

# IMPLEMENTACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE CASSAVA POLERO-LIKE VIRUS (CsPLV) EN ACCESIONES DE YUCA (MANIHOT ESCULENTA CRANTZ)



Diana Patricia Niño Jimenez<sup>1</sup> - Angélica María Martínez Vivas<sup>1</sup> – Mónica Carvajal<sup>3</sup> – Ericson Aranzales<sup>2</sup> - Maritza Cuervo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Sanidad de Germoplasma- PRG, CIAT; <sup>2</sup> Laboratorio de Conservación in vitro de yuca – PRG, CIAT; <sup>3</sup> Banco de ADN – PRG, CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Valle del Cauca, Colombia. d.nino@cgiar.org – m.cuervo@cgiar.org

## Introducción

El programa de Recursos Genéticos del CIAT conserva tres colecciones de importancia económica: frijol con 37.938 accesiones, forrajes con 22.694 y yuca con 6.155. Una de las responsabilidades del banco de germoplasma es asegurar la calidad fitosanitaria de las colecciones conservadas y realizar una distribución segura a nivel nacional e internacional. Para la yuca, el Laboratorio Sanidad de Germoplasma realiza la certificación sanitaria para tres enfermedades cuarentenarias: Virus X (CsXV), Mosaico común de la yuca (CsCMV) y la enfermedad del cuero de sapo (CsFSD). En esta última, se asocian cuatro especies virales: Cassava frogskin-associated virus (CsFSaV), *Cassava new alpha-flexivirus* (CsNAV), *Cassava Polero-like virus* (CsPLV), *Cassava torrado-like virus* (CsTLV) y un fitoplasma del grupo 16SrIII-L. Actualmente el diagnóstico es realizado con PCR convencional (CsNAV, CsPLV y CsTLV), PCR en tiempo real (CsFSaV) y LAMP (fitoplasma 16SrIII-L). Para asegurar la certificación sanitaria es necesario actualizar las diferentes técnicas de diagnóstico buscando una mayor sensibilidad en la detección del patógeno, por esta razón se implementó la técnica qPCR para el diagnóstico del virus CsPLV en el equipo Rotor gene-Q, lo que permitió su detección en un mayor número de muestras y una mayor sensibilidad en comparación con la PCR convencional.



## 2. Metodología

### 2.1 Preparación de curva estándar

- El estándar utilizado correspondió a un plásmido clonado con ADNc de CsPLV
- Se realizaron 8 diluciones seriadas

Factor de dilución: 0.1

Reactivo:	Concentración final en la Reacción	
Master Mix	1X	
Solución de cebadores /sonda	Luteo-qPCR-F	900 nM
	Luteo-qPCR-R	900 nM
	Luteo-FAM-BHQ1	200 nM
Agua	-	

#### Perfil de amplificación:

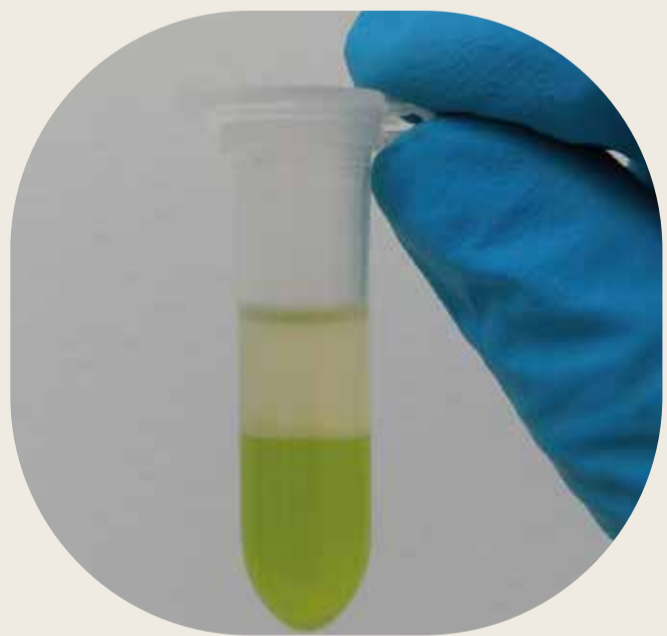
1. Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos, 2. 40 ciclos de una desnaturalización a 95 °C por 15 segundos 3. alineamiento y extensión a 58 °C por 1 minuto.

### 2.2 Evaluación de muestras de yuca con qPCR



Comparación de resultados entre PCR y qPCR

204 muestras

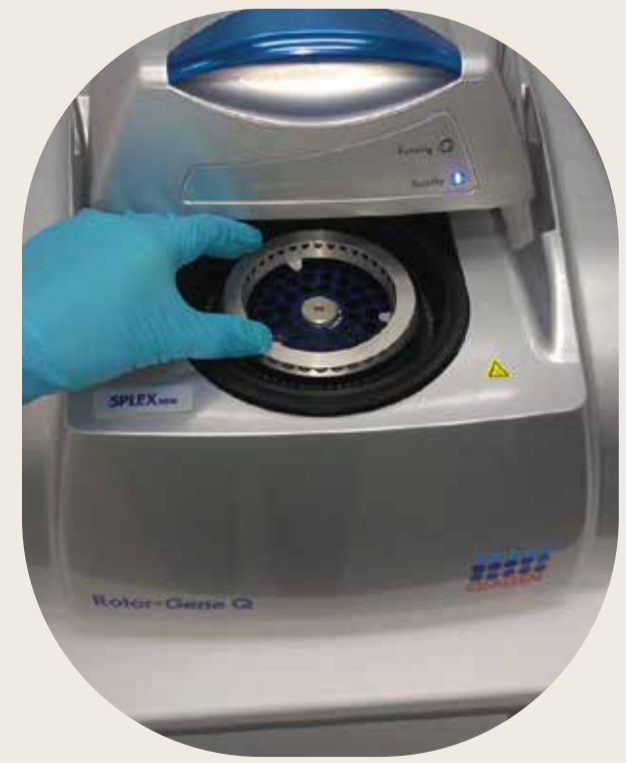


2.1.1 Extracción de RNA CTAB (Lopez et al., 2006).

2.1.2 Síntesis de cDNA PCR Control Interno.

#### Evaluación

**Controles:**  
**Positivo:** Plásmido clonado con ADNc de CsPLV  
**Negativo:** Secundina Sana y blanco: Mix de reacción



qPCR – Rotor Gene Q



#### Confirmación de resultados:

Las muestras obtenidas positivas fueron confirmadas mediante secuenciación.

Reactivo	Cebadores / sonda	Secuencia
qPCR	Luteo-qPCR-F	5'-AGAAGCGAAGAAGACGAAA-3'
	Luteo-qPCR-R	5'-GTGCCAAATTTCTTCCGAAC-3'
	Luteo-FAM-BHQ1	5'-CGCCCTCCAATTGCGCTTCT-3'
PCR	CsPLV-F2	5'-TTGCATTCAAAGATCAGTTCTCTC-3'
	CsPLV-R3	5'-TGGTTGACAGCTGTTTCAGAGG-3'

Tabla 2. Cebadores específicos para el diagnóstico de CsPLV (Carvajal et al., 2014)

## 3. Resultados y discusiones

### 3.1 Curva estándar

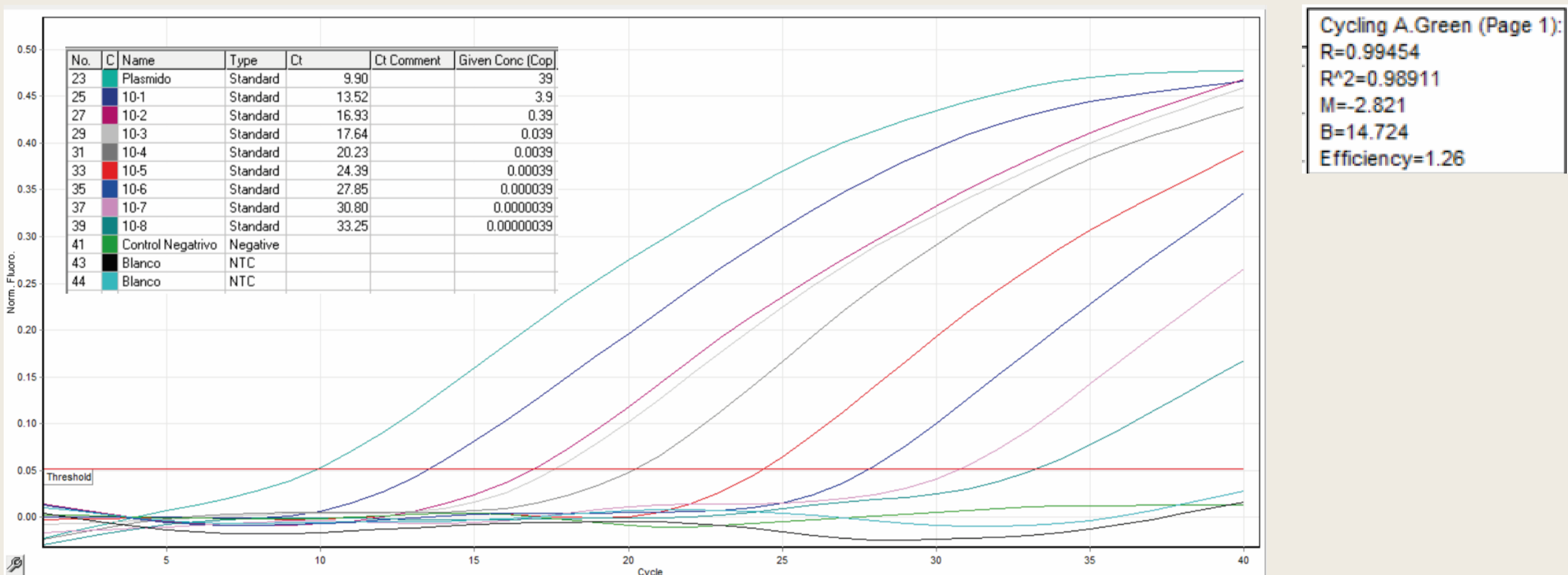


Figura 1.

Curva estándar donde se observan 9 curvas de amplificación con diferentes CTs, correspondientes a las primeras diluciones, el control negativo y blanco no marcaron CT, la curva presentó una eficiencia de 1.26 con un coeficiente de relación (R<sup>2</sup>) de 0.98, valores que indican que hay una alta correlación lineal entre la concentración de las diluciones y la señal del equipo.

### 3.2 PCR en tiempo real (qPCR) para CsPLV

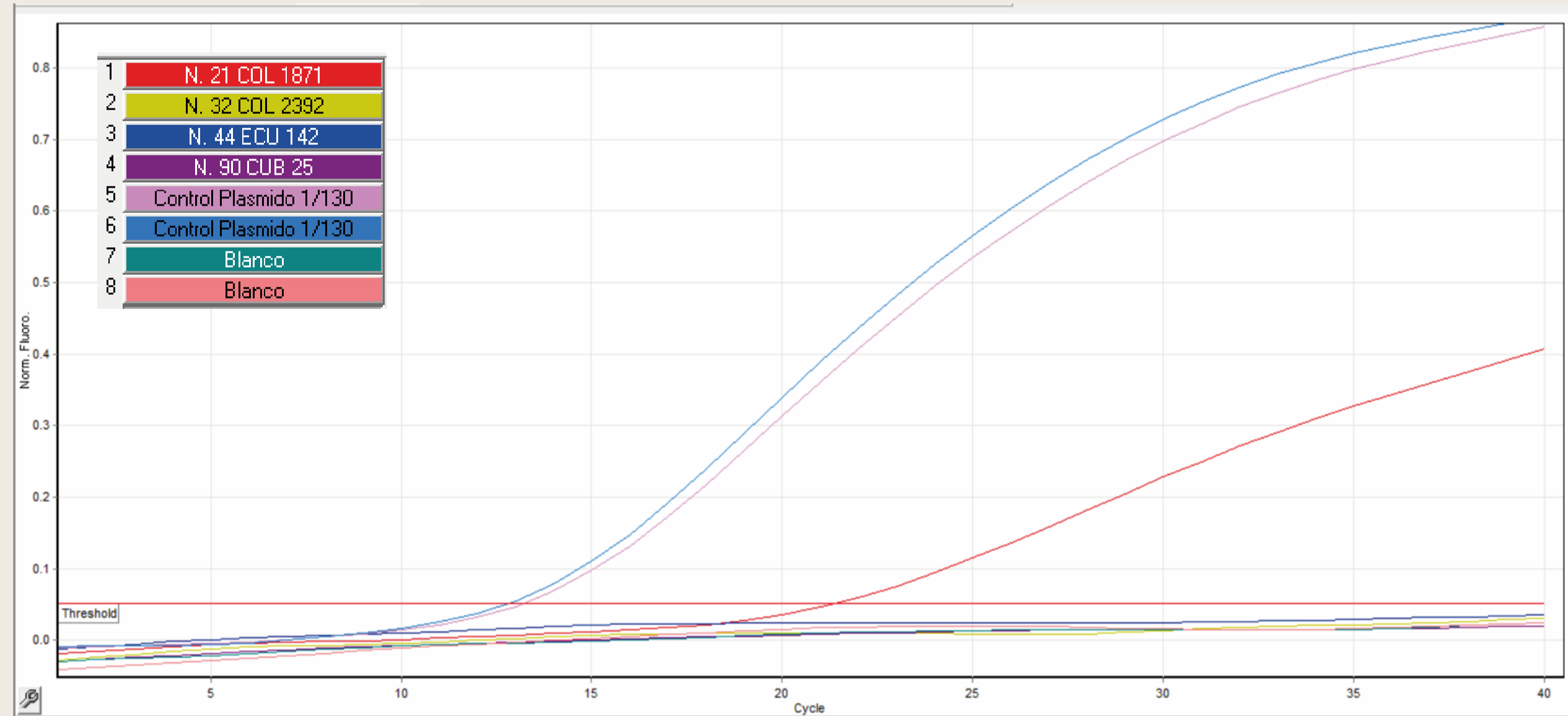


Figura 2.

Resultado de q-PCR para el diagnóstico de CsPLV, en donde se observan tres curvas de amplificación: 1. con CT No 12.82 que corresponde al primer control positivo, 2. Con CT No 13.23 correspondiente al segundo control positivo y 3. Con CT No 21.43 correspondiente a una muestra. Se consideran positivas todas las muestras con CTs menores a 35.

### 3.3 Comparación de resultados entre PCR y qPCR

Como método de confirmación, las muestras obtenidas positivas con qPCR fueron enviadas a secuenciar. Posteriormente se realizó una comparación con base de datos por medio de la herramienta BLAST, las muestras presentaron una identidad mayor al 90% para *Cassava polero-like virus*, lo que demuestra que la qPCR presenta mayor sensibilidad y por lo tanto un mayor porcentaje de detección para este patógeno.

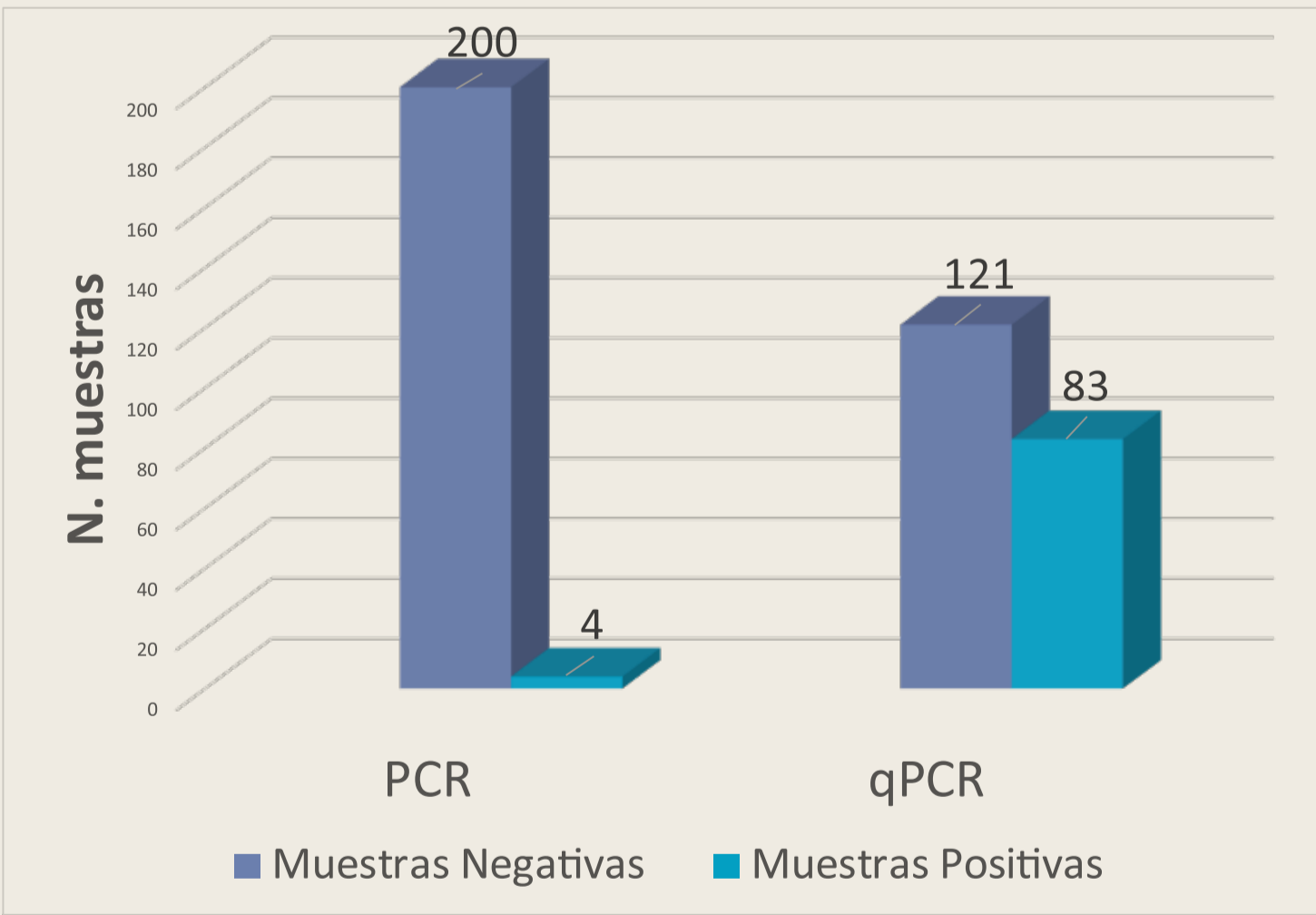


Figura 3.

Resultados de 204 materiales evaluados mediante qPCR: Se obtuvieron 83 (40%) muestras positivas, mientras que por PCR solo 4 (2%) fueron detectadas.

## Conclusiones

Con las condiciones de reacción y amplificación implementadas para qPCR, se logró la amplificación de controles positivos para CsPLV (Plásmido) y la obtención de controles negativos confiables en el diagnóstico de este virus. En la comparación de las metodologías evaluadas, la qPCR mostró un 40% de sensibilidad frente a un 2% de la PCR convencional, disminuyendo además el tiempo de evaluación lo que contribuye con la mejora de los procesos de diagnóstico en cuanto a eficiencia y sensibilidad garantizando así una distribución más segura del germoplasma de yuca.

## REFERENCIA

Álvarez E; Mejía JF; Llano GA; Loke JB; Calari A; Duduk B; Bertaccini A. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. Plant Dis. 93:1139-1145.  
Calvert L; Cuervo M; Lozano I; Villareal N; Arroyave J. 2008. Identification of three strains of a virus associated with cassava plants affected by frogskin disease. Journal of Phytopathology 156:647-653.  
Carvajal M; Olaya C; Lozano I; Cuervo M; Castaño M; Cuellar W. 2014. Unraveling complex viral infections in cassava (Manihot esculenta Crantz) from Colombia. Virus Research 186:76-86.  
Cuervo M; Martínez A; Niño D.P.; Ramírez J.C.; Muñoz L.; Gutierrez A., (2017). Manual de procedimientos del laboratorio Sanidad de germoplasma; Certificación Sanitaria del Germoplasma de Yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Palmira, Valle del cauca, Colombia.