



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

CARACTERIZACIÓN DE DNA DE CLONES DE PAPA Y
FITOPLASMAS ASOCIADOS EN EL VALLE DE TOLUCA,
MEXICO.

T E S I S
Q U E P R E S E N T A:



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

NORMA MARINA ALARCON RODRIGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

Chapingo, Estado de México, Enero del 2007

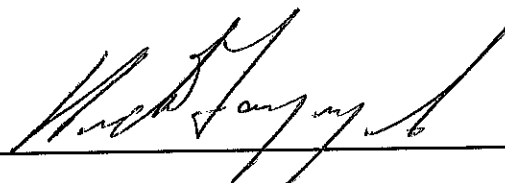


CARACTERIZACIÓN DE DNA DE CLONES DE PAPA Y FITOPLASMAS ASOCIADOS DEL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO.

Tesis realizada por **Norma Marina Alarcón Rodríguez** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



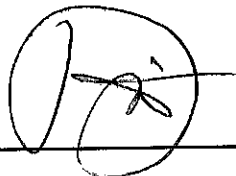
DR. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESORA:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



M.C. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a los contribuyentes de México quienes por conducto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología financiaron esta etapa de mi formación profesional.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por su contribución económica en la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial a la Maestría en Protección Vegetal y a cada uno de los Doctores que la forman, por todas las enseñanzas y experiencias recibidas que contribuyeron a una formación académica y profesional de excelencia.

Al Ph Dr. Héctor Lozoya Saldaña por su atinada dirección así como por haberme dado todas las facilidades para realizar esta investigación y la confianza mostrada durante la estancia en esta Maestría.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por el apoyo invaluable, por la siempre amable disposición para asesorarme en la realización de esta investigación y la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular.

A el M.C. Dimas Mejía Sánchez por su apoyo, asesoría y disposición brindada en todo momento, así como por privilegiarme con su amistad.

A mi familia por su apoyo, amor, comprensión y la fortaleza para sobrellevar la lejanía durante este tiempo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular quienes siempre fueron comprensivos, amables, dispuestos a apoyarme en cualquier momento y de quienes aprendí mucho durante mi estancia.

DEDICATORIA

*A Jehová Dios por permitirme el amor,
serenidad y la sabiduría necesaria para
conducirme en la vida que me ha
concedido hasta el momento.*

*A mi madre, la persona más valiosa en
mi vida, por ser el mejor ejemplo de
amor, superación y fortaleza. Por su
apoyo incondicional y todo lo que ha
hecho para formar una hermosa familia.*

Te amo Mami.

*A mis hermanos Félix y Mary por el
gran amor que nos tenemos, que a pesar
de todo siempre estaremos unidos por
todos los valores inculcados y el amor
impregnado en nosotros gracias a
nuestros padres.*

*A la memoria de mi padre, Sr. José Félix
Alarcón el ser más maravillosos que la
vida me ha dado a conocer. Mostrándome
guía, ejemplo, valor, rectitud y sobre todo
amor en todo momento.*

*A la memoria de mi hermano Manuel por
todo su amor, y por el apoyo recibido para
poder iniciar mis estudios profesionales.*

*A ti amor, gracias por coincidir conmigo
en la vida, el regalo más bello es ser
amada y respetada por un gran hombre
como lo eres tú, el mejor del mundo.*

DATOS BIOGRÁFICOS

NORMA MARINA ALARCÓN RODRÍGUEZ NACIO EN LA CIUDAD DE XALAPA, VERACRUZ EL 30 DE NOVIEMBRE DE 1974, DONDE CURSO SUS ESTUDIOS DE EDUCACIÓN BASICA. EN EL AÑO 1993 INGRESO A LA FACULTAD DE BIOLOGIA EN LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA ZONA XALAPA, DONDE OBTUVO EL GRADO DE LICENCIATURA, ADEMAS DEL PRIMER LUGAR EN LA OLIMPIADA NACIONAL DE BIOLOGÍA EN EL MISMO AÑO. EN 1999 SE INTEGRO AL LABORATORIO DE ALTA TECNOLOGIA DE XALAPA DEDICANDOSE A EL DIAGNOSTICO FITOSANITARIO EN DIVERSAS AREAS OBTENIENDO LAS APROBACIONES COMO SIGNATARIO EN EL AREA DE MALEZAS Y ENTOMOLOGIA POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL. HA PARTICIPADO EN DIFERENTES EVENTOS CIENTIFICOS.

EN EL AÑO 2004 INGRESO A LA MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO, DONDE FUE CONSIDERADA DOS VECES PARTE DEL CUADRO DE HONOR DE DICHO DEPARTAMENTO, EGRESO EN EL 2006 Y POSTERIORMENTE APROBÓ SU EXAMEN DE GRADO CON MENCIÓN HONORIFICA.

INDICE GENERAL

SECCION	CONTENIDO	PAGINA
	INDICE DE CONTENIDO	i
	INDICE DE FIGURAS	iv
	INDICE DE CUADROS	vii
	RESUMEN	viii
	ABSTRACT	viii
I	INTRODUCCIÓN	1
II	OBJETIVOS	2
III	REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1	El cultivo de la papa	3
3.1.1	Origen y distribución	3
3.1.2	Importancia	3
3.2	Fitoplasmas	4
3.2.1	Características generales	4
3.2.2	Clasificación y filogenia	5
3.3	Mecanismo de acción	9
3.4	Sintomatología	9
3.5	Transmisión de los fitoplasmas	10
3.5.1	Por vectores	10
3.5.2	Por injerto	12
3.5.3	Por cúscuta	12
3.6	Detección de Fitoplasmas	13
3.6.1	Rango de hospederos y sintomatología	13
3.6.2	Microscopía electrónica y de fluorescencia	13
3.6.3	Serología	14

3.6.4	Métodos Moleculares	15
3.7	Fitoplasmas en papa	17
3.8	Punta Morada	18
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1	A) Detección y caracterización de fitoplasmas	23
4.1.1	Material Vegetal	23
4.1.2	Extracción de DNA	25
4.1.3	PCR-directa	26
4.1.4	PCR-anidada	26
4.2	Digestión con enzimas de restricción	29
4.3	B) Genotipificación de plantas de papa resistentes y susceptibles a fitoplasma	31
4.3.1	Material Vegetal	31
4.3.2	Extracción de DNA	32
4.3.3	RAPDS	32
4.3.4	Análisis de datos	34
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1	A) Detección y caracterización de fitoplasