

67
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE PCR PARA EL
DIAGNOSTICO DE "PUNTA MORADA" DE LA PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) Y SU OCURRENCIA EN LA
REGION DE SAN RAFAEL, MUNICIPIO DE
GALEANA, NUEVO LEON

POR
FERNANDO CEBALLOS MEDINA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCION
AGRICOLA

FEBRERO, 2002

TM

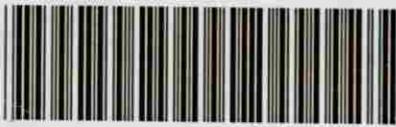
SB608

.P8

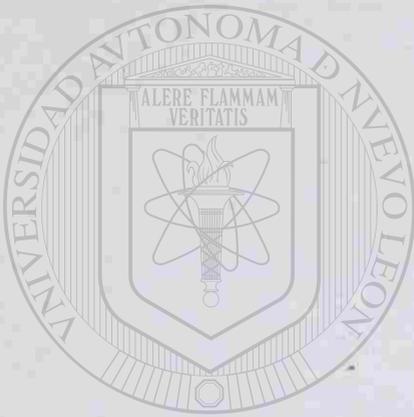
C4

2002

c.1



1080124382



UANL

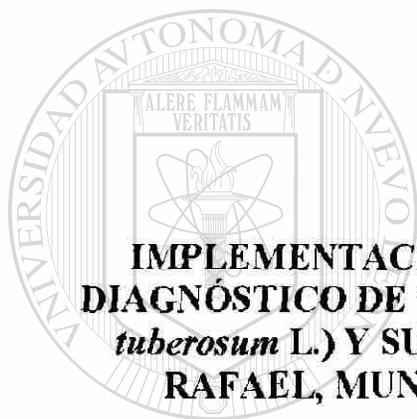
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL
DIAGNÓSTICO DE “PUNTA MORADA” DE LA PAPA (*Solanum
tuberosum* L.) Y SU OCURRENCIA EN LA REGIÓN DE SAN
RAFAEL, MUNICIPIO DE GALEANA, NUEVO LEÓN**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

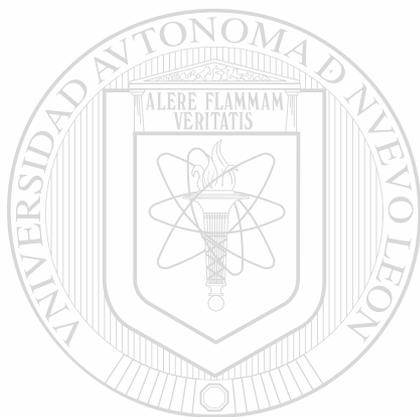
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FERNANDO CEBALLOS MEDINA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

Febrero, 2002

TM
SB608
- P8
C4
202



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

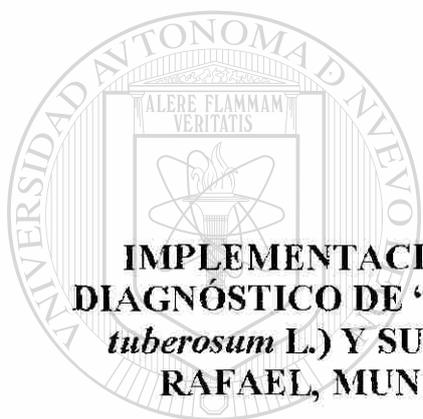
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL
DIAGNÓSTICO DE “PUNTA MORADA” DE LA PAPA (*Solanum
tuberosum* L.) Y SU OCURRENCIA EN LA REGIÓN DE SAN
RAFAEL, MUNICIPIO DE GALEANA, NUEVO LEÓN**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

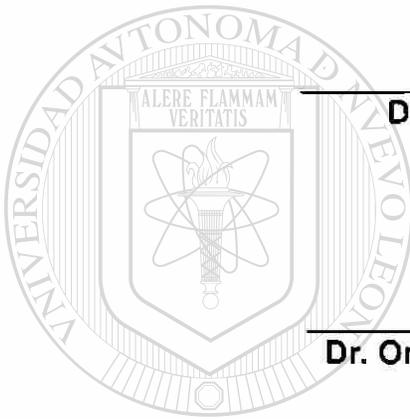
FERNANDO CEBALLOS MEDINA

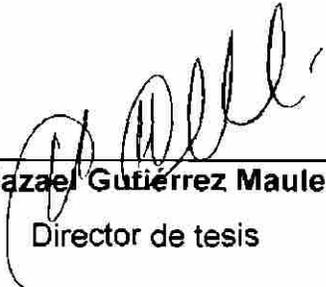
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

Febrero, 2002

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL
DIAGNÓSTICO DE “PUNTA MORADA” DE LA PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) Y SU OCURRENCIA EN LA REGIÓN
DE SAN RAFAEL, MUNICIPIO DE GALEANA, NUEVO LEÓN**

Aprobación de tesis por el comité particular





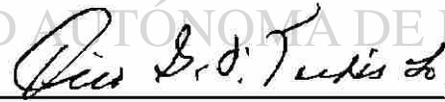
Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón

Director de tesis



Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez

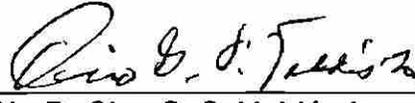
Co-Director



Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Asesor



Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano

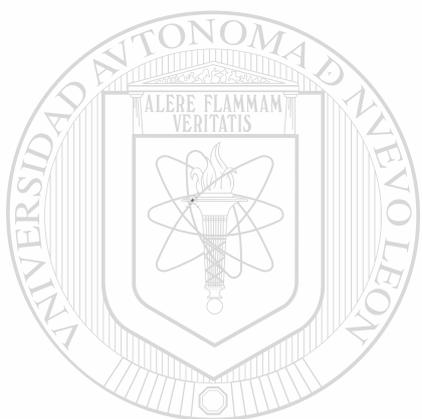
Subdirector de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía
Universidad Autónoma de Nuevo León

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Abreviaturas y simbología.....	III
Lista de Cuadros.....	IV
Lista de Figuras.....	V
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Punta morada de la papa.....	4
2.1.1 Importancia económica.....	4
2.1.2 Agente causal.....	5
2.1.3 Sintomatología.....	6
2.1.4 Formas de transmisión.....	7
2.1.5 Incidencia y control.....	9
2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
2.2.1 Etapas de la PCR.....	12
2.2.2 Componentes requeridos.....	13
2.3 Diagnóstico de enfermedades causadas por fitoplasmas.....	15
2.3.1 Detección por PCR.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Fuente de fitoplasmas.....	23
3.2 Aislamiento y cuantificación de ADN total.....	24
3.2.1 Comparación de métodos de extracción.....	25
3.2.2 Comparación de tejidos vegetales.....	30

	Pág.
3.3 Amplificación parcial del genoma del fitoplasma.....	30
3.3.1 Selección, análisis y síntesis de iniciadores.....	30
3.3.2 Establecimiento de las condiciones de reacción.....	31
3.3.3 Detección en plantas con PCR directo.....	33
3.3.4 PCR anidado.....	33
3.3.5 Detección en tubérculos sintomáticos y y asintomáticos.....	34
3.3.6 Detección en semilla.....	34
3.4 Ocurrencia de "punta morada" en San Rafael, Galeana, N.L.....	34
3.4.1 Muestreo de material vegetal.....	34
3.4.2 Inducción a brotación de los tubérculos.....	37
3.4.3 Determinación de la incidencia de "punta morada".....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 Aislamiento y cuantificación de ADN total.....	40
4.1.1 Comparación de métodos de extracción y tejidos vegetales.....	40
4.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	43
4.2.1 Establecimiento de las condiciones de reacción.....	43
4.2.2 Detección en plantas con PCR directo.....	46
4.2.3 PCR anidado.....	47
4.2.4 Detección en tubérculos sintomáticos y asintomáticos.....	48
4.2.5 Detección en semilla.....	50
4.3 Ocurrencia de "punta morada" en San Rafael, Galeana, N. L.....	51
V. CONCLUSIONES.....	53
VI. RECOMENDACIONES.....	55
VII. LITERATURA CITADA.....	56

	Pág.
VIII. APÉNDICE.....	61
8.1 Síntomas de la enfermedad.....	61
8.2 Selección de iniciadores.....	62
8.3 Secuencias disponibles de los fitoplasmas causantes de “brote de hilo” y “punta morada”.....	63
8.4 Simulación computacional de PCR.....	65



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis principalmente a Dios por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida y estar conmigo en los más alegres. Gracias Dios mío por ser la luz que me guía en el camino.

A mis padres: Pedro Ceballos Cervantes y Lucia Medina Bautista, gracias por darme la vida, por quererme, y apoyarme en la realización de mis metas, gracias y que Dios los bendiga siempre.

A mis hermanos: Javier, Pedro, Alma, Efraín e Irma por ser hermanos y amigos a la vez y que la unión que hay entre nosotros perdure por siempre, los quiero mucho.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
A mis sobrinos Valeria y Maximiliano, por que su llegada a nuestra familia es una bendición de Dios e hizo que nuestra vida fuera más feliz.

A mi novia Ana de la Serna C., por creer en mi de nuevo y por que el amor que existe entre nosotros me hace muy feliz.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Agronomía por abrirme sus puertas y sus conocimientos.

Deseo expresar también mis agradecimientos al Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón por ser mi asesor principal y por apoyarme siempre durante la realización de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer al Dr. Omar G. Alvarado Gómez por el apoyo incondicional para la realización de esta tesis y por asesorarme en esta nueva área de estudio.

También quiero agradecer al Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano por sus buenas aportaciones para mejorar este trabajo de investigación y por sus conocimientos en el salón de clases.

Deseo expresar mis agradecimientos a la Ing. Verónica Ancona Contreras por su invaluable amistad y por ser mi compañera de laboratorio y en toda la realización de esta tesis.

Agradezco a todos mis compañeros por brindarme su amistad y por compartir buenos momentos de estudio.

Quiero expresar mis agradecimientos al personal administrativo y de laboratorio por ayudarme directa o indirectamente en la realización de esta tesis y a todo el personal que de alguna manera contribuyó a esta causa.

Quiero agradecer a Doña Tere y a Don Arturo por muchos años de amistad y por sus buenos deseos expresados hacia mi, gracias.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
aprox.	Aproximadamente
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
CONAPAPA	Confederación de Productores de Papa de México
CTAB	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
DAPI	4, 6-diamidin-2-fenilindole.2HCl
dNTP's	Desoxinucleósidos trifosfatados
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
Fig	Figura
g	Gramos como medida de peso, y gravedades como fuerza centrífuga
ha	Hectáreas
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
Kb	Kilobase
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
Na ₂ EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, sal disódica
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
N.L.	Nuevo León.
No.	Número
Pág.	Página
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pmoles	Picomoles
PVP	Polivinilpirrolidona
RFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción
SAGAR	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
Taq	Enzima termoestable que polimeriza ADN, proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Solución amortiguadora a base de tris, ácido bórico y Na ₂ EDTA
TE	Solución amortiguadora a base de tris y Na ₂ EDTA
TEN	Solución amortiguadora a base de tris, Na EDTA y cloruro de sodio
Tris	TRISMA® Base. Tris [Hidroximetil] aminometano
X	Número de veces con respecto a la concentración original
µg	microgramos
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
µM	Concentración micromolar
°C	Grados Celsius
%	Por ciento (medida de cantidad)
'	Minutos (medida de tiempo)
"	Segundo (medida de tiempo)
16S, 23S	Ácidos desoxirribonucleicos ribosomales con coeficientes de sedimentación 16 y 23

LISTA DE CUADROS

No.	Descripción	Pág.
1.	Secuencias de los iniciadores utilizados en la amplificación de ADN de fitoplasmas en papa.....	31
2.	Lotes comerciales de papa muestreados en el año 2000 en la región de San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León.....	36
3.	Bodegas con "semilla" de papa muestreadas en San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León.....	37
4.	Rendimiento de ADN ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido) obtenido de diferentes tejidos de plantas de papa con síntomas de "punta morada".....	41
5.	Secuencias disponibles en Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) de los fitoplasmas causantes de "brote de hilo" y "punta morada".....	63

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1.	Esquema general del procedimiento llevado a cabo en la implementación de las técnicas de extracción de ADN y PCR para la detección de fitoplasmas en papa, y determinación de su ocurrencia en San Rafael, Galeana, N.L.....	24
2.	ADN obtenido por tres métodos de extracción, a partir de diferentes tejidos, visualizado en un gel de agarosa al 1 %.....	42
3.	Fragmentos amplificados por PCR utilizando cuatro pares de iniciadores y tres concentraciones de MgCl ₂ , visualizado en un gel de agarosa al 1 %.....	44
4.	Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores P1/Tint y ADN de plantas de papa, visualizado en un gel de agarosa al 1 %.....	45
5.	Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores fU5/rU3 y ADN de diferentes especies vegetales, visualizado en un gel de agarosa al 1 %.....	47
6.	Fragmentos amplificados por PCR y PCR-anidado utilizando los iniciadores P1/Tint y fU5/rU3 con ADN de papa, visualizado en un gel de agarosa al 1%.....	48
7.	Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores fU5/rU3 con ADN obtenido de la unión del tubérculo con el estolón, visualizado en un gel de agarosa al 1%.....	50
8.	Síntomas asociados con la ocurrencia de fitoplasmas en papa.....	61

No.	Descripción	Pág.
9.	Representación esquemática de los genes 16S y 23S ARN ribosomal de fitoplasmas y la región intergénica.....	62
10.	Simulación de amplificación por PCR de una parte del genoma del fitoplasma causante de la "punta morada" de la papa, utilizando la accesión No. AF222064 como secuencia molde y los iniciadores P1, Tint, P7, rU5, rU3, R16F2 y R16R2.....	65



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

El diagnóstico de la enfermedad "punta morada" de la papa, causada por fitoplasmas, se ha realizado mediante la observación de síntomas en planta y en tubérculo, lo cual es poco confiable, debido a que estos pueden confundirse con manifestaciones ó expresiones de otras enfermedades y deficiencias nutricionales. Debido a la necesidad de tener métodos precisos, rápidos y sensibles para determinar la sanidad de la semilla y en consecuencia de los cultivos comerciales de papa, se planteó el presente trabajo con los objetivos de comparar algunos métodos de extracción de ADN, establecer las condiciones de reacción para la detección de los fitoplasmas causantes de "punta morada" en papa por PCR, y determinar la ocurrencia de la enfermedad en lotes comerciales de campo y bodegas de semilla de papa, localizadas en la región de San Rafael, municipio de Galeana, N.L., México. Los métodos de extracción de ADN, Doyle y Doyle (1990), Dellaporta y cols. (1983) y DNAzol ES[®], fueron efectivos tanto para la obtención de ADN de buena calidad y cantidad, como para la detección de fitoplasmas por PCR. Se establecieron las mejores condiciones de reacción para la amplificación por PCR, de secuencias parciales de ADN de fitoplasmas causantes de "punta morada" de la papa, siendo la concentración de 2.4 mM de MgCl₂ y los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995) los más efectivos. La ocurrencia estimada de la enfermedad, diagnosticada por PCR, fue de 7.7 % para la zona de estudio.

SUMMARY

The diagnosis of "purple top" potato disease caused by phytoplasmas has been made by the observations in plant and tuber symptoms; this method is not very reliable since "purple top" symptoms may be confused with another symptoms produced by other diseases and even by nutritional deficiencies. Due necessity to have precise methods, speed and sensitive by seed health and potato comercial planting, the objectives of this work were to compare some DNA extraction methods, to establish the reaction conditions for "purple top" phytoplasmas detections by PCR and to determine disease ocurrence in potato fields as well in stored potato tuber seed at San Rafael Galeana, Nuevo León, México. All DNA extractions methods, Doyle and Doyle (1990), Dellaporta (1983) and DNAzol ES[®], were efective to obtain DNA with good quantity and quality, as well for phytoplasmas detection by PCR. The best PCR amplifications conditions for "purple top" phytoplasmas DNA partial sequences were[®] established, being the 2.4 mM MgCl₂ concentration and the primers fU5/rU3, the most effective. By PCR diagnosis, there was a 7.7 % of disease ocurrence at the study region.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los más importantes a nivel mundial, ya que genera gran cantidad de recursos económicos en el sector agrícola. El Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) reportó para México en el año 2000, una superficie cosechada de 65,852 ha de este cultivo. Del costo total de cultivo, un 40 % se destina a la adquisición de tubérculos (Martínez y López, 1999).

En los estados de Coahuila y Nuevo León, se siembran alrededor de 6,000 ha de papa, que representan una importante fuente de ingresos. La región contribuye con el 11 % de la producción nacional y se obtienen un promedio de 30 a 35 toneladas por ha, superando la media nacional, que es de 20 a 22 toneladas (INEGI, 2000).

Uno de los aspectos más relevantes en este cultivo es la sanidad, por ello adquieren gran atención las enfermedades que inciden en las zonas de producción; algunas como el tizón tardío (*Phytophthora infestans* [Mont] de Bary), han sido y siguen siendo motivo de preocupación para los productores, sin embargo, existe otra enfermedad que está considerada en México, después del tizón tardío, como la más importante del cultivo de la papa; esta enfermedad es conocida como "punta morada", y su nombre fue adquirido por la coloración púrpura que adquieren las hojas apicales en las plantas infectadas (Salazar, 1999).

La "punta morada" provoca que se pierda gran cantidad de semilla, debido a que los tubérculos infectados no brotan o emiten brotes muy débiles, llamados "brotes de hilo", los cuales no alcanzan su desarrollo completo. Existe poca información sobre esto último, siendo un problema que está presente en las zonas de producción, ya que los agricultores pierden mucha semilla que no brota y por lo tanto no es viable para la siembra.

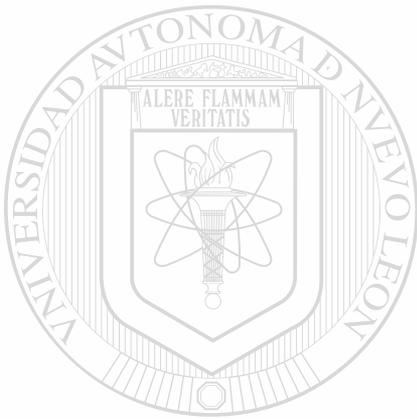
En los últimos años, la forma de diagnosticar la enfermedad, ha sido a través de la observación de síntomas; sin embargo, este método no es muy confiable y es tardado. Por otro lado, aunque se sabe de la incidencia de la enfermedad, en las zonas de producción del estado de Nuevo León, no se tiene una estimación de la misma. Debido a esta problemática, surge la necesidad de contar con técnicas de detección de la "punta morada" más rápidas, sensibles y seguras, ya que un diagnóstico en semilla puede evitar la diseminación de la enfermedad y sus consecuencias.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1 Objetivos

- 1) Evaluación de métodos de extracción de ADN con diferentes tejidos de plantas y tubérculos de papa.
- 2) Establecimiento y optimización de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del ADN de fitoplasmas que causan la enfermedad "punta morada" en el cultivo de la papa.

3) Determinación de la ocurrencia de "punta morada" de la papa, en la región de San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Punta morada de la papa

2.1.1 Importancia económica. La "punta morada" de la papa es una enfermedad reportada en México desde los años cincuenta y actualmente es una de las enfermedades más importantes de este cultivo en el país. Se encuentra distribuida en la mayoría de las zonas productoras de papa, afectando la calidad y el rendimiento, a tal grado que dificulta o imposibilita su comercialización para consumo en fresco o en la industria de hojuelas fritas, debido a la necrosis que induce en el interior de los tubérculos enfermos. Además es un factor limitante para la producción de semilla, debido a que los tubérculos infectados no brotan, o emiten brotes débiles o muy delgados (brotes finos), dichos tubérculos son desechados, lo que provoca pérdida de semilla. Considerando que en México la semilla de papa se comercializa mucho antes de que brote completamente y por lo tanto no se sabe en ese momento el porcentaje de infección de la semilla; la enfermedad puede provocar pérdidas económicas al momento de sembrarla, ya que la densidad de población deseada no será realmente la que se establezca en el campo (Zavala, 1998).

Existen dos países que han reportado problemas serios por fitoplasmas en papa, estos son México y Perú. En México esta enfermedad es considerada después del tizón tardío, como la más importante del cultivo de la papa. Los síntomas de la punta morada se detectaron en México desde

hace 50 años, sin embargo, su importancia se ha incrementado en los últimos 5 años. Actualmente se estima que un 50 % de la superficie sembrada con papa en México esta afectada por la enfermedad. Las pérdidas varían según la severidad de la enfermedad, llegando a ser hasta de un 80 % del rendimiento. Además de las pérdidas de rendimiento, los tubérculos infectados pierden valor comercial por la necrosis interna en los mismos y esto ocasiona baja calidad industrial (Salazar, 1999).

2.1.2 Agente causal. El agente causal de la “punta morada” pertenece al grupo de los microorganismos conocidos como fitoplasmas, anteriormente llamados organismos tipo micoplasma (Martínez y López, 1999). Estos organismos fueron descubiertos y descritos por primera vez por Doi y cols. en el año de 1967, observando en el floema de las plantas infectadas, microorganismos parecidos a los micoplasmas que infectaban a humanos. Al verlos en el microscopio electrónico se pensó inicialmente que eran virus.

Los fitoplasmas presentan algunas características similares a los micoplasmas verdaderos: son organismos pleomórficos, considerados como procariotes, con ausencia de pared, dimensiones de 0.2 a 1.0 μm y genoma muy pequeño (600 Kb) por lo que han sido agrupados en la clase Mollicutes; sin embargo, todavía se diferencian de estos últimos en algunas características importantes: los fitoplasmas viven dentro de las células del floema en las plantas, mientras que los micoplasmas verdaderos viven en el hombre y animales, y tienen la capacidad de desarrollarse dentro de los espacios intercelulares de los tejidos que colonizan. Los fitoplasmas, a

diferencia de los micoplasmas verdaderos, no pueden ser cultivados en substratos artificiales, debido a que carecen de los genes necesarios para la síntesis de algunos aminoácidos, ácidos grasos y lípidos esenciales para el desarrollo fuera del hospedero (Albanese y cols., 1995).

2.1.3 Sintomatología. Los principales síntomas de la enfermedad "punta morada" son la falta de crecimiento, enrollamientos de las hojas apicales y coloración púrpura en las mismas. Los tallos pueden llegar a estar engrosados y es común encontrar tubérculos aéreos en las plantas enfermas. En los tubérculos almacenados la infección con fitoplasmas es asintomática (Rowe, 1993).

Quando los fitoplasmas sobreviven en los tubérculos almacenados para semilla, las plantas que de estos se generen en el siguiente ciclo desarrollarán los síntomas característicos de la enfermedad; sin embargo, si el fitoplasma no sobrevive en dichos tubérculos, las plantas podrían ser normales. Otra característica importante en los tubérculos infectados con fitoplasmas son los "brotes de hilo" que son brotes finos, delgados y blancos de 2 mm de diámetro que no producen una planta viable (Hooker, 1981).

En los tubérculos se puede presentar una necrosis causada por la presencia de fitoplasmas, que se dispersa a través de todo el interior del tubérculo, con más concentración en el anillo vascular. La enfermedad de "punta morada" se considera de autoeliminación, debido a que los tubérculos infectados al no brotar, ó producir brotes débiles, no desarrollan plantas,

aunque si llegaran a producirlas, estas suelen ser con falta de crecimiento y no producirán tubérculos (Strand y cols., 1992).

Los tubérculos que producen brotes finos no son distintos de los tubérculos normales por su apariencia externa, estos sólo pueden ser identificados por sus brotes característicos, es decir, elongados y débiles después de la brotación, lo cual ocurre después de la cosecha. Las infecciones tempranas, iniciadas 30 días después de la siembra, dan como resultado tubérculos de tamaño y número reducido, y con 100 % de brote fino, en cambio las infecciones iniciadas 44 o más días después de la siembra producen un número normal de tubérculos, pero ligeramente reducidos en tamaño de los cuales aproximadamente el 50 % brota de manera normal. Un corte transversal en el tejido de la unión entre el tubérculo y el estolón, permite observar en tubérculos infectados, un estriado pardo característico de la infección por fitoplasmas (Martínez y López, 1999).

2.1.4 Formas de transmisión. Harding y Teakle (1985) realizaron estudios en Australia para ver la eficiencia con que los fitoplasmas son transmitidos de una especie vegetal a otra. El agente causal de la hoja pequeña en berenjena fue transmitido por injerto a tomate, causando agrandamiento de brotes; este último se transmitió a la papa, por injerto o por medio de la chicharrita *Orosius argentatus*, resultando en el desarrollo de marchitamiento por "punta morada". Posteriormente, se realizaron observaciones al microscopio electrónico de las plantas de tomate y papa infectadas con fitoplasmas, por medio de injerto o por chicharritas como vectores, lo cual

demostró la presencia de fitoplasmas en el floema. Cuando los tubérculos de papa, provenientes de plantas infectadas fueron plantados, el 73% produjo brotes de hilo y el 44% de estos presentó más tarde síntomas de marchitamiento por "punta morada".

En la India, las ninfas de *Aleobroides nigroscutellatus* están reportadas como los mejores transmisores de fitoplasmas que provocan punta morada en el cultivo de la papa; sin embargo, los adultos de *A. nigroscutellatus* no han sido considerados como buenos transmisores de estos organismos. Las hembras infectadas producen 35% menos de ninfas, de las cuales el 42% muere y el resto, el 58% llega a la etapa adulta, los cuales potencialmente pueden transmitir el patógeno. La media de longevidad de los insectos adultos, que adquieren el patógeno en estado de ninfa, se ha determinado en 34 días, comparado con 51 días cuando el fitoplasma es adquirido en etapa adulta y 61 días en insectos sanos (Singh y cols., 1983).

En Australia, *Orosius argentatus* está reportado que transmite la enfermedad de la hoja pequeña de la legumbre, proliferación de las hojas del tomate, la escoba de bruja de la alfalfa, la virescencia del tabaco y punta morada de la papa (Grylls, 1979 citado por Lee y cols., 1998).

En un estudio realizado en el Valle de México para conocer la dinámica de poblaciones de chicharritas en el cultivo de la papa, se encontró como probables vectores de "punta morada" las especies colectadas de: *Agallia barreti*, *Aceratagallia fuscscripta*, *Idiocerus sp.*, *Draeculacephala*

crassicornis, *Carnecephala sagittifera*, *Keonella confluens* var. *pacífica* y *Empoasca fabae*. También se encontraron insectos del género *Macrosteles* los cuales fueron considerados, debido a su analogía genérica con el vector probado de "punta morada" *Macrosteles fascifrons* (Ramírez y Ramos, 1978).

2.1.5 Incidencia y control. En México, un estudio realizado por Cadena y Galindo (1985) en donde se evaluaron diferentes variedades para probar su resistencia a la enfermedad de "punta morada" de la papa, encontraron que las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad, debido a los fitoplasmas presentes en los haces vasculares, pueden alcanzar el orden del 100 % y la incidencia puede ser reducida, al realizar las plantaciones en la etapa tardía, en el valle de México. En este mismo estudio se encontró que las variedades Atleet, Loman, Bintaje, Alemana 4 y Alpha fueron resistentes a punta morada, además de los clones 65-WIS, 64-MX-4, 64-Hol-88 y 58-ES-26.

En el año de 1995 y 1996 se realizó un estudio en los campos experimentales del INIFAP, en el Valle de México, para evaluar cuatro genotipos de papa, tres distancias entre plantas y un insecticida para el control de punta morada de la papa. Las variedades utilizadas fueron Alpha, Gigant, Granola y BGPM- 6, las distancias entre plantas consistieron de 25, 50 y 100 cm, y el insecticida probado para el control fue el Imidacloprid. En general no hubo diferencias significativas en cuanto a la incidencia de la enfermedad entre las variedades. En cuanto a la distancia entre plantas, se observó que al aumentar esta, la incidencia de la enfermedad se

incrementaba, así, la incidencia de la enfermedad también aumentó en las parcelas sin aplicación de Imidacloprid, que en las que sí se aplicó el producto (Cadena, 2000).

Se ha demostrado que las enfermedades ocasionadas por fitoplasmas responden al tratamiento con antibióticos como tetraciclina pero tales tratamientos no son curativos y la remisión de síntomas inducida dura un período de tiempo variable dependiendo de la enfermedad que se trate. En general las enfermedades de plantas herbáceas tienen un período de remisión corto, en plantas leñosas se pueden obtener períodos de remisión de uno o varios años, por lo que en estas últimas, tales tratamientos son viables económicamente. La oxitetraciclina ha sido utilizada en plantas afectadas por fitoplasmas en forma preventiva. La remisión inducida por la tetraciclina, mas no por la penicilina, es indicativo de una infección por fitoplasmas y puede proveer evidencia de la etiología de estos organismos, especialmente cuando son vistos en el microscopio electrónico pero desaparecen después del tratamiento (Barile y cols., 1979).

Se ha intentado el control de la "punta morada" de la papa con aspersiones foliares con oxitetraciclina, sin embargo, hay que considerar su alto costo y frecuencia de aplicación. Los síntomas y efectos son suprimidos significativamente en la planta hospedante y en los vectores; este enmascaramiento de síntomas (remisión) está también acompañado por la reducción en la cantidad de fitoplasmas observado por microscopía electrónica en el floema de plantas tratadas. Desafortunadamente tal

remisión es temporal, ya que la aplicación de antibióticos no resulta en una erradicación o inactivación de los fitoplasmas (Martínez y López, 1999).

2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa ofrece un método simple e ingenioso para amplificar exponencialmente secuencias específicas de ADN, a través de una síntesis *in vitro*. La PCR tiene varias ventajas con respecto a los métodos tradicionales de diagnóstico, ya que los organismos no necesitan ser previamente cultivados en medios especiales; la técnica posee una alta sensibilidad y un alto potencial para detectar secuencias de ADN propias de algún organismo de interés e identificarlo dentro de una mezcla de material genético de varios organismos; además la prueba es rápida y versátil (Henson y French, 1993).

Las tres etapas esenciales de la PCR son: 1) la separación de la cadena del ADN molde, 2) el anillamiento de un par de iniciadores a las cadenas de ADN desnaturalizadas y 3) la extensión del iniciador por medio de una enzima polimerasa ADN termoestable. Las cadenas sintetizadas sirven de molde para la nueva síntesis de ADN, repitiéndose estos pasos hasta 40 veces. La especificidad del método se debe a que los oligonucleótidos sintéticos definen la región que será amplificada (Silva y cols., 1999).

2.2.1 Etapas de la PCR. La PCR se lleva a cabo en hasta 40 ciclos térmicos, donde en un ciclo térmico ocurren cada una de las tres etapas antes mencionadas, las cuales requieren una temperatura y duración específica. A continuación se describen brevemente los requerimientos de temperatura para cada etapa de un ciclo térmico.

Desnaturalización. la síntesis de ADN requiere que el ADN sea primero desnaturalizado, esto significa separar las dos cadenas de ADN en hebras sencillas. Ya que la unión de las dos cadenas de la molécula de ADN dúplex es mantenida por enlaces de hidrógeno, los cuales pueden ser fácilmente separadas aplicando calor, 94° C es una temperatura suficientemente alta para lograr este objetivo.

Anillamiento. La ADN polimerasa tiene como función sintetizar ADN a partir de ADN, y para ello requiere de una cadena preexistente de ADN desnaturalizado a la cual se une un pequeño segmento sintético complementario a la cadena molde para iniciar la síntesis. Este pequeño segmento que se usa para alargar o extender la cadena se le conoce como iniciador o "primer". Para unir o anillar este iniciador con la molécula molde se requiere de una temperatura adecuada para que la hibridación ocurra, generalmente 55-60° C. A una menor temperatura se tiene mayor eficiencia pero menor especificidad en la amplificación de ADN.

Extensión. El tercer paso del ciclo es la extensión del iniciador en dirección 5' a 3' usando una ADN polimerasa y desoxinucleósidos trifosfatados

(dNTP's). Esta extensión de los iniciadores resultará en la síntesis de una copia adicional de ADN entre éstos. La ADN polimerasa funciona en forma óptima a 72° C.

Las tres etapas anteriores constituyen un ciclo y dan por resultado que la molécula de ADN de doble cadena sea copiada para producir 2 cadenas de ADN. En el segundo ciclo, las dos cadenas de ADN se convierten en 4, y así sucesivamente. De acuerdo con esto, unos pocos miligramos de ADN pueden ser amplificados millones o billones de veces en 2-3 horas (Martínez y cols., 2000).

2.2.2 Componentes requeridos. Los componentes requeridos para la PCR son el ADN blanco, el cual es llamado molde o plantilla y algunas veces citado erróneamente como templado por su derivación del inglés "template";

iniciadores específicos para aparear al gen o segmento que se pretende amplificar; una enzima ADN polimerasa termoestable, llamada *Taq* ADN polimerasa; una mezcla de desoxinucleósidos trifosfatados (dNTP's) y el cloruro de magnesio (Silva y cols., 1999).

a) **Molde o blanco.** El primer paso para realizar la PCR es la obtención del ADN blanco o molde. Hay protocolos muy rápidos en donde no es necesario aislar ADN antes de hacer un PCR, sino que se puede trabajar con extractos crudos de plantas (Silva y cols., 1999).

b) Iniciadores o primers. La concentración óptima de los iniciadores se encuentra entre 0.1 y 0.5 μM , ya que altas concentraciones pueden provocar inespecificidad, resultando en un bajo rendimiento de los productos deseados (Innis y cols., 1990).

c) *Taq* ADN polimerasa. Se recomienda una concentración para la *Taq* ADN polimerasa de 1 a 2.5 unidades por 100 μL de reacción, cuando los demás componentes se encuentran en una concentración óptima. Sin embargo, los requerimientos de la enzima pueden variar, respecto al ADN molde o a los iniciadores. Cuando se está optimizando una PCR es importante realizar pruebas con un intervalo de concentración, el cual puede ir de 0.5 a 5 unidades por 100 μL , visualizando los resultados en un gel de agarosa. Si la concentración de enzima es muy alta, se pueden acumular productos no específicos y si la concentración es muy baja, la cantidad de

productos deseados será también baja. Las temperaturas de disociación de las cadenas, tanto del ADN molde como de los productos del PCR, pueden afectar la actividad y especificidad de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Innis y cols., 1990).

d) Desoxinucleósidos trifosfatados. Las alícuotas preparadas deben ser diluidas a una concentración de 10 mM y almacenadas a -20°C . Para tener un mayor rendimiento de los productos y una mayor especificidad, se recomienda usar una concentración de los dNTP's de 20 a 200 μM de cada uno (Innis y cols., 1990).

e) **Cloruro de magnesio.** La concentración de los iones magnesio puede afectar el anillamiento de los iniciadores. La mayoría de las reacciones de PCR se deben trabajar a una concentración de 1 a 4 mM de cloruro de magnesio para no afectar la actividad de la enzima (Innis y cols., 1990).

2.3 Diagnóstico de enfermedades causadas por fitoplasmas

La forma tradicional como han sido diagnosticadas las enfermedades causadas por fitoplasmas es a través de los síntomas; sin embargo, este método no es muy confiable, debido a que estos se pueden confundir con otras enfermedades que afectan al cultivo, o con deficiencias nutricionales u otras causas, por lo que el diagnóstico basado en la sintomatología requiere que se confirme la presencia de fitoplasmas en el floema de las plantas afectadas (Martínez y López, 1999).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La tinción con DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindole.2HCl), en conjunción con la microscopía electrónica han sido usados ampliamente para la detección de fitoplasmas en plantas infectadas (Seemüller, 1976). Ambos métodos permiten la detección de fitoplasmas, y aunque DAPI tiene mayor sensibilidad que la microscopía electrónica, su éxito depende en gran medida del número de fitoplasmas en el floema de los tejidos muestreados, por consecuencia, su sensibilidad es limitada cuando la concentración de fitoplasmas es muy baja, como frecuentemente ocurre en hospederos perenes (Kartte y Seemüller, 1991).

Se ha usado ampliamente la técnica de ELISA, con anticuerpos monoclonales y policlonales, para el diagnóstico de fitoplasmas en plantas enfermas; sin embargo, no se han creado antisueros para una gran cantidad de enfermedades ocasionadas por fitoplasmas, debido a la dificultad para obtener una alta calidad de antígeno y no existen anticuerpos genéricos para todos los fitoplasmas, es por eso que la técnica de ELISA tiene muchas limitaciones para ser aplicada en el diagnóstico de enfermedades ocasionadas por fitoplasmas (Lee, 1999).

La hibridación molecular ha sido también usada para la detección de fitoplasmas; esta técnica permite comparar la homología entre dos secuencias nucleotídicas. Una de ellas se fija en una membrana de nylon y la otra es marcada de tal manera que permite la detección de la primera una vez que ha reconocido a la secuencia homóloga. Al principio se utilizaba una sonda marcada con radioactividad, pero esto limitaba su aplicación a pocos laboratorios, por lo que actualmente se preparan y utilizan sondas moleculares no-radioactivas utilizando biotina, fotobiotina y digoxigenina para el marcaje (Silva y cols., 1999).

La técnica de PCR es más sensible, específica y versátil para detectar fitoplasmas, ya sea en plantas o en insectos hospedantes, además es más sensible que el microscopio electrónico, la serología y las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (Martínez y cols., 1994).

2.3.1 Detección por PCR. En el caso de la detección y el diagnóstico de enfermedades causadas por fitoplasmas, las técnicas moleculares son

particularmente importantes, pues estos microorganismos hasta el momento no han podido ser cultivados, lo que dificulta su detección por técnicas convencionales.

La tecnología con base en la PCR ha mejorado grandemente la detección e identificación de fitoplasmas ya que es una herramienta sensible para la detección temprana de una amplia variedad de patógenos. La técnica utiliza oligonucleótidos universales y específicos para detectar diversos grupos de fitoplasmas (SAGAR, 1999).

El uso de las técnicas moleculares para detectar, identificar y clasificar fitoplasmas, ha hecho posible asociar algunos fitoplasmas con enfermedades específicas, reconocer algunas enfermedades como complejos de varios desordenes similares causados por diferentes fitoplasmas y descubrir infecciones con varios fitoplasmas en una sola planta (Davis y Sinclair, 1998).

Gibb y cols. (1995) realizaron los primeros estudios en Australia para detectar fitoplasmas por PCR en *Ipomoea batatas* L., *Alysicarpus* sp., *Passiflora foetida*, *Evolvulus* sp. y *Amaranthus* sp. todas con síntomas característicos de fitoplasmas. Además utilizaron aislamientos de tomate y fitoplasmas del amarillamiento del aster como testigo. Utilizando dos juegos de iniciadores, 16R758/16R11232R (Lim y Sears, 1989) y R16F2/R16R2 (Lee y cols., 1993), consiguieron amplificar fragmentos de 513 pb y 1245 pb respectivamente, en todos los aislamientos. Dicha detección comprobó la

presencia de fitoplasmas en las especies bajo estudio, lo cual ya había sido detectado utilizando el microscopio electrónico y tinción con DAPI.

Lorenz y cols. (1995) realizaron trabajos para comparar la especificidad de varios primers ribosomales y no ribosomales en la detección de las enfermedades de "proliferación del manzano" y "declinamiento de la pera". Con el juego de primers fU5/rU3, diseñados sobre la región 16S ARN ribosomal, lograron amplificar ADN en muestras colectadas de árboles de manzano (*Malus pumila*) y pera (*Pyrus communis*) infectados con fitoplasmas. También se amplificó ADN en muestras provenientes de árboles de durazno (*Prunus persica*) enfermos y en aislamientos de teresita (*Catharanthus roseus* L.), la cual se utilizó como reservorio para el mantenimiento de fitoplasmas. La talla obtenida en todos los aislamientos fue de 850 pb y no hubo amplificación en muestras provenientes de plantas sanas.

Liu y cols. (1996) realizaron trabajos con PCR para detectar arrugamiento amarillo, mosaico y muerte descendente en papaya (*Carica papaya* L.), utilizando dos juegos de primers, P068/P069 y P3/P7, donde encontraron productos de 560 pb y 300 pb respectivamente, sin embargo con el segundo juego de primers, no lograron detectar productos en muestras provenientes de plantas con síntomas de muerte descendente. Este estudio demostró la asociación de fitoplasmas con estas enfermedades que afectan al cultivo.

Marzachi y cols. (2000) realizaron pruebas para detectar e identificar por PCR, fitoplasmas causantes de "stolbur" en plantas sintomáticas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), apio (*Apium graveolens* L.), correhuela (*Convolvulus arvensis* L.), vid (*Vitis vinifera* L.), olivo (*Olea europea* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) provenientes de diferentes regiones de Italia. La amplificación del ADN ribosomal de fitoplasmas se llevó a cabo directamente y por PCR-anidado. Para el PCR directo utilizaron los iniciadores universales R16F2/R16R2 (Lee y cols.,1993), los cuales amplificaron una talla de 1225 pb y en el caso que el ADN de plantas con síntomas no respondiera positivamente a la amplificación con dichos iniciadores, los productos se diluyeron 1:40 y se usaron como moldes en una segunda reacción de PCR, utilizando otro juego de iniciadores R16(I)F1/R16R1 (Lee y cols.,1994) que amplificaron una talla de 1100 pb. Se logró amplificar ADN en todos los aislamientos de las especies bajo estudio, excepto en olivo, sin embargo, cuando se utilizó PCR-anidado con los productos obtenidos de esta última especie, se obtuvieron resultados positivos en la amplificación.

Davis y Dally (2001) realizaron estudios para identificar y clasificar fitoplasmas asociados con filodia en fresa (*Fragaria sp*). Algunos de los síntomas asociados con filodia en esta especie incluían: clorosis, virescencia, falta de crecimiento y proliferación de la corona. Para llevar a cabo la detección de fitoplasmas, amplificaron secuencias en la región del gen 16S ribosomal, por medio de PCR. Los juegos de primers utilizados fueron P1/P7 (Smart y cols., 1996) y R16F2n/R16R2 para realizar PCR-

anidado. Los resultados indicaron la presencia de fitoplasmas en los aislamientos sometidos a la reacción, obteniendo productos de 1200 pb.

Wang y Hiruki (2001) emplearon PCR para detectar e identificar fitoplasmas asociados con canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa*) y mano de león (*Taraxacum officinale*). Para llevar a cabo la detección, emplearon los iniciadores universales P1/P6 (Deng y Hiruki, 1991), los cuales fueron diseñados con base en la secuencia del gen 16S ARN ribosomal de la clase Mollicutes y que amplificaron una talla de 1500 pb. Para incrementar la sensibilidad realizaron PCR-anidado, utilizando el juego de iniciadores R16F2n/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996), con los cuales lograron amplificar fragmentos de 1200 pb. Así, los resultados demostraron que tanto el PCR directo, como el PCR-anidado fueron efectivos en la detección de fitoplasmas en las especies mencionadas.

Lee y Dane (2001) llevaron a cabo estudios para determinar el agente causal de un brote de filodia en el cultivo de col (*Brassica oleracea var capitata*), en el suroeste de Texas. Los síntomas de la enfermedad incluían manchas púrpuras en los extremos de las hojas. Se presentó también proliferación de brotes en la base de los tallos y entre las capas de hojas, la proliferación de brotes se extendió en ocasiones por todo el tallo de la planta. Para detectar el agente, se colectaron plantas con síntomas y sin síntomas y se sometieron a un proceso de extracción de ADN. Para obtener suficiente cantidad de productos de PCR, llevaron a cabo PCR anidado usando dos juegos de primers, primero con P1/P7, seguido por

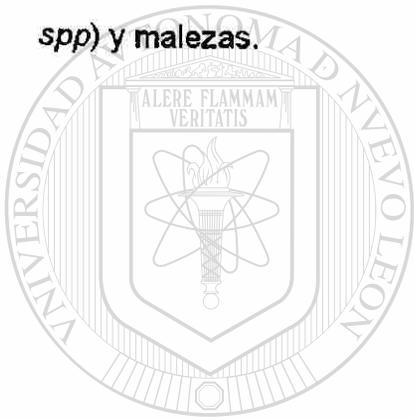
R16F2n/R16R2, con los que lograron amplificar un fragmento específico para el gen 16S ADN ribosomal, el cual fue de una talla de 1200 pb. La utilización de PCR anidado con los iniciadores mencionados, le permitió corroborar que la enfermedad era causada por fitoplasmas.

Los estudios sobre detección de fitoplasmas en papa (*Solanum tuberosum* L.) son escasos, incluso por medio de PCR, sin embargo, en México existe el interés por conocer más acerca de las enfermedades ocasionadas por fitoplasmas en este cultivo. Los siguientes dos trabajos están relacionados con lo descrito anteriormente.

Almeyda y cols. (1998) realizaron estudios para evaluar la especificidad de los iniciadores MMF/MMR, R16F2/R16R2, R16F2/MMR, P1/P7 y P1/Tint en ADN blanco proveniente de tejidos de cocotero (*Coccoloba nucifera* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), teresita (*Catharanthus roseus* L.), zempaxúchitl y yuca. Los iniciadores R16F2/R16R2 dieron una reacción positiva en todas estas especies. Estos resultados demostraron la universalidad de estos iniciadores que amplifican todos los fitoplasmas que se someten a prueba, por otra parte, los iniciadores MMF/MMR, solamente reaccionaron de manera positiva cuando se utilizó ADN molde que provenía de papa y yuca.

Leyva y Martínez (1999) detectaron y caracterizaron fitoplasmas presentes en papa (*Solanum tuberosum* L.), y posibles hospedantes alternos. La detección de estos patógenos se realizó mediante la técnica de

PCR con oligonucleótidos diseñados sobre la región ribosomal 16S (P1) y el tARN^{ile} localizado en la región intergénica (Tint), entre el gen 16S rRNA y el 23S ARNr. También utilizaron oligonucleótidos diseñados sobre la región ribosomal 23S. Para la caracterización molecular usaron la técnica PCR-RFLP, utilizando las enzimas *Alu I*, *Kpn I* y *Hinf I* para digerir el fragmento de 1600 pb obtenido con los oligonucleótidos P1/Tint. Mediante esta técnica detectaron presencia de fitoplasmas en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd), nopal (*Opuntia spp*) y malezas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Genética y Diagnóstico Fitosanitario ubicados en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los muestreos de material vegetal se realizaron en siembras comerciales y bodegas de semilla de papa en la región de San Rafael, perteneciente al municipio de Galeana, Nuevo León.

El trabajo comprendió: i) El muestreo de material vegetal en lotes comerciales de campo y bodegas de semilla de papa ii) La comparación de métodos de extracción de ADN total para la detección de fitoplasmas a partir de diferentes tejidos de papa iii) El establecimiento de las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y iv) La estimación de la incidencia de la enfermedad "punta morada" de la papa, en la región bajo estudio (Fig. 1).

3.1 Fuente de fitoplasmas

Como testigos positivos, se utilizaron plantas de papa con síntomas característicos de "punta morada", como lo fueron hojas apicales de color púrpura combinado con amarillamientos, plantas con falta de crecimiento y presencia de tubérculos aéreos. Se utilizaron también tubérculos con brote de hilo y ausencia de brotación y además hojas de teresita (*Catharanthus roseus* L.) con amarillamientos y roseteado de las hojas apicales.

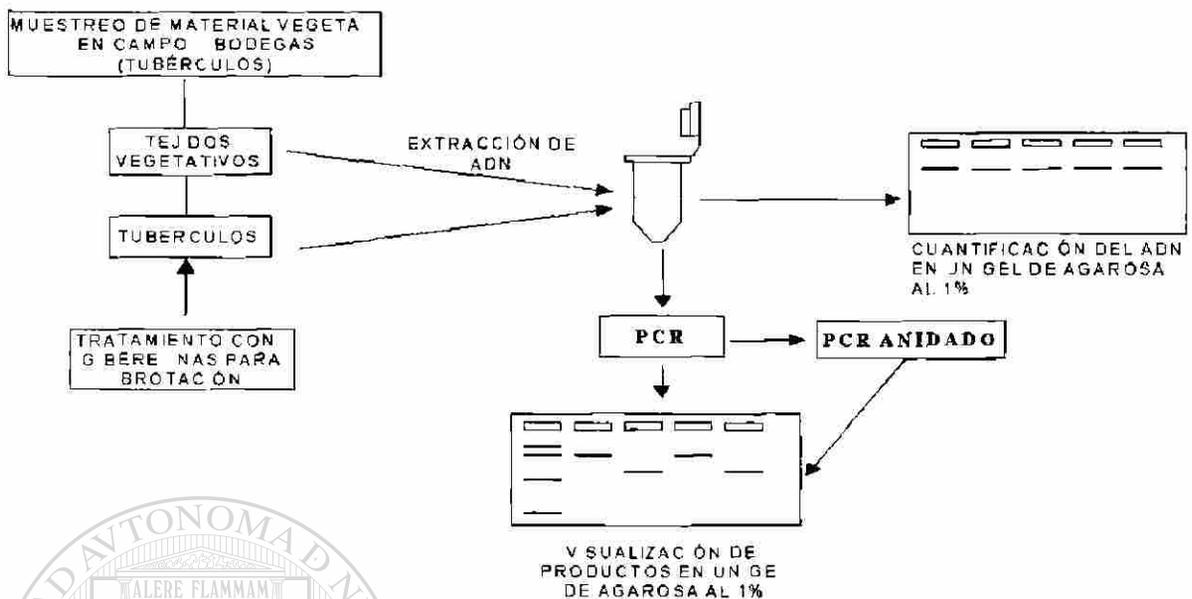


Fig. 1. Esquema general del procedimiento llevado a cabo en la implementación de las técnicas de extracción de ADN y PCR para la detección de fitoplasmas en papa, y determinación de su ocurrencia en San Rafael, Galeana, N.L.

3.2 Aislamiento y cuantificación del ADN total

Las muestras vegetales fueron sometidas a una extracción de ADN con diferentes métodos descritos a continuación. Para cuantificar el ADN obtenido se preparó un gel de agarosa (Sigma®) al 1%, de la siguiente manera: se pesaron 0.3 g de agarosa y se colocaron en un recipiente al cual se le agregaron 30 mL de solución TBE 0.5X (0.045 M Tris-HCL, 0.045 M H₃BO₃ y 0.001 M EDTA) el cual fue preparado a partir de una solución concentrada de TBE 5X y se calentó para facilitar su disolución. Cuando la agarosa estaba completamente disuelta, se enfrió la solución en agua a temperatura ambiente, hasta alcanzar 55° C aproximadamente, en seguida se agregaron 3 µL de

bromuro de etidio de una solución con 10 mg/mL, se agitó y la solución se depositó en el molde para su solidificación. Una vez que el gel se formó, éste se cubrió con solución TBE al 0.5X.

Para cargar las muestras de ADN en el gel, primeramente se colocaron 2 μ L de colorante Halt (50 % de azul de bromofenol al 0.3 % + 50% de xilencianol al 0.3%) en un trozo de papel parafilm, y en seguida se colocaron 4 μ L de las muestras de ADN. El ADN se mezcló con el colorante y luego se colocó en el orificio de su respectivo carril.

Las muestras se separaron en una cámara de electroforesis modelo Horizon 58 (Gibco, BRL) utilizando un fuente de poder modelo 250 (Gibco, BRL). El ADN migró a 62 volts por 5 minutos y después se aumentó a 100 volts por 35 minutos adicionales y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-10). El rendimiento de ADN en nanogramos (ng) se cuantificó, comparando la intensidad de las bandas observadas en el gel contra un marcador de cantidad conocida (DNA Mass Ladder, Gibco BRL). La cuantificación de ADN se realizó en todas las muestras utilizadas durante la investigación. El ADN de las muestras se almacenó a una temperatura de -20° C, hasta la realización del PCR.

3.2.1 Comparación de métodos de extracción. Se compararon tres de los métodos de extracción de ADN más comunes, con algunas modificaciones:

Doyle y Doyle (1990), Dellaporta y cols. (1983) y un kit comercial, los cuales se describen a continuación.

Doyle y Doyle (1990). El método consistió en tomar 0.2 g de tejido vegetal, el cual se lavó con agua corriente y se dejó secar en papel. Las muestras se colocaron en morteros estériles y se maceraron. Toda la muestra se colocó en tubos de centrifuga de 2 mL, y estos últimos se colocaron en hielo.

A cada tubo se le agregaron 600 μ L de solución de extracción CTAB 2% (CTAB, Tris-HCL 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCL 1.4 M, PVP 40.000 1% y β -mercaptoetanol 0.2 %) precalentado a 65° C y se resuspendió el tejido en la solución para lograr una mejor homogenización. Posterior a este paso, las muestras se incubaron en un baño de agua a 65° C, por un período de 30 minutos.

Cuando se completó el tiempo, las muestras se volvieron a colocar en hielo y se les agregó a cada una un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico en una relación de 24:1, que en este caso fueron 600 μ L. Así, las muestras se centrifugaron a 5,000 g durante 5 min a temperatura ambiente. En seguida se separó la fase acuosa, midiendo su volúmen y se transfirió a tubos de 2 mL.

Posteriormente a los tubos se les agregó un volumen igual de solución CTAB al 1% (CTAB, Tris-HCL 50 mM pH 8.0 y EDTA 0.1 mM pH 8.0) y se

centrifugaron a 800 g, durante 5 min a temperatura ambiente. Los tubos se vaciaron suavemente y el precipitado se resuspendió en 100 μ L de solución TEN (Tris-HCL 50 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM pH 8.0 y NaCL 1M) agitando constantemente para lograr la disolución del precipitado.

La solución se cambió a tubos de 1.5 mL y el ADN se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol, es decir 60 μ L. Los tubos se balancearon y se centrifugaron a 3,000 g por 6 min a temperatura ambiente y después se decantó suavemente.

El precipitado obtenido fue lavado con etanol al 80 %, agregando 40 μ L a cada tubo, después los tubos se centrifugaron a 3,000 g por 3 min a temperatura ambiente; posteriormente se decantó y los tubos se colocaron en posición invertida sobre papel secante, en la campana de flujo laminar. Cuando los tubos estaban completamente secos en su interior, se les agregó de 25 a 30 μ L de agua mili-Q para resuspender la pastilla obtenida y se almacenaron a una temperatura de -20° C, hasta su utilización.

Método de Dellaporta y cols. (1983). Este método se realizó moliendo 0.1 g de tejido vegetal en un mortero estéril sin el uso de nitrógeno líquido, posteriormente el tejido se colocó en tubos de microcentrifuga, a los cuales se les adicionó 0.7 mL de solución de lisis (Tris HCL 1M, EDTA 0.5M y NaCL 5M) y 50 μ L de SDS al 20 % y se agitó vigorosamente. Enseguida las muestras se

colocaron en un baño de agua a 65° C por 15 min, terminado este tiempo, se les adicionó a los tubos 0.25 mL de acetato de potasio 5M y se colocaron en hielo por un período de 20 min para después centrifugar a 16,000 g por 15 min. Después de este paso, se adicionó 0.5 mL de isopropanol frío, sin agitar y se dejaron las muestras precipitando a -20° C por una hora durante toda la noche.

Cuando se completó el tiempo de precipitación, las muestras se centrifugaron a 16,000 g por 15 min y luego se decantó, para dejar secando la pastilla, se adicionaron 65 µL de TE (pH 8.0) por tubo y se dejó que la pastilla se disolviera, sin agitar ni resuspender manualmente. En seguida se realizó una centrifugación a 14,000 g por 5 min y el sobrenadante se paso a tubos limpios, se adicionaron 70 µL de fenol, agitando después por inversión y se centrifugó por 5 min a 14,000 g. El sobrenadante se pasó a tubos limpios y se colocó en hielo; a partir de aquí las muestras se mantuvieron en hielo todo el tiempo.

Se adicionaron 65 µL de cloroformo por muestra para eliminar el fenol y se centrifugó a 14,000 g, para después pasar el sobrenadante a tubos limpios, posteriormente se adicionaron 75 µL de acetato de sodio 3M y 1 un volumen de isopropanol y las muestras se guardaron por 30 min a -20° C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 14,000 g por 10 min y se lavó la pastilla con alcohol etílico al 70 % para después centrifugar a 14,000 g por un período de 5 min, se decantó, se dejó secar la pastilla y se resuspendió el ADN en 20 o 25 µL de agua mili-Q.

Uso de kit comercial. Este método utiliza DNAzol ES (Gibco BRL) y se efectuó siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. Se colocaron 0.2 g de tejido en tubo de microcentrifuga para después agregar 0.5 mL de solución DNAzol ES, mezclando posteriormente por inversión para resuspender la muestra. Posteriormente, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente por 5 min, completado este tiempo, se agregó 0.5 mL de cloroformo por cada 0.5 mL de DNAzol ES utilizado, después, se agitó la mezcla vigorosamente por 20 segundos, enseguida las muestras se almacenaron por 5 min y se centrifugó a 12,000 g por 10 min.

Cuando se completó el tiempo de centrifuga, la fase acuosa se transfirió a tubos limpios y se agregó a cada muestra 0.75 volúmenes de alcohol etílico, las muestras se mezclaron por inversión 8 a 10 veces y se almacenaron a temperatura ambiente por 5 min. Después de este tiempo, el ADN precipitado se sedimentó, centrifugando a 5,000 g por 4 min y se vació el sobrenadante. ®

La pastilla resultante fue resuspendida en 50 μ L de EDTA (10 mM, pH 7-8) y se adicionaron 5 volúmenes de solución de lavado DNAzol ES-alcohol etílico (1:0.75) por cada volumen de EDTA adicionado a las muestras, posteriormente estas se almacenaron a temperatura ambiente por 5 min y fueron centrifugadas a 5,000 g por 4 min, se decantó la solución de lavado y se adicionaron 200 μ L de alcohol etílico al 95 %. La pastilla se mezcló con el

alcohol etílico por 5 min y el ADN se precipitó, centrifugando a 5,000 g por 4 min.

Terminado el tiempo de centrifugación, el alcohol etílico fue removido por decantación y los tubos se almacenaron por 1-2 min en posición invertida. Posteriormente, la pastilla se solubilizó en 25 μ L de buffer TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7.5-8.0).

3.2.2 Comparación de tejidos vegetales. Se llevó a cabo una extracción de ADN a partir de diferentes tejidos de plantas de papa con síntomas de "punta morada", utilizando los tres protocolos de extracción descritos anteriormente. Los tejidos incluidos fueron hojas apicales, hojas intermedias, hojas inferiores, tallo principal, talluelo de los pecíolos, estolón, unión de estolón (tubérculo), tubérculo parte media y raíz. Los rendimientos de ADN se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %, cuantificandolos con un marcador de cantidad (DNA Mass[®] Ladder, Gibco) .

3.3 Amplificación parcial del genoma del fitoplasma

3.3.1 Selección, análisis y síntesis de iniciadores. Se seleccionaron siete iniciadores, los cuales combinados selectivamente por pares amplifican los genes 16S y 23S ARNr de diferentes fitoplasmas y pueden considerarse como universales (Cuadro 1). Se realizó una simulación de PCR con los iniciadores

seleccionados y varias secuencias de fitoplasmas reportadas, utilizando el programa computacional Amplify versión 1.2 (Fig. 11). Todos los iniciadores fueron sintetizados en la compañía BioSynthesis, Inc (Lewisville, Tx, USA).

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores utilizados en la amplificación de ADN de fitoplasmas en papa.

INICIADOR	SECUENCIA	REFERENCIA
P1	5'-aag agt ttg atc ctg gct cag gat t-3'	Smart y cols. (1996)
P7	5'-cgt cct tca tcg gct ctt-3'	Smart y cols. (1996)
Tint	5'-tca ggc gtg tgc tct aac cag c-3'	Smart y cols. (1996)
R16F2	5'-acg act gct gct aag act gg-3'	Lee y cols. (1993)
R16R2	5'-tga cgg gcg gtg tgt aca aac ccc g-3'	Lee y cols. (1993)
fU5	5'-cgg caa tgg agg aaa c-3'	Lorenz y cols. (1995)
rU3	5'-ttc agc tac tct ttg taa ca-3'	Lorenz y cols. (1995)

3.3.2 Establecimiento de las condiciones de reacción. Para la amplificación de fragmentos conservados de ADN presentes en fitoplasmas, se utilizaron 50 ng de ADN total proveniente de diferentes tejidos de papa positivos a "punta morada" (hoja, tubérculo y brotes de tubérculo) y se formaron las siguientes combinaciones de iniciadores para su evaluación: P1/P7, P1/Tint, R16F2/R16R2 y fU5/rU3. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL, las cuales se efectuaron en una mezcla que contenía buffer

de PCR 1X, 200 μ M de cada uno de los dNTP's, 20 pmoles de cada primer y 2 unidades de *Taq*-DNA polimerasa (Promega).

Para determinar la concentración óptima de $MgCl_2$, se realizaron pruebas de PCR con tres concentraciones: 1.2 mM, 2.4 mM y 3.6 mM. Cada una de estas concentraciones se probaron con los cuatro juegos de iniciadores, siendo estos P1/P7, P1/Tint, R16F2/R16R2 y fU5/rU3. La mejor combinación de $MgCl_2$ e iniciadores, se determinó al observar los productos de amplificación en número, talla e intensidad de la banda obtenida. Los programas térmicos utilizados fueron los siguientes 94° C de desnaturalización, 45, 50, 55 y 56° C de anillamiento y 72° C de polimerización, con tiempos de 1'-1'-120", 1'-1'-90", 1'-1'-80" 1'-1'-60", 30"-50"-80" y 30"-40"-70", durante 34 y 40 ciclos. Antes de cada programa se dio un inicio de 94° C por 2 min y al final una extensión de 72° C por 4 min.

Con los productos obtenidos en la PCR al utilizar los iniciadores P1/Tint se procedió a realizar un PCR anidado, utilizando los iniciadores fU5/rU3 y R16F2/R16R2. Se utilizaron las mismas concentraciones de los componentes del PCR directo y un volumen de 3 μ L del producto de PCR como ADN molde. Se corrió un programa térmico que consistió en 94° C de desnaturalización, 56° C de anillamiento y 72° C de polimerización, con tiempos de 30"-50"-80". Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MJ research PTC-100.

3.3.3 Detección en plantas con PCR directo. Para llevar a cabo una determinación de la especificidad de apareamiento de los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995), se realizaron pruebas de PCR con estos iniciadores utilizando ADN genómico de diversas especies vegetales que presentaban síntomas de infección por fitoplasmas. Tales especies incluyeron plantas de teresita (*Catharanthus roseus* L.), cocotero (*Cocos nucifera* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.).

3.3.4 PCR anidado. Debido a que en muchas de las muestras positivas se obtenía una señal débil, se optó por probar el PCR anidado, también se pretendía aumentar la sensibilidad en la amplificación y evitar falsos negativos. Este procedimiento consistió en hacer un PCR con un primer juego de iniciadores y después utilizar los productos de PCR para reamplificarlos con otro juego de iniciadores. La base del PCR anidado consistió en utilizar los iniciadores P1/Tint (Smart y cols., 1993) en PCR directo, tales iniciadores amplifican la región comprendida entre el gen 16S ribosomal y el espacio intergénico. En una segunda reacción se utilizaron otros dos juegos de iniciadores, que en nuestro caso fueron R16F2/R16R2 (Lee y cols., 1993) ó fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995); ambos juegos de iniciadores amplifican una región interna al fragmento amplificado con P1 y Tint.

Para llevar a cabo la amplificación, se utilizaron muestras de ADN de papa (hojas y brotes) teresita (hojas) y cocotero, todas ellas infectadas con fitoplasmas.

3.3.5 Detección en tubérculos sintomáticos y asintomáticos. Se sometió a PCR, ADN proveniente de tubérculos sintomáticos y asintomáticos para fitoplasmas. Los tubérculos sintomáticos presentaban “ausencia de brotación” y brotes de hilo”, tomando como tejido tubérculo de la sección que se une con el estolón. En el caso de los tubérculos asintomáticos, estos presentaban un brote normal y vigoroso, del cual se tomó el tejido.

Se utilizaron los iniciadores fU5/rU3 en PCR directo para amplificar ADN de fitoplasmas en tubérculos sintomáticos y en el caso de los tubérculos asintomáticos, se realizó un PCR anidado, usando los iniciadores P1/Tint y fU5/rU3, como internos.

3.3.6 Detección en semilla. Se obtuvo ADN de la semilla de papa muestreada el 15 de febrero del 2001 (Cuadro 3) el cual se sometió a un PCR utilizando los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995).

3.4 Ocurrencia de “punta morada” en San Rafael, Galeana, N.L.

3.4.1 Muestreo de material vegetal. En año del 2000 se realizó un muestreo de lotes comerciales de papa (Cuadro 2) para determinar la incidencia de “punta morada” en la región de San Rafael. En principio se hizo un recorrido para ubicar los lotes de papa y los propietarios o encargados para solicitar el acceso al lote; se investigó el número de hectáreas de cada lote, la fecha de siembra y la variedad. El muestreo se programó dos meses después de la fecha

de siembra. Se obtuvo una muestra compuesta por cada lote de papa, la cual se formó obteniendo una submuestra de hojas apicales de una planta por cada hectárea del lote, de acuerdo a la recomendación de tamaño de muestra (Dr. E. Olivares, com. pers.). Las muestras fueron identificadas y puestas en bolsas de papel, colocandolas en una hielera para que se conservaran frescas.

Adicionalmente, se seleccionaron dos lotes comerciales de papa para realizar un muestreo de tubérculos, el cual se llevo a cabo el día 3 de Noviembre del 2000. Los lotes fueron: La Concha y EL Erial, ambos ubicados en San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León. Se definió un punto por hectárea y en cada punto se obtuvieron los tubérculos que pertenecían a una planta, en este caso el lote se encontraba sin follaje, ya que había sido desvarado. El lote La Concha contaba con una superficie de 20 hectáreas de la variedad Alpha y EL Erial con 17, también de la variedad Alpha. Las muestras se colocaron en arpillas y se identificaron con la fecha de muestreo, nombre del lote, variedad y número de muestra.

Cuadro 2. Lotes comerciales de papa muestreados en el año 2000 en la región de San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León.

No. de lote	Localidad	Variedad	Fecha de muestreo	Superficie (ha)
1	San Antonio	Alpha	05 junio 2000	3
2	San Antonio	Mondial	05 junio 2000	1
3	San Antonio	Escort	05 junio 2000	1
4	San Antonio	Idole	05 junio 2000	7
5	San Antonio	Gigant	05 junio 2000	27
6	San Antonio	Gigant	05 junio 2000	23
7	San Joaquín	Gigant	16 junio 2000	30
8	San Joaquín	Gigant	16 junio 2000	30
9	San Rafael	Gigant	16 junio 2000	15
10	San Rafael	Gigant	16 junio 2000	15
11	El Chaparral	Gigant	01 julio 2000	30
12	El Chaparral	Gigant	01 julio 2000	10
13	La Concha	Gigant	01 julio 2000	30
14	La Concha	Alpha	21 julio 2000	18
15	La Concha	Gigant	22 julio 2000	15
16	La Concha	Alpha	22 julio 2000	35
17	El Erial	Alpha	11 agosto 2000	25
18	El Erial	Alpha	11 agosto 2000	17
19	El Erial	Mondial	11 agosto 2000	8
20	La Concha	Alpha	12 agosto 2000	20
21	La Concha	Alpha	12 agosto 2000	20
22	Santa Lilia	Gigant	11 agosto 2000	5
23	Bugambillas	Alpha	28 agosto 2000	20
24	Bugambillas	Gigant	28 agosto 2000	10
25	La Concha	Alpha	03 nov 2000	20
26	El Erial	Alpha	03 nov 2000	17
Total				452

El 15 de febrero del 2001 se realizó un muestreo de semilla de papa en bodegas ubicadas en el ejido de San Rafael, esta semilla estaba destinada para la siembra de lotes comerciales y provenía de diferentes lugares (Cuadro 3). En la bodega No. 1 se determinó previamente la cantidad de toneladas de semilla y se obtuvo una muestra de tres tubérculos por tonelada, tratando de hacer el

muestreo lo más homogéneo posible. En el caso de la bodega No. 2 no se siguió este mismo criterio, debido a que de cada lote de semilla (con diferente procedencia y variedad) se tenían volúmenes grandes y en este caso se definió un número arbitrario de muestras por lote. Las muestras se colocaron en bolsas de papel y se identificaron con fecha de muestreo, número de muestra, origen de la semilla, número de bodega y variedad.

Cuadro 3. Bodegas con “semilla” de papa muestreadas en San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León.

No. de bodega	Origen de la semilla	Variedad	No. de muestras
1	Tapalpa, Jalisco	Alpha	60
	Galeana	Gigant	4
	Galeana	Alpha	7
2	Sayula, Jalisco	Gigant	10
	Jamé, Coahuila	Gigant	10
	Tapalpa, Jalisco	Alpha	10
	Chihuahua	Gigant	10
Total			111

3.4.2 Inducción a brotación de los tubérculos. Los tubérculos colectados en el campo y la semilla muestreada en bodegas se sometieron a un tratamiento con Biogib® (ácido giberélico) utilizando una dosis de 0.5 g en 10 litros de agua. En principio, el material se lavó con agua corriente para remover la tierra y después se colocó en la solución por un periodo de 10 minutos; completandose

este tiempo, los tubérculos se sacaron de la solución y se colocaron en papel secante para eliminar el exceso de agua. Cuando los tubérculos se encontraron completamente secos, se taparon con el mismo tipo de papel y se dejaron reposar por un período de tres a cuatro semanas o hasta obtener brote, el cual se utilizó para llevar a cabo las extracciones de ADN.

3.4.3 Determinación de la incidencia de “punta morada”. Las muestras compuestas de cada lote comercial de papa fueron sometidas a extracción de ADN por el método de Doyle y Doyle (1990) de la forma ya descrita y se determinó la incidencia de la enfermedad por la proporción de lotes que resultaron positivos en la amplificación de ADN de fitoplasmas por medio de PCR. Adicionalmente se calculó un intervalo de confianza para la proporción, con una confiabilidad del 95%, utilizando la siguiente fórmula:

$$p - z \sqrt{\frac{p(1-p)}{n} \frac{N-n}{N-1}} \leq p \leq p + z \sqrt{\frac{p(1-p)}{n} \frac{N-n}{N-1}} \text{®}$$

Donde:

p = Proporción de la población.

z = Valor estandar de desviación normal de 1.96.

n = Tamaño de la muestra.

N = Tamaño de la población.

Los tubérculos muestreados en los lotes comerciales de campo fueron puestos a brotar y después se les realizó una extracción de ADN, utilizando también el método de Doyle y Doyle (1990). Una muestra correspondió a un tubérculo individual, del cual se tomaron 0.2 g de brote y se colocaron en un mortero estéril, moliendo sin nitrógeno líquido.

Los tubérculos-semilla de papa muestreados en bodegas, fueron puestos a brotar en ácido gibbélico y sometidos a extracción de ADN por el método de Doyle y Doyle (1990). Se formaron muestras compuestas de nueve tubérculos para la bodega No 1 y de tres para la bodega No 2. De las muestras compuestas de tres tubérculos se tomó como tejido el brote, mientras que en las muestras compuestas de nueve tubérculos se tomó la unión del estolón. El tejido se colocó en morteros estériles y se maceró sin nitrógeno líquido, la muestra se homogenizó y se tomaron solamente 0.2 g de material, el cual se colocó en tubos de microcentrifuga de 2 mL y se procedió a la extracción. El rendimiento de ADN se cuantificó comparando con un marcador de cantidad (DNA Mass Ladder) en un gel de agarosa al 1 %. Posteriormente se realizó la PCR en todas las muestras, para la estimación de proporción de positivos, comparado con el total.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y cuantificación de ADN total

La cantidad de ADN obtenida en las muestras compuestas de los lotes comerciales de papa muestreados en campo en el año 2000 fue de 0.6 a 2.5 μg por gramo de tejido utilizado ($\mu\text{g g}^{-1}$). En el caso de los brotes de tubérculos de papa próximos a cosecha y brotes de semilla almacenada para siembra, las cantidades obtenidas de ADN se encontraron en un intervalo entre 2.5 a 6.3 μg por gramo de tejido ($\mu\text{g g}^{-1}$), dichas cantidades fueron superiores a las obtenidas de follaje y ápices debido a que en este caso el tejido estaba fresco, en pleno crecimiento y de buen vigor, en cambio las muestras de follaje y ápices fueron almacenadas inmediatamente después de la colecta, por un período de tres meses a una temperatura de -10°C y el tiempo de almacenamiento provocó un deterioro del tejido y por lo tanto del ADN, lo cual fue reafirmado al procesar muestras frescas y muestras almacenadas a 6°C por periodos cortos de tiempo (datos no mostrados), a este respecto Doyle y Doyle (1990) reconocen la importancia de utilizar material fresco para obtener un mayores rendimientos de ADN.

4.1.1 Comparación de métodos de extracción y tejidos vegetales. Las cantidades de ADN genómico obtenidas de diferentes tejidos de plantas de papa, utilizando tres métodos de extracción de ADN en plantas con síntomas de "punta morada", se presentan en el Cuadro 4.

Al observar los rendimientos promedio por tipo de tejido (Cuadro 4), se puede comprobar que los tejidos que presentan mayores valores son: unión de estolón (tubérculo), tubérculo parte media y hojas apicales. Estos valores promedio nos dan una idea del tejido más consistente en cuanto a rendimiento de ADN se refiere y en este caso lo presentó unión de estolón (tubérculo), sin embargo, esto no nos asegura que en estos tejidos estén más concentrados los fitoplasmas.

Cuadro 4. Rendimiento de ADN ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido) obtenido de diferentes tejidos de plantas de papa con síntomas de "punta morada".

Método/Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Prom
Doyle y Doyle (1990)	0.6	0.6	0.3	0.3	1.6	1.6	3.8	3.8	0.2	1.4
Dellaporta (1983)	3.1	0.3	0.3	0	1.3	0.16	2.5	1.3	0.9	1.1
DNA zol ES	2.8	3.1	0.6	0.3	0.3	2.5	2.5	2.5	0.3	1.7
Promedio	2.2	1.3	0.4	0.2	1.0	1.4	2.9	2.5	0.5	

- ¹ Hojas apicales
- ² Hojas intermedias
- ³ Hojas inferiores
- ⁴ Tallo principal
- ⁵ Talluelos de los peciolo
- ⁶ Estolón
- ⁷ Unión de estolón (tubérculo)
- ⁸ Tubérculo parte media
- ⁹ Raíz

Haciendo una comparación de los métodos de extracción, podemos observar en la columna que presenta los promedios, que el método del DNA zol ES (kit comercial) presentó el mayor valor, seguido del método de Doyle y Doyle (1990) y al final el método de Dellaporta (1993). Hay que destacar que el

método de Doyle y Doyle (1990) dio los más altos rendimientos en tejidos como unión de estolón (tubérculo) y tubérculo parte media, sin embargo, el método fue superado en promedio por el método de DNA zol ES. En la Figura 2 se presenta la imagen visual de los resultados de las extracciones de ADN de diferentes tejidos, utilizando los tres métodos descritos anteriormente.

4.2.1 Estolón 1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9 Raíz

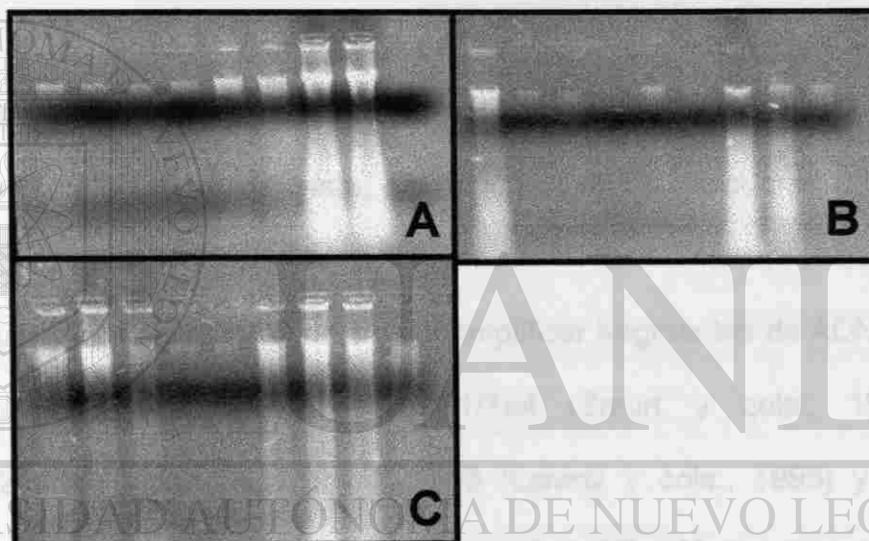


Fig. 2. ADN obtenido por tres métodos de extracción, a partir de diferentes tejidos, visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carril 1) hojas apicales, 2) hojas intermedias, 3) hojas inferiores, 4) tallo principal, 5) talluelo de los pecíolos, 6) estolón, 7) unión de estolón (tubérculo), 8) tubérculo parte media y 9) raíz, utilizando el método de: A) Doyle y Doyle (1990), B) Dellaporta (1993) y C) DNA zol ES®.

Al hacer una comparación de los tres paneles de la Figura 2 (A, B, y C), se puede apreciar una mayor consistencia en la calidad del ADN, al utilizar el método de Doyle y Doyle (1990), lo anterior basados en la contaminación por ARN y al ADN degradado que se observa en varios de los carriles de los paneles B y C, correspondientes a los métodos de extracción de Dellaporta y

DNAzol ES[®]. Lo anterior, aunado con los resultados de PCR, nos llevo a seleccionar el método de Doyle y Doyle (1990) para las extracciones masivas de muestras.

4.2 Reacción en cadena de la polimerasa

4.2.1 Establecimiento de las condiciones de reacción. Los primeros experimentos realizados con el objetivo de amplificar ADN de fitoplasmas en papa, fueron para establecer las concentraciones de los componentes de PCR para lograr una amplificación adecuada, y la combinación de iniciadores.

Se obtuvieron resultados favorables al amplificar fragmentos de ADN con cuatro juegos de iniciadores: P1/P7, P1/Tint (Smart y cols., 1993), R16F2/R16R2 (Lee y cols., 1993) y fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995) y tres concentraciones de cloruro de magnesio: 2.4 mM y 3.6 mM, ya que con la concentración de 1.2 mM de MgCl₂ no se obtuvo amplificación con ningún par de iniciadores (Fig. 3).

Se puede observar en la Fig. 3 que las bandas con los cuatro juegos de iniciadores, son más visibles a la concentración de 2.4 mM de MgCl₂ (Carriles 5-8), sin embargo, a la concentración de 3.6 mM todavía existe buena amplificación, aunque las bandas son más tenues, excepto con los iniciadores fU5/rU3 en que se obtuvieron bandas con igual intensidad a las concentraciones de 2.4 mM y 3.6 mM de MgCl₂ (Carriles 8 y 12).

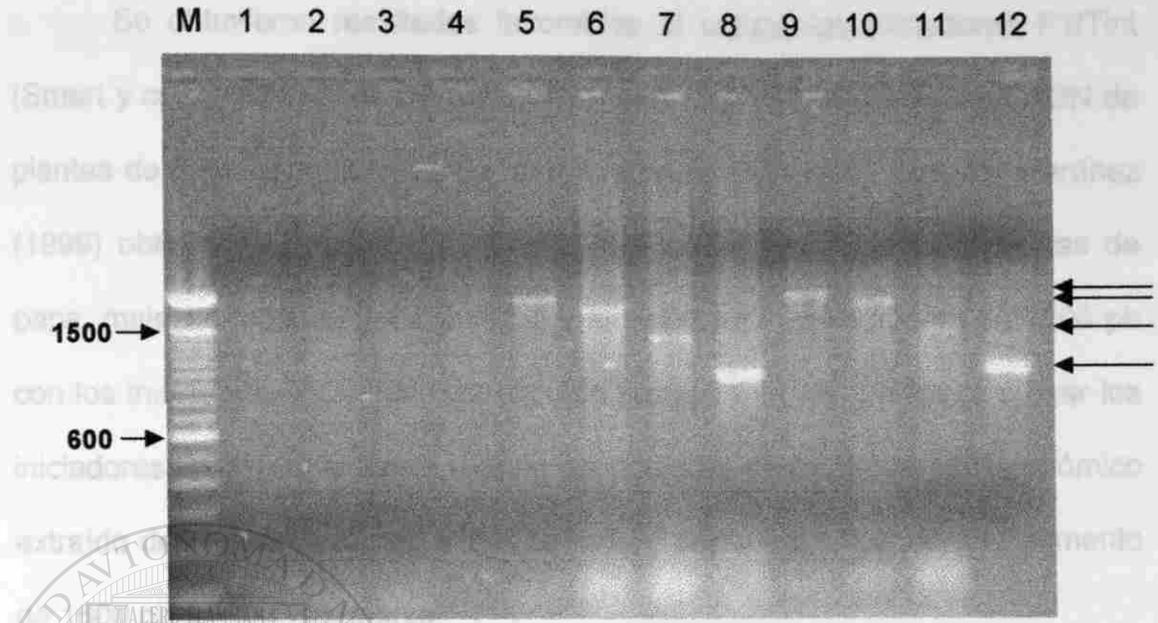


Fig. 3. Fragmentos amplificados por PCR utilizando cuatro pares de iniciadores y tres concentraciones de MgCl₂, visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carril M= Marcador de talla molecular Ladder 100, carriles 1-4= 1.2 mM de MgCl₂ con P1/P7, P1/Tint, R16F2/R16R2 y fU5/rU3 respectivamente, carriles 5-8= 2.4 mM de MgCl₂ con los iniciadores respectivos, carriles 9-12= 3.6 mM de MgCl₂ con los iniciadores respectivos. Las flechas señalan a los fragmentos amplificados con tallas de 1.8, 1.6, 1.2 y 0.9 kb aprox.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En general la mejor concentración de MgCl₂ fue la de 2.4 mM con todos los iniciadores, al obtenerse bandas más intensas, por lo que se seleccionó esta concentración para todas las pruebas subsecuentes. Se tuvo también éxito en la amplificación al utilizar la concentración de 3.6 mM de MgCl₂, la cual se encontraba fuera del intervalo recomendado de 0.5 a 2.5 mM por Innis y cols. (1990), sin embargo dicha concentración se encuentra dentro de los valores recomendados por Sambrook y cols. (1989) que es de 0.05 a 5 mM.

Se obtuvieron resultados favorables al utilizar los iniciadores P1/Tint (Smart y cols., 1993) al amplificar un fragmento de 1600 pb, utilizando ADN de plantas de papa con síntomas de "punta morada" (Figura 4). Leyva y Martínez (1999) obtuvieron resultados similares, al detectar fitoplasmas en plantas de papa, malezas, noche buena y nopal, y amplificando un fragmento de 1600 pb con los iniciadores P1 y Tint, así también Almeyda y cols. (1998) al utilizar los iniciadores P1 y Tint, lograron reacciones positivas de PCR con ADN genómico extraído de cocotero, zempaxúchitl, teresita y papa, amplificando un fragmento de 1600 pb aproximadamente.

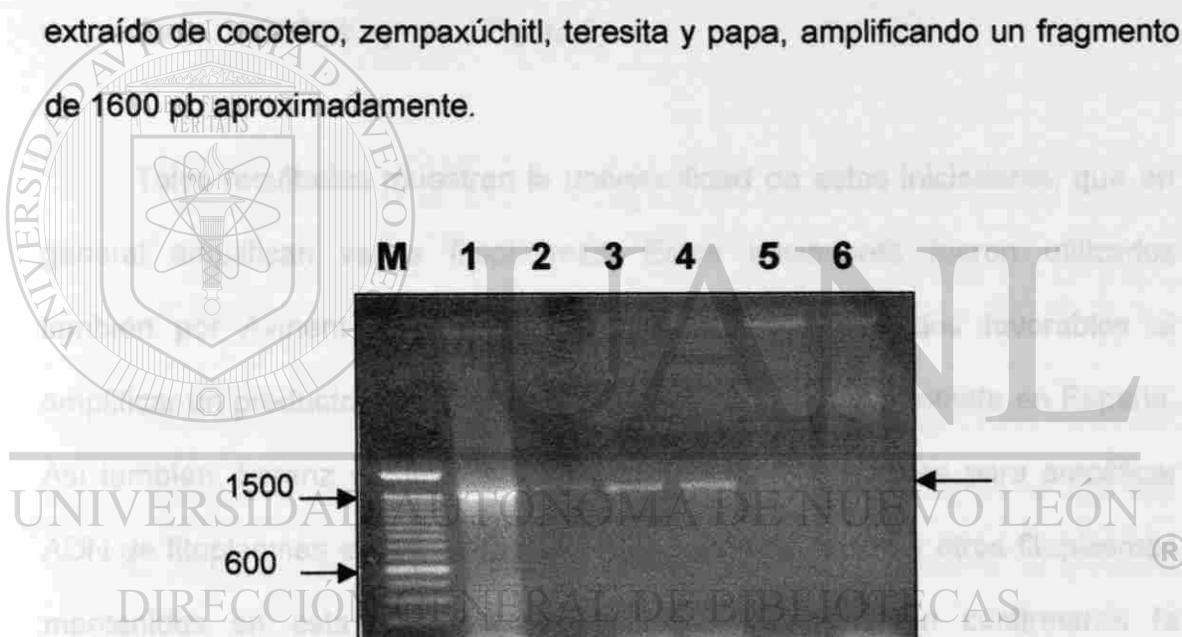


Fig. 4. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores P1/Tint y ADN de plantas de papa, visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carril M= Marcador de talla molecular Ladder 100, carril 1= testigo positivo, carriles 2-4= muestras de papa, carriles 5 y 6= muestras de papa negativas. La flecha indica la talla del fragmento amplificado de 1600 pb.

En general las condiciones óptimas de reacción fueron con 1X de buffer de PCR, 2.4 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada dNTP's, 20 pmoles de cada iniciador, 2 unidades de *Taq* DNA polimerasa y 50 ng de ADN, llevando a cabo

la reacción en un volumen de 25 µL. El programa térmico que mejor funcionó en la amplificación fue 94-56-72 °C con 30, 50 y 80 seg respectivamente por 34 ciclos, con un inicio de 94° C por 2 min y una extensión de 72° C por 4 min.

4.2.2 Detección en plantas con PCR directo. Los iniciadores fU5/rU3, dieron una reacción positiva cuando se utilizó ADN de teresita (*Catharanthus roseus* L.), cocotero (*Cocos nucifera* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.), obteniéndose un producto de 900 pb aprox. (Figura 5).

Tales resultados muestran la universalidad de estos iniciadores, que en general amplifican varios fitoplasmas. Estos iniciadores fueron utilizados también por Avinent y Llácer (1995), obteniendo resultados favorables al amplificar un producto de 880 pb para detectar "stolbur" del tomate en España.

Así también, Lorenz y cols. (1995) utilizaron estos iniciadores para amplificar ADN de fitoplasmas en teresitas infectadas con fitoplasmas y otros fitoplasmas[®] mantenidos en esta última especie, por lo que también confirmaron la universalidad de estos iniciadores. Cabe observar que no se logró amplificación en las muestras de nochebuena y en una muestra de papa (Figura 5, carriles 2 y 4), ya que éstas muestras fueron negativas para fitoplasmas.

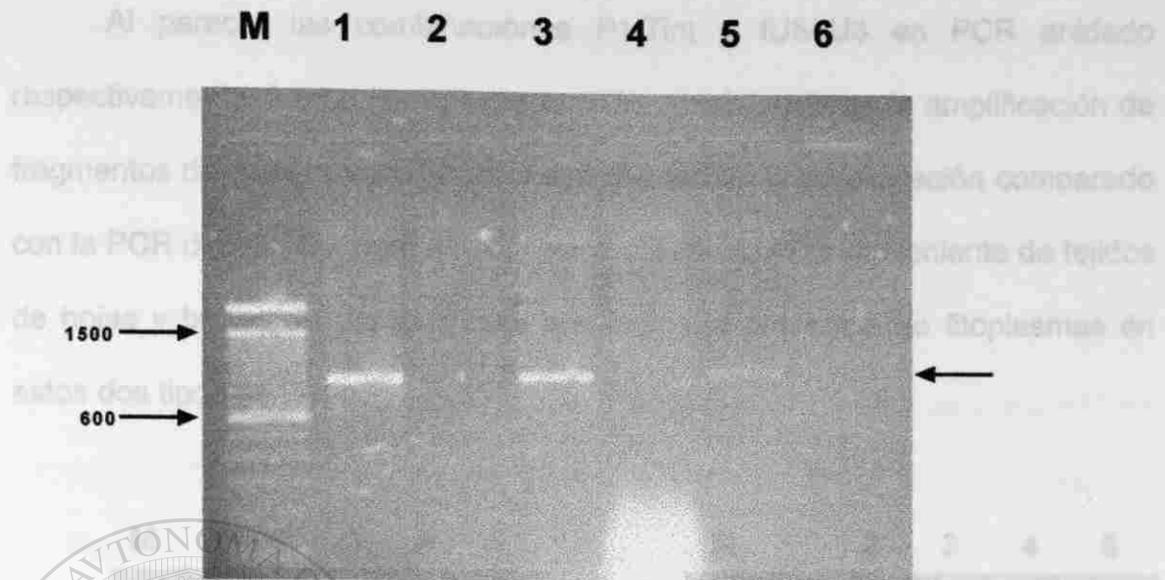


Fig. 5. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores fU5/rU3 y ADN de diferentes especies vegetales, visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carril M= marcador de talla molecular Ladder 100, carril 1= teresita, carril 2= noche buena, carril 3= cocotero, carriles 4 y 5= papa. La flecha señala el fragmento amplificado con una talla de 900 pb aprox.

4.2.3 PCR anidado. Al realizar una prueba de PCR y PCR anidado, utilizando

los iniciadores R16F2/R16R2 y fU5/rU3 respectivamente, se encontró que solo con las muestras de teresita se logró la amplificación, obteniendo un producto de 1200 pb. aprox. Carril M= Marcador de talla molecular Ladder 250, carriles 1-4= muestras de papa, carril 5= control positivo. A= PCR directo con P1/Tint B= PCR anidado con fU5/rU3. Las flechas indican el fragmento amplificado que en el caso de A es de una talla de 1500 pb y

En una segunda prueba, donde se utilizaron los iniciadores P1/Tint en

PCR y fU5/rU3 en PCR anidado, se logró amplificar un fragmento de 900 pb.

4.2.4 Detección en tubérculos silvestres y sembrados. Se obtuvieron aprox. utilizando muestras de papa, teresita y cocotero. En la Figura 6 se muestran los resultados del PCR anidado, utilizando solo muestras de papa.

En una segunda prueba, donde se utilizaron los iniciadores P1/Tint en PCR y fU5/rU3 en PCR anidado, se logró amplificar un fragmento de 900 pb. aprox. al utilizar los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1996) (Fig. 7) Los resultados demostraron la presencia de fitoplasmas en tubérculos con síntomas

Al parecer las combinaciones P1/Tint y fU5/rU3 en PCR anidado respectivamente, fueron las que dieron más consistencia en la amplificación de fragmentos de ADN, aumentando la sensibilidad en la amplificación comparado con la PCR directa. Se logró amplificación utilizando ADN proveniente de tejidos de hojas y brotes de papa, lo cual nos indica la presencia de fitoplasmas en estos dos tipos de tejido.

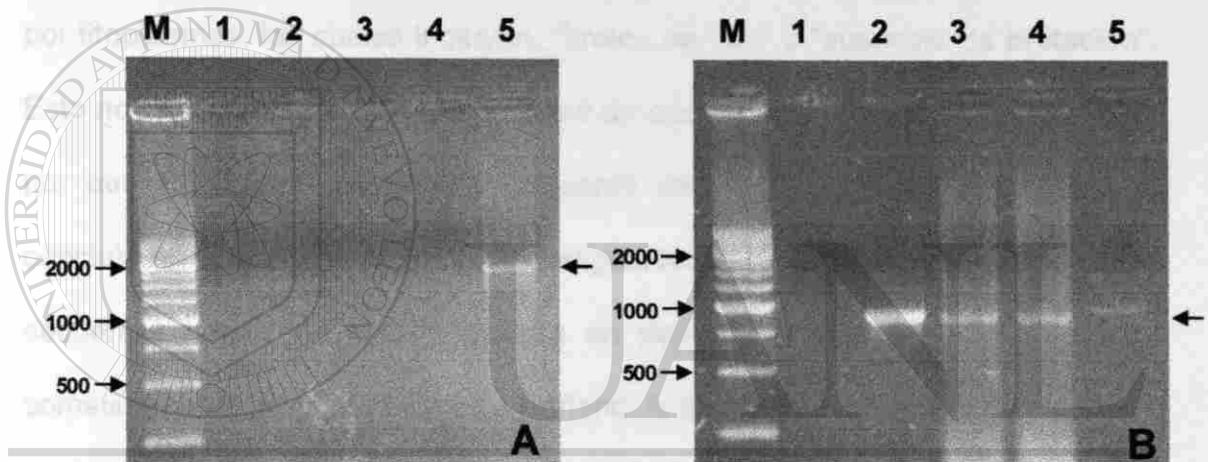


Fig. 6. Fragmentos amplificados por PCR y PCR-anidado utilizando los iniciadores P1/Tint y fU5/rU3 con ADN de papa, visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carril M= Marcador de talla molecular Ladder 250, carriles 1-4= muestras de papa, carril 5= testigo positivo. A= PCR directo con P1/Tint, B= PCR anidado con fU5/rU3. Las flechas indican el fragmento amplificado que en el caso de A es de una talla de 1600 pb y en B de 900 pb aprox.

4.2.4 Detección en tubérculos sintomáticos y asintomáticos. Se obtuvieron resultados positivos con el ADN genómico de los tubérculos con síntomas de "brote de hilo" y "ausencia de brotación", obteniendo un producto de 900 pb aprox. al utilizar los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995) (Fig. 7). Los resultados demostraron la presencia de fitoplasmas en tubérculos con síntomas

característicos de la enfermedad en cuestión. Hay que destacar que se utilizó como tejido para las extracciones, tubérculo de la parte que se une con el estolón, ya que suponíamos que en esta parte del tubérculo existía una mayor concentración de fitoplasmas y tales resultados demostraron dicha suposición.

Se logró detectar fitoplasmas en tubérculos de papa que presentaban brotes normales, es decir, no presentaban síntomas característicos de infección por fitoplasmas, los cuales incluyen: "brotes de hilo" y "ausencia de brotación". Esto nos hace suponer en la posibilidad de que el "brote de hilo" sea producido por otro fitoplasma diferente al causante de "punta morada", de hecho, al concluir el presente trabajo de investigación, el Gen Bank publicó la única secuencia parcial de otro fitoplasma en papa asociado con "brote de hilo" sometida por el grupo de Martínez-Soriano, lo cual avala la suposición anterior.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Se logró amplificar ADN de fitoplasmas obtenido a partir de tubérculos[®] asintomáticos que presentaban brotes normales y vigorosos, utilizando los iniciadores P1/Tint (Smart y cols., 1993) y después fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1993) en PCR anidado, obteniendo un producto de 900 pb. aprox.

La detección de fitoplasmas en tubérculos asintomáticos, nos da una idea del grado de infección oculta en que se encuentra un material, el cual aparentemente se encuentra en condiciones sanas y sin embargo estos

tubérculos pueden desarrollar síntomas en el campo, disminuyendo el rendimiento del cultivo y diseminando la enfermedad.

Al lavar a cabo los muestreos en los lotes comerciales de papa, se observó que

la variedad Alpha

"punta morada",

y Espindo (1995)

variedad Alpha

los

como

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

VERITATIS

AL

LIBER

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se obtuvo un intervalo de confianza para dicho porcentaje el cual se

encuentra entre los valores de 0.0046 y 0.16, se tiene la proporción encontrada

se encuentra en el intervalo de 0.45 % y 16 % con una confiabilidad del 95%.

