP-72-2086, not only cover 50% of the area planted with sugarcane, but have also been in use for over 30 years, which has led to the genetic deterioration of the materials, leading, with time, to susceptibility to several diseases, including viral diseases. Also, its vegetative reproduction characteristics (seed-stake), as well as the presence of vector aphids *Melanaphis sacchari* and *Rhopalosiphum maidis* (Figueredo *et al.*, 2004) have promoted the dispersion of the virus.

Several reports have identified the presence of SCMV in various countries (Smith and Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010; Sawazaki *et al.*, 2013). This study was based on the work described by Xie *et al.* (2009) for the standardization of the method of detection for RT-PCR. However, despite the molecular diagnosis techniques being more sensitive than serological methods, the latter are less expensive and easier to use when a higher number of samples must be processed (Gonçalves *et al.*, 2007; Balarabe *et al.*, 2014). In Mexico, the SCMV is viewed as the only causal agent of the mosaic disease, although there are no solid reports or with scientific validity to sustain these facts, since information on the presence of the virus in the country go back to 1930-1950, and have also been based on the typical symptoms of the disease (CONADESUCA, 2015), which is not conclusive. Studies related to the SCMV in Mexico have focused on maize (Espejel *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2011; Chaves and Ortiz, 2012). Chaves *et al.* (2011) obtained one isolate of SCMV in maize in the state of Veracruz and they used the sugarcane varieties CP 72-2086 and MY 44-12 as reference genotypes to inoculate

*al.*, 1993; Brunt *et al.*, 1996). En México, las variedades Mex 69-290 y CP-72-2086, además de representar más del 50% del área cultivada con caña de azúcar, tienen más de 30 años de uso, lo que ha conllevado al deterioro genético de los materiales que con el tiempo han presentado susceptibilidad a diversas enfermedades, incluidas las virales. Además, sus características de multiplicación vegetativa (semilla-estaca), así como la presencia de los áfidos vectores *Melanaphis sacchari* y *Rhopalosiphum maidis* (Figueredo *et al.*, 2004) han favorecido la dispersión del virus.

Hay varios reportes que han identificado la presencia del SCMV en varios países (Smith y Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010; Sawazaki *et al.*, 2013). El presente estudio se basó en el trabajo descrito por Xie *et al.* (2009) para la estandarización del método de detección mediante RT-PCR; sin embargo, a pesar de que las técnicas de diagnóstico molecular tienen mayor sensibilidad que los métodos serológicos, estos últimos son más económicos y factibles de utilizar cuando se deben procesar un elevado número de muestras (Gonçalves *et al.*, 2007; Balarabe *et al.*, 2014). En México, se atribuye al SCMV como único agente causal de la enfermedad del mosaico; sin embargo, no existen reportes sólidos o con validez científica para sostener estos hechos debido a que la información que se tiene sobre la presencia del virus en el país datan desde los años 1930-1950, además de que se han basado en la sintomatología típica de la enfermedad (CONADESUCA, 2015), lo cual no es concluyente. En México, los estudios relacionados con el SCMV se han centrado en el cultivo del maíz (Espejel *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2011; Chaves y Ortiz, 2012). Chaves *et al.* (2011) obtuvieron un aislado del SCMV de maíz en el estado de Veracruz y utilizaron las variedades de caña de azúcar CP 72-2086 y MY 44-12 como genotipos de referencia para inocular el virus en la lámina foliar tanto

the virus in the leaf of both maize and sugarcane to determine the movement of SCMV-Ver1. Due to this, the present paper represents the first study focused on sugarcane to determine the presence and distribution of SCMV in the sugarcane producing area of the Mexican Pacific. Finally, it is worth pointing out that in Mexico, there is a need for more studies that quantify the damage caused by the sugarcane mosaic disease, since most farmers or the agroindustry are unaware of the economic impact it could have on the crop.

Regarding the phylogenetic origin of the isolation JalMex-126, results indicate that it could have a common genetic origin with isolations from India, Australia, China and Argentina, which suggests deficiencies in the phytosanitary control during the exchange of germplasm, which is very common due to the type of seed-stake reproduction in sugarcane. However, due to the number of HC-Pro sequences of SCMV, it is very reduced in the NCBI data base in comparison with the CP sequences, it was not possible to relate the origin of the Mexican isolation with important sugarcane producing countries such as Brazil, United States, Colombia, and others. In this study we obtained the formation of two groups based on partial HC-Pro sequences of SCMV, and this same tendency was previously reported by Chaves and Ortiz (2012) and Xie *et al.* (2016), using CP sequences of SCMV. Similarly, these authors coincide in that the formation of these groups is related to the hosts of SCMV: sugarcane and maize, mainly.

According to Chaves and Ortiz (2012), Mexican isolate JAL-1, with access number GU474635 has a higher phylogenetically proximity to SCMV isolates from Brazil and the United States, while CP sequences reported in China and Germany are phylogenetically nearer to the Mexican isolation SCMV-VER1, with access number EU091075. In this study, the Mexican isolates mentioned

de maíz como caña para determinar el movimiento del SCMV-Ver1. Por lo anterior, el presente trabajo representa el primer estudio centrado en caña de azúcar para detectar la presencia y distribución del SCMV en la zona cañera del Pacífico mexicano. Finalmente, cabe destacar que, en México, hacen falta estudios que cuantifiquen el daño ocasionado por la enfermedad del mosaico en caña de azúcar ya que la mayor parte de los productores y la agroindustria desconocen el impacto económico que podrían tener en el cultivo.

Con respecto al origen filogenético del aislado JalMex-126, los resultados indican que podría tener un origen genético común con aislados de India, Australia, China y Argentina, lo que sugiere deficiencias en el control fitosanitario durante el intercambio de germoplasma, lo cual es muy común por el tipo de reproducción de semilla-estaca en caña de azúcar. Sin embargo, debido a que el número de secuencias HC-Pro del SCMV es muy reducido en la base de datos de NCBI a comparación del número de secuencias CP, no fue posible relacionar el origen del aislado mexicano con países cañeros importantes como Brasil, Estados Unidos, Colombia, entre otros. En este estudio se obtuvo la formación de dos grupos basados en secuencias parciales HC-Pro de SCMV, esta misma tendencia fue reportada previamente por Chaves y Ortiz (2012) y Xie *et al.* (2016), utilizando secuencias CP de SCMV. De forma similar, estos autores coinciden que la formación de estos grupos está asociada con los hospederos que tiene el SCMV: caña de azúcar y maíz, principalmente.

Según Chaves y Ortiz (2012), el aislado mexicano JAL-1 con número de acceso GU474635 es filogenéticamente más cercano a aislados de SCMV de Brasil y Estados Unidos, mientras que secuencias de la CP del SCMV reportadas en China y Alemania son filogenéticamente más cercanas al aislado mexicano SCMV-VER1 con número de acceso

above were closely related and they grouped with sequences from China and Germany, composing group 1. On the other hand, Moradi *et al.* (2017), also contemplated in their analysis the same two Mexican sequences of SCMV and placed them in two different groups. Due to the above, there may be a need to include more HC-Pro sequences of SCMV into the phylogenetic analysis to observe a similar tendency to those reported by these authors.

## CONCLUSIONS

The RT-PCR tests carried out on symptomatic and asymptomatic vegetative sugarcane material helped identify the presence of SCMV in the states of Colima, Jalisco, and Nayarit. This virus is widely distributed in the sugarcane areas of western Mexico, probably due to the presence of vector aphids and the propagation of potentially infected stake seed. The phylogenetic analysis using partial HC-Pro sequences from the SCMV isolate JalMex-126 helped identify two groups, the first of which had maize plants as host, and the second, with host plants of different species and sugarcane hybrids. Isolate JalMex-126 of this study may probably share common genetic origins with isolates from India, Australia, China, and Argentina.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

EU091075. En este estudio, los aislados mexicanos antes mencionados estuvieron estrechamente relacionados y se agruparon con secuencias de China y Alemania, conformando el grupo uno. Por otra parte, Moradi *et al.* (2017), también contemplaron en su análisis las mismas dos secuencias mexicanas de SCMV y las colocaron en dos grupos diferentes.



Por lo anterior, es probable que haga falta incluir más secuencias HC-Pro del SCMV al análisis filogenético para observar una tendencia similar a la reportada por estos autores.