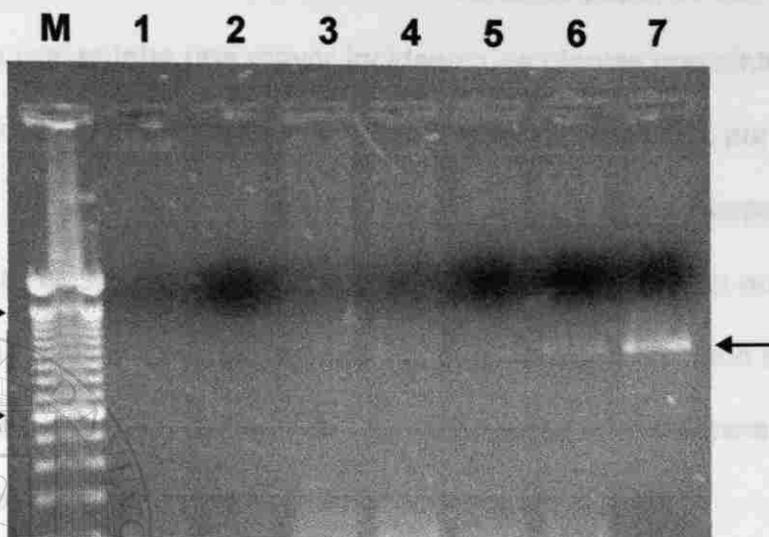


Fig. 7. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores fU5/rU3 con ADN obtenido de la unión del tubérculo con el estolón, visualizado en un gel de agarosa al 1%. Carril M= Marcador de talla molecular Ladder 100, carriles 1-6= muestras de papa y carril 7= testigo positivo. La flecha señala el fragmento amplificado con una talla de 900 pb aprox.

4.2.5 Detección en semilla. No se detectaron fitoplasmas en las muestras de semilla procesadas, tanto de la bodega No. 1 como de la bodega No. 2 (Cuadro 3), al utilizar los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995). Estos resultados presumen que la semilla, la cual tenía diferente procedencia, se encontraba libre de fitoplasmas; sin embargo, con los descubrimientos recientes de que existe otro fitoplasma causante de "brote de hilo", diferente al de "punta morada" y que presuntamente predomina en etapa de semilla, puede ser que nuestros iniciadores universales fU5/rU3 no se unan con el ADN de este nuevo fitoplasma.

Se obtuvo un intervalo de confianza para dicho porcentaje el cual se encuentra entre los valores de 0.0046 y 0.16, se tiene la proporción encontrada se encuentra en el intervalo de 0.45 % y 16 % con una confiabilidad del 95%.

4.3 Ocurrencia de “punta morada” en San Rafael, Galeana, N. L.

Al llevar a cabo los muestreos en los lotes comerciales de papa, se observó que la variedad Alpha presentaba una mayor incidencia de plantas con síntomas de “punta morada”, lo anterior no coincide con los resultados obtenidos por Cadena y Galindo (1985) quienes encontraron en sus experimentos de campo, que la variedad Alpha es resistente a la enfermedad. Se encontró también que en los lotes comerciales de la variedad Gigant, no se observaron plantas con síntomas de “punta morada”, esto podría traer de manifiesto alguna resistencia en esta variedad, sin embargo, tendría que ser probado experimentalmente.

Se obtuvo ADN genómico de las muestras compuestas de los 26 lotes comerciales de papa, muestreados en la región de San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León en el año 2000 (Cuadro 2). Las muestras se sometieron a una reacción de PCR, utilizando los iniciadores fU5/rU3 (Lorenz y cols., 1995).[®] De las 26 muestras, solamente las muestras procedentes de los lotes 17 y 23 resultaron positivas para fitoplasmas, tales muestras correspondieron al lote El Erial de la variedad Alpha y al lote Las Bugambilias también de la variedad Alpha. Con los resultados anteriores, se determinó una proporción de la enfermedad, que en nuestro estudio fue de 7.7 %.

Se obtuvo un intervalo de confianza para dicha proporción, el cual se encontró entre los valores de 0.0048 y 0.16, es decir la proporción encontrada se encuentra en el intervalo de 0.48 % y 16 % con una confiabilidad del 95%,

con lo cual se concluye que se presentó una ocurrencia baja de la enfermedad para el ciclo de estudio.

Los dos lotes comerciales de papa que resultaron positivos, correspondieron a la variedad Alpha y de acuerdo con esto, es importante recordar que en los muestreos realizados en el campo, se observó una mayor incidencia de plantas con síntomas de "punta morada" en esta variedad. Cabe destacar también que en la región estudiada, no existen antecedentes de incidencia de "punta morada" a través de la detección por medio de técnicas moleculares, por lo que la aportación del presente trabajo tiene mayor relevancia.

Hasta ahora los estudios de incidencia de la enfermedad "punta morada" de la papa son escasos y casi no existe información al respecto. Con el surgimiento de las técnicas modernas, como PCR y con trabajos de investigación como este, se puede diagnosticar la enfermedad de una manera más rápida, y además generar información nueva sobre la enfermedad en las zonas de producción para los próximos años.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y en las condiciones que prevalecieron durante el desarrollo de la investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

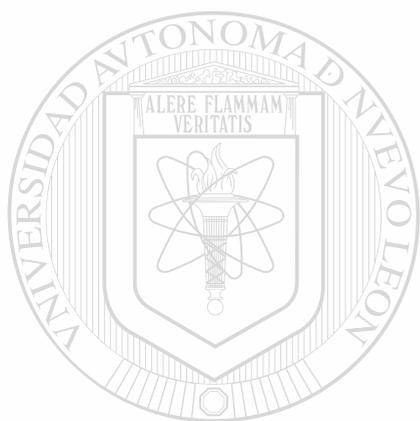
1. Los métodos de extracción de ADN, Doyle y Doyle (1990), Dellaporta y cols. (1983) y DNAzol ES[®], fueron efectivos tanto para la obtención de ADN de buena calidad y cantidad, como para la detección de fitoplasmas por PCR.

2. Se logró establecer un protocolo de PCR para la detección de fitoplasmas causantes de "punta morada" a partir de hojas apicales de plantas de papa, así como la detección de fitoplasmas en brotes de tubérculo y tubérculo de la parte que se une con el estolón.

3. Se desarrolló un protocolo de PCR anidado para aumentar la sensibilidad en la amplificación de fitoplasmas causantes de "punta morada" de la papa.

4. Se definieron las condiciones de reacción para la amplificación de ADN de fitoplasmas, utilizando los pares de iniciadores P1/P7, P1/Tint, R16F2/R16R2 y fU5/rU3. Los iniciadores fU5/rU3 y la concentración de 2.4 mM de MgCl₂, resultaron en nuestras condiciones ser más efectivos en la amplificación de ADN de fitoplasmas, además de lograr amplificar productos al utilizar ADN genómico proveniente de tubérculos asintomáticos.

5. Para la zona de estudio, que comprendió 452 ha distribuidas en 26 lotes comerciales ubicados en la región de San Rafael, municipio de Galeana, N.L. Se obtuvo un valor de incidencia para la enfermedad "punta morada" de la papa de 7.7 %.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. RECOMENDACIONES

1.- Se recomienda realizar una evaluación de variedades con respecto a la susceptibilidad de la enfermedad "punta morada" de la papa. Esta evaluación sería conveniente realizarla utilizando un diseño experimental, en el que se incluyeran minimamente las variedades Alpha, Gigant y Mondial.

2.- Debido a que no existe información sobre vectores y hospederos alternantes, se deben llevar a cabo muestreos de malezas e insectos en el área circundante, durante el ciclo del cultivo de la papa, y aplicar la técnica de PCR para la detección de fitoplasmas.

3.- Es importante continuar con las evaluaciones de semilla en bodegas para determinar la presencia de fitoplasmas y así conocer la situación sanitaria, además de tener información sobre los orígenes de semilla con mayor problemas de sanidad, con especial atención en el fitoplasma causal de "brote de hilo".

4.- Se recomienda ampliar el estudio de incidencia de la enfermedad a otras zonas de producción del estado de Nuevo León y Coahuila, como lo es la región de Huachichil o la sierra de Arteaga, ya que en esta última se produce semilla de papa y aparentemente es una zona con menor incidencia de enfermedades, lo cual tendría que evaluarse.

VII. LITERATURA CITADA

Albanese, G., La-Rosa, R. y Ochoa-Corona, F. 1995. Organismos similares a los micoplasmas (MLO). Nuevos criterios para su clasificación taxonómica y situación actual en Venezuela. Una revisión. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 13: 493-502.

Almeyda-León, I.H., Rocha-Peña, M.A., Piña-Razo, J. y Martínez-Soriano, J.P. 1998. Diagnóstico molecular del amarillamiento letal del cocotero. INIFAP-SAGAR. Mérida, Yucatán. México. pp. 21-27. (Folleto de divulgación).

Avinent, L. y Llácer, G. 1995. El "stolbur" del tomate: detección en España mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Bol. San. Veg. Plagas. 21: 417-423.

Barile, M. F., Razin, S., and Tully, J.G. 1979. The Mycoplasmas. Plant and Insect Mycoplasmas. Academic Press. Nueva York. pp. 244.

Cadena- Hinojosa, M. A. and Galindo-Alonso, J. 1985. Reducing the incidence of "purple top" of potato by means of sowing dates plant genotype and use of insecticides. Rev. Mex. de Fitopat. 3: 35-40.

Cadena-Hinojosa, M. A. 2000. Potato purple top in Mexico: III Effects of plant spacing and insecticide application. Rev. Mex. de Fitopat. 17: 91-96.

Davis, R.E. and Dally, E.L. 2001. Molecular identification and classification of a phytoplasma associated with phyllody of strawberry fruit in Maryland. Plant Dis. 85: 335.

Davis, R. E. and Sinclair, W. A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. Phytopathology 88: 1372-1376.

Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983. Plant Molecular Biology Reporter vol. 1, 19-21.

Deng, S. and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14: 53-61.

Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33: 259-266.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

Gibb, K.S., Padovan, A.C., and Mogen, B.D. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology* 85: 169-174.

Gundersen, D.E. and Lee, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.

Harding, R.M. and Teakle, D.S. 1985. Mycoplasma-like organisms as agents of potato purple top wilt in Queensland. *Aust. J. of Agricultural Res.* 36: 443-449.

Henson, J. M. and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 81-109.

Hooker, W.J. 1981. *Compendium of Potato Diseases*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 91-92.

INEGI. 2000. *El Sector Alimentario en México*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México. pp. 19.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. 1990. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. Inc. pp. 3-11.

Karte, S. and Seemüller, E. 1991. Susceptibility of grafted *Malus taxa* and hybrids to apple proliferation disease. *J. of Phytopathology* 131: 137-148.

Lee, I.-M. 1999. Molecular-based methods for the detection and identifications of phytoplasmas. United States Department of Agriculture. pp. 1-9. (<http://uniud.it/phytoplasma/pap/leex9630.html>).

Lee, I.-M and Dane, R.A. 2001. First report of aster yellows phytoplasma associated with cabbage in southern Texas. *Plant Dis.* 85: 447.

Lee, I.M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W., and Davis, R. E. 1994. Use of mycoplasma like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infection in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559-566.

Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., and Bertaccini, A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88:1359-1366.

Lee, I.-M., Hammond, R. W., Davis, R. E., and Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

Leyva-López, N.E. y Martínez-Soriano, J.P. 1999. Caracterización molecular de fitoplasmas en papa y posibles hospedantes alternos en México. XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México. pp. 189.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lim, P.-O. and Sears, B.B. 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171: 5901-5906.

Liu, B., White, D.T., Walsh, K.B., and Scott, P.T. 1996. Detection of phytoplasmas in dieback, yellow crinkle, and mosaic diseases of papaya using polymerase chain reaction techniques. *Aust. J. Agric. Res.* 47: 387-394.

Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemüller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.

Martínez-Soriano, J.P., Ochoa-Sánchez, J.C., Gómez-Leyva, F. y Alvarado-Gómez, O.G. 2000. Perspectivas de la biología molecular en el diagnóstico fitosanitario en México y diseño de primers para PCR. Memorias del curso: Detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. México, D. F. pp. 1-10.

Martínez-Soriano, J.P. y López-Flores, C.I. 1999. La punta morada de la papa. Congreso Nacional de Productores de Papa. Guanajuato, México. pp. 1-15.

Martínez-Soriano, J.P., Almeyda-León, I.H., Piña-Razo, J., Rocha-Peña, M.A., and Byerly-Murphy, K.F. 1994. Detection of Phytoplasma sp. Associated with Lethal Yellowing of coconut palms using polymerase chain reaction. Rev. Mex. Fitopat. 12: 75-80.

Marzachi, C., Veratti, F., d'Aquilio, M., Vischi, A., Conti, M., and Boccoardo, G. 2000. Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. J. of Plant Pathology 82: 201-212.

Ramírez-Martínez, M. y Ramos-Elorduy de Conconi, J. 1978. Poblaciones de cigarritas (Homoptera-Cicadellidae) en 12 variedades de papa en Chapingo, México, y su posible relación con la enfermedad de la "punta morada". Agrociencia 34: 79-90.

Rowe, R.C. 1993. Potato health management. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 130.

SAGAR. 1999. Detección del amarillamiento letal por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dirección General de Sanidad Vegetal. Ficha técnica. México, D.F. pp. 1-3.

Salazar, L.F. 1999. Fitoplasmas: un factor negativo para la producción de semilla de papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pp. 1-2. (<http://condesan.org/infoandina/Foros/InfoPapa/papa27.htm>).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, N.Y.

Seemüller, E. 1976. Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort.* 67: 109-112.

Silva-Rosales, L., Alvarado-Gomez, O. y Martínez-Soriano, J.P. 1999. La reacción en cadena de la polimerasa como herramienta de diagnóstico en virología vegetal. *Fitopatología* 34: 13-21.

Singh, S., Bhargava, K.S., and Nagaich, B.B. 1983. Lethality of the purple top pathogen (mycoplasma) to its vector *Alebroides nigroscutellatus*. *Indian Phytopathology* 36: 646-650.

Smart, C.D., Schneideer, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer-region. *App. and Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.

Strand, L.L., Rude, P.A., and Clark, J.K. 1992. Integrated pest management for potatoes in the Western United States. A Western Regional Research Publication. Okland, California, USA. pp. 94.

Wang, K. and Hiruki, C. 2001. Molecular characterization and classification of phytoplasmas associated with canola yellows and a new phytoplasma strain associated with dandelions. *Plant Dis.* 85: 76-79.

Zavala-Quintana, T. 1998. Punta morada de la papa. XVII Congreso de Fitogenética. Acapulco, Guerrero Méx. pp. 502.

VIII. APÉNDICE

8.1 Síntomas de la enfermedad

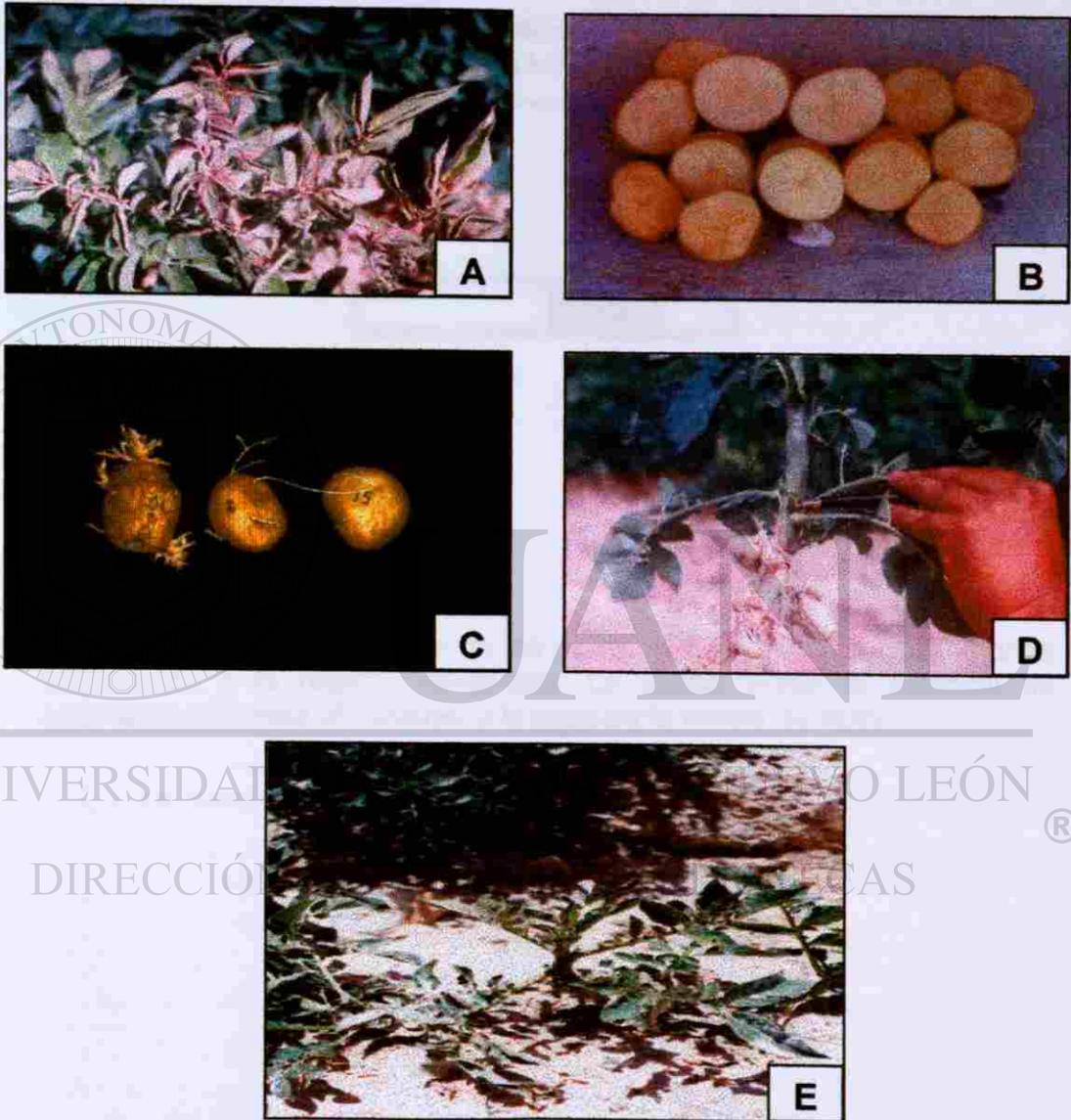


Fig. 8. Síntomas asociados con la ocurrencia de fitoplasmas en papa. **A.** Planta de papa con hojas apicales color púrpura. **B.** Tubérculos con "necrosis de red". Estos tubérculos no emitieron brotes. **C.** Tubérculos con "brote de hilo". Compare por el tipo de brote, los tubérculos infectados, con el tubérculo sano. **D.** Planta sintomática con presencia de tubérculos aéreos. **E.** Planta sintomática con falta de crecimiento.

8.2 Selección de iniciadores

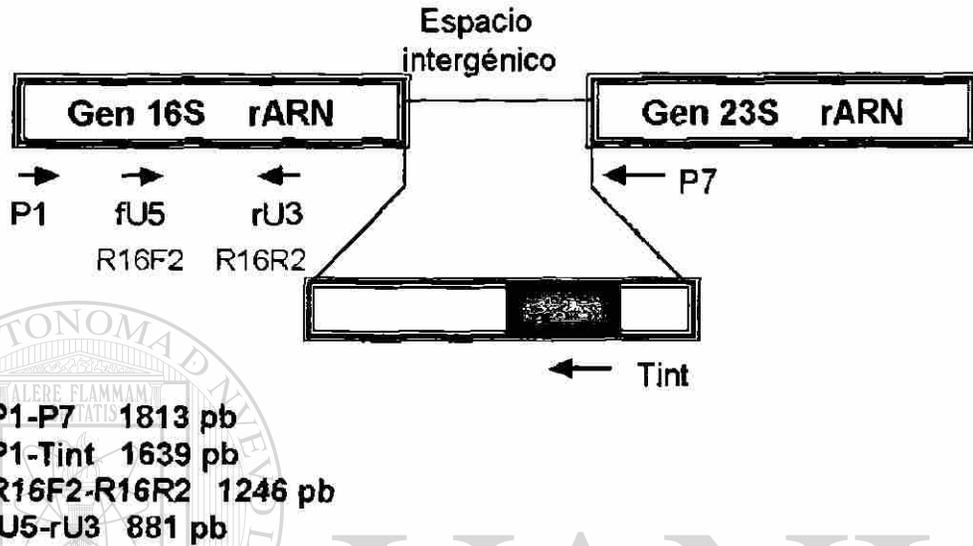


Fig. 9. Representación esquemática de los genes 16S y 23S rARN ribosomal de fitoplasmas y la región intergénica. La flecha indica la posición de apareamiento entre el iniciador y la secuencia molde de ADN.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

8.3 Secuencias disponibles de los fitoplasmas causantes de "brote de hilo" y "punta morada"

Cuadro 5. Secuencias disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) de los fitoplasmas causantes de "brote de hilo" y "punta morada".

1: AF329315. Potato purple top... [gi:13357196 Taxonomy
 LOCUS AF329315 1024 bp DNA BCT 16-MAR-2001
 DEFINITION Potato purple top phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION AF329315
 SOURCE Potato purple top phytoplasma.
 ORGANISM Potato purple top phytoplasma
 Bacteria; Firmicutes; Bacillus/Clostridium group; Mollicutes; Acholeplasmataceae; Phytoplasma; 16SrI Aster yellows group).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1024)
 AUTHORS Martinez Soriano, J.P., Leyva-Lopez, N.E., Zavala-Soto, M.E., Beres, M. and Leal-Klevezas, D.S.
 TITLE Molecular detection of the causative agent of the 'witches' broom' syndrome of potato in both infected and asymptomatic seeds
 JOURNAL Biotechnol. Apl. 16, 93-96 (1999)
 REFERENCE 3 (bases 1 to 1024)
 AUTHORS Martinez-Soriano, J.P., Leyva-Lopez, N.E., Zavala Soto, M.E., Beres, M. and Leal-Klevezas, D.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-DEC-2000) Biotecnologia y Bioquímica, CINVESTAV, Km 9.6 lib. nte. carr. Irapuato-Leon, Irapuato, Gto 36500, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1024
 /organism="Potato purple top phytoplasma"
 /specific host="potato"
 /db_xref="taxon:111873"
 /country="Mexico"
 /note="hair sprouts-inducing type II phytoplasma; associated with potato seeds that do not germinate"
 /product="16S ribosomal RNA"
 BASE COUNT 294 a 189 c 296 g 245 t
 ORIGIN
 1 acgactgctg ctaagactgg ataggaagaa ataaggcctc ttatttcttt taaaagacct
 61 agtaataggt atactttagg aggggcttgc gccatattag ttagttggta gggtaatggc
 121 ctaccaagac gatgatgtgt agctggactg agaggttgaa cagccacatt gggctcgaga
 181 cacggcccaa tctcctacgg gaggcagcag taaggaattt tccgcaatgg agggaaactct
 241 gaccgagcaa cgccgctgga acgacgaagt actttggtat gtaaagttct tttatcaagg
 301 aagaaaagca agtggcgaac catttgttt cgggtacttg atgaataagc cccggcta
 361 tatgtgccag cagccgcggt aagacataag gggcaagtgt tatccggaat tattgggcgt
 421 aaaggggtgc taggcggtca agtaagtcag tgggtaatg gcaacgctca acggtgtccg
 481 gctattgaaa ctgctaaact tgagttagg agaggcgagt ggaattccat gtgtagtgg
 541 aaaatgcgta aatataagg ggaacaccag aggcgtaggc ggctcgctgg gtcttaactg
 601 acgctgagc acgaaagcga ggggagcaaa caggattaga taccctgga gtccacgccg
 661 taagcgatga gtactaagtg tccgggttaa cgggtactga agttaacaca ttaagtactc
 721 cgctgagta gtacgtacgc aagtatgaaa cttaaaggaa ttgacgggac tccgcacaag
 781 cggtgatca tgttgtttaa ttccaagata cccgaaaaac ctccaccagg cttgacatgt
 841 ttttgcgaaa cggtagtaat atcgtagagg ttatcagaaa cacaggtggg gcatggctgt
 901 cgtcagctcg tgtcctgaga tgttaggta agtcctaaaa cgagcgaaac cttatcgta
 961 gttgccagca cgttatgggt gggactttaa cgagactgcc agtgataaac tggaggaagg
 1021 tgag

2: AF217247. Potato purple top...[gi:6694859] Related Sequences, Taxonomy

LOCUS AF217247 1238 bp DNA BCT 16-JAN 2000
DEFINITION Potato purple top phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION AF217247
VERSION AF217247.1 GI:6694859
SOURCE Potato purple top phytoplasma.
ORGANISM Potato purple top phytoplasma
Bacteria; Firmicutes; Bacillus/Clostridium group; Mollicutes; Acholoplasmataceae; Phytoplasma; 16SrI (Aster yellows group).
REFERENCE 1 (bases 1 to 1238)
AUTHORS Martinez-Soriano,J.P., Leyva-Lopez,N.E., Zavala Soto,M.E., Beres,M. and Leal-Klevezas,D.S.
TITLE Deteccion molecular del agente causal de la 'bola de hilo' de la papa en semilla infectada y asintomatica
JOURNAL Biotecnol. Apl. 16, 93-96 (1999)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1238)
AUTHORS Leyva-Lopez,N.E. and Martinez Soriano,J.P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (17-DEC-1999) Biotecnologia y Bioquimica, CINVESTAV Unidad Irapuato, Km 9.6 Lib. Norte, Carr. Irapuato-Leon, Irapuato, Gto. 36500, Mexico
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1238
/organism="Potato purple top phytoplasma"
/specific host="Solanum tuberosum"
/db xref="taxon:111873"
/clone="Toluca 8-6"
/note="agent of 'Potato purple top'"
rRNA <1..>1238
/product="16S ribosomal RNA"
BASE COUNT 359 a 230 c 349 g 300 t
ORIGIN

```

1 acgaactgctg ctaagactgg ataggggaca agaagcacc ttcttgttt taaaagacct
61 agcaataggt atgettaggg aggagcttgc gtcacattag ttagttgggtg gggtaaagge
121 ctaccaagac tattatgtgt agccgggctg agaggttgaa cggacacatt gggactgagg
181 cagacccaa actcctacgg gaggcagcag tagggaattt tcggcaatgg aggaaa.tct
241 gaccgagcaa cggcgcgtga acgatgaagt atttcggtac gtagagttct ttatttaggg
3 1 agaataaat gatggaaaaa tcattctgac ggtacctaat gaataagccc cggtaacta
361 tgtgacagca gccgcggtaa tacatagggg gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgtaa
421 aggtacgta ggccggttaa taagtttatg gtctaagtgc aatgetcaac atgtgatgc
481 tataaaaact gtatagctag agtaagatag aggcaagtgg aattccatgt gtagtggtaa
541 aatgcgtaaa tatatggagg aacaccagta gcgaaggcgg cttgctgggt cttactgac
601 gctgaggcac gaaagcgtgg ggagcaaca ggattagata ccttggtaat ccacgccga
661 aacgatgagt actaaacgtt gggtagaacc agtgttgaag ttaacacatt aagtactccg
721 cctgagtagt acgtacgcaa gtatgaaact taaaggaatt gacgggactt cgcacaagcg
781 gtggatcatg ttggttaatt ggaaggtaac cgaaaaacct caccaggtct tgacatgctt
841 ctgcaaagct gtagaaacac agtggagggt atcagttgca caggtgggtc atggttgctg
901 tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tccgcacatg agcgcaacco ttattgtag
961 ttaccagcac gtaatggtgg ggactttagc aagactgcca gtgataaatt ggaggaaggt
1021 ggggatgacg tcaaatcacc atgccctta tgacctgggc tacaacgtg atacaatggc
1081 tgttacaaag ggtagctgaa gcgcaagttt ttggcgaatc tcaaaaaaac agtctcagtt
1141 cggattgaag tctgcaacte gacttcatga agttggaatc gctagtaatc gcgaatcagc
1201 atgtcggcgt gaataggttc tcgggggttg tacacacc

```

8.4 Simulación computacional de PCR.

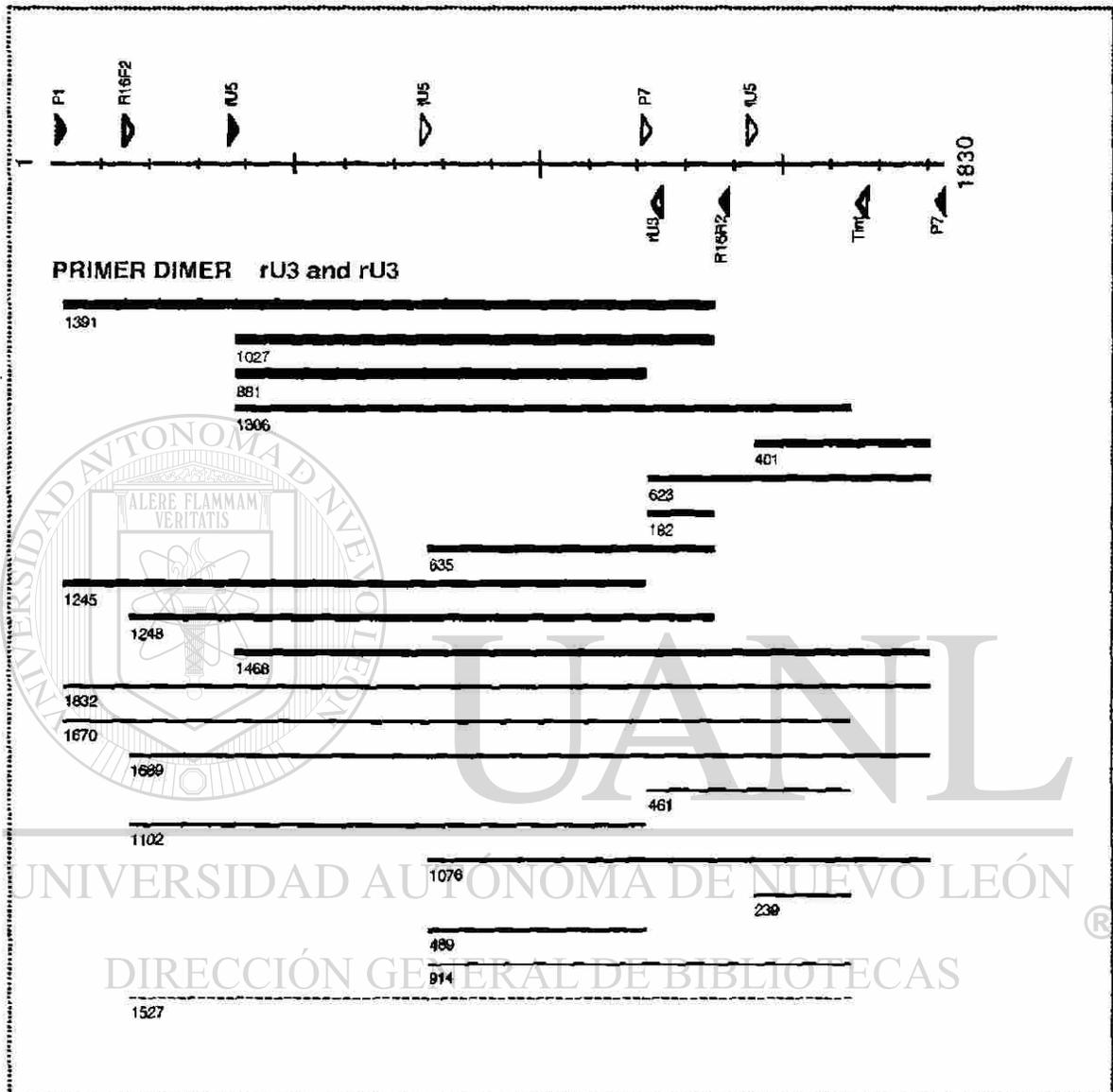
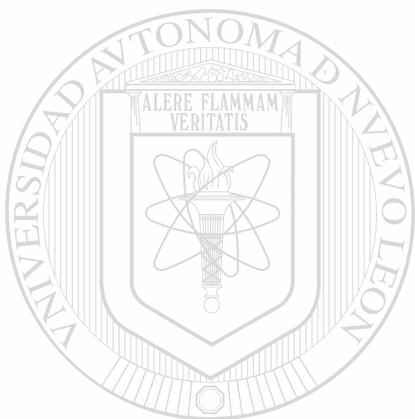


Fig. 10. Simulación de amplificación por PCR de una parte del genoma de fitoplasmas, utilizando la accesión AF222064 como secuencia molde y los iniciadores P1, Tint, P7, rU5, rU3, R16F2 y R16R2.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