## CONCLUSIONES

Las pruebas de RT-PCR realizadas a material vegetativo sintomático y asintomático de caña de azúcar permitieron identificar la presencia del SCMV en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit. Este virus se encuentra ampliamente distribuido en las zonas cañeras del Occidente de México, probablemente por la presencia de áfidos vectores y la propagación por semilla estaca potencialmente infectada. El análisis filogenético utilizando secuencias parciales HC-Pro del aislado de SCMV JalMex-126 permitieron identificar dos grupos, el primero que tuvo como hospederos a plantas de maíz y el segundo con plantas hospederas de diferentes especies e híbridos de caña de azúcar. El aislado JalMex-126 de este estudio es probable que comparta un origen genético común con aislados de India, Australia, China y Argentina.

## LITERATURA CITADA

- Balarabe DD, Adama Y, Azmat KUU, Aisha ZM. 2014. Identification of virus isolates inducing mosaic of sugarcane in Makarfi local government area of Kaduna state, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 13:1351-1357. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.13467>
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ (eds). 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 16<sup>th</sup> January 1997. Disponible en línea: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/> (Consulta, julio de 2017).
- Chaves BG, Espejel F, Alcalá BRI, Hernández VJ, Silva RS. 2011. Short distance movement of genomic negative strands in a host and nonhost for *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). *Virology Journal* 8:15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-15>
- Chaves BG, Ortiz RLY. 2012. Evidencia de orígenes filogenéticos diferentes de dos aislamientos mexicanos del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV). *Acta Agronómica* 61:79-87. Disponible en línea: [https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/32464](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/32464)
- CONADESUCA, Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. 2015. *Fitopatologías*. <http://www.conadesuca.gob.mx> (Consulta, junio de 2016).
- Dallwitz MJ 1980. A general system for coding taxonomic descriptions. *Taxon* 29:41-46. <http://delta-intkey.com/www/dallwitz-1980.htm>
- Dallwitz MJ, Paine TA, Zurcher EJ. 1993. User's Guide to the DELTA System: a general system for processing taxonomic descriptions. <http://delta-intkey.com/www/uguide.htm>
- Engbrecht J, Brent R, Kaderbhai MA. 2001. Minipreps of Plasmid DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. 15:II:1.6.1-1.6.10. DOI: 10.1002/0471142727.mb0106s15
- Espejel F, Jeffers D, Noa CJC, Ruiz CS, Silva RL. 2006. Coat protein gene sequence of a Mexican isolate of *Sugarcane mosaic virus* and its infectivity in maize and sugarcane plants. *Archives of Virology* 151:409-412. DOI: 10.1007/s00705-005-0645-3
- Figueredo L, Hernández L, Linares B. 2004. Relación epidemiológica entre áfidos (Homoptera: Aphididae) y enfermedades virales en el cultivo caña de azúcar en los valles de los ríos Turbio y Yaracuy, Venezuela. *Caña de azúcar* 22:5-19.
- Filippone MP, Perera MF, Salgado M, García MG, Vellicce GR and Castagnaro P. 2010. Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* 87:1-11. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1851-30182010000200001](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-30182010000200001)
- Gonçalves MC, Pinto LR, Souza SC and Landell MGA. 2012. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. *Functional Plant Science and Biotechnology* 6:108-116. Disponible en línea: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/2012/FPSB\\_6\(S12\)/FPSB\\_6\(S12\)108-116o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/2012/FPSB_6(S12)/FPSB_6(S12)108-116o.pdf)
- Gonçalves MC, Santos AS, Maia IG, Chagas CM and Harakava R. 2007. Characterization of an isolate of *Sugarcane mosaic virus* breaking down resistance of commercial sugarcane varieties. *Fitopatologia Brasileira* 32:32-39. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000100004>
- Grisham MP and Pan YB. 2007. A genetic shift in the virus strains that cause mosaic in Louisiana sugarcane. *Plant Disease* 91: 453-458. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0453>
- Grisham MP. 1994. Strains of *Sorghum mosaic virus* causing sugarcane mosaic in Louisiana. *Plant Disease* 78:729-732. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n07\\_729.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n07_729.pdf)
- Grisham MP. 2000. Mosaic. Pp 249-254. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Ha C, Revill P, Harding RM, Vu M and Dale JL. 2008. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Archives of Virology* 153:45-60. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-007-1067-1>



- Hall JS, Adams B, Parsons TJ, French R, Lane LC and Jensen SG. 1998. Molecular cloning, sequencing and phylogenetic relationships of a new potyvirus: *Sugarcane streak mosaic virus* and a reevaluation of the classification of the Potyviridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:323-332. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0535>
- Hema M, Joseph J, Gopinath K, Sreenivasulu P and Savithri HS. 1999. Molecular characterization and intervirul relationships of a flexuous filamentous virus causing mosaic disease of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in India. *Archives of Virology* 144:479-490. Disponible en línea: <http://studylib.net/doc/13774806/molecular-characterization-and-interviral-relationships>
- Koike H, Guillaspie AG. 1989. Mosaic. Pp 287-288. In: C Ricaud, BT Egan, AG Gillaspie Jr, CG Hughes (eds). *Disease of sugarcane. Major Disease*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 387p.
- Moradi Z, Nazifi E and Mehrvar M. 2017. Occurrence and evolutionary analysis of coat protein gene sequences of Iranian isolates of *Sugarcane mosaic virus*. *The Plant Pathology Journal* 33:296-306. DOI:10.5423/PPJ.OA.10.2016.0219
- Raid RN, Comstock JC. 2000. Common rust. Pp 85-89. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Rao GP, Chatenet M, Girard JG and Rott P. 2006. Distribution of sugarcane mosaic and *Sugarcane streak mosaic virus* in India. *Sugar Technology* 8:79-81. <https://doi.org/10.1007/BF02943747>
- Riley SP, Woodman ME and Stevenson B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 00:4.2:4.2.1-4.2.25. DOI: 10.1002/9780470089941.et0402s00
- Saumtally AS and Sullivan S. 2000. Brown spot. Pp 77-80. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Sawazaki HE, Nogueira SLA, Gonçalves CRNCB, Arruda VRF and Colombo CA. 2013. Molecular diagnosis optimization of virus, bacteria and fungi in sugarcane. *International Research Journal of Plant Science* 4:76-83. Disponible en línea: <http://www.interesjournals.org/IRJPS>
- Singh M, Singh A, Upadhyaya PP and Rao GP. 2005. Transmission studies on an Indian isolate of sugarcane mosaic potyvirus. *Sugar Technology* 7:32-38. <https://doi.org/10.1007/BF02942526>
- Singh V, Sinha OK and Kumar R. 2003. Progressive decline in yield and quality of sugarcane due to sugarcane mosaic virus. *Indian Phytopathology* 56:500-502.
- Smith GR and Van de Velde R. 1994. Detection of *Sugarcane mosaic virus* and *Fiji disease virus* in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. *Plant Disease* 78:557-561. Disponible en línea: [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n06\\_557.pdf](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n06_557.pdf)
- Viswanathan R, Balamuralikrishnan M and Karuppaiah R. 2008. Characterization and genetic diversity of *Sugarcane streak mosaic virus* causing mosaic in sugarcane. *Virus Genes* 36(3):553-564. DOI:10.1007/s11262-008-0228
- Whittle PJJ and Irawan. 2000. Pokkah boeng. Pp 136-140. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Xie J, Wang M, Xu D, Li R and Zhou G. 2009. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *Journal of virological methods* 162:64-68. Disponible en línea: <https://docslide.net/documents/simultaneous-detection-and-identification-of-four-sugarcane-viruses-by-one-step.html>
- Xie X, Chen W, Fu Q, Zhang P, An T, Cui A, An D. 2016. Molecular Variability and Distribution of *Sugarcane Mosaic Virus* in Shanxi, China. *PLoS ONE* 11: e0151549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151549>
- Xu DL, Park JW, Mirkov TE and Zhou GH. 2008. Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. *Archives of Virology* 153:1031-1039. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0072-3>
- Yang ZN and Mirkov TE. 1997. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and *Sorghum mosaic virus* strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology* 87(9):932-939. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945064>
- Zhang YL, Pennerman KK, Wang H and Yin G. 2016. Characterization of a *Sorghum mosaic virus* (SrMV) isolate in China. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23:237-242. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.02.013>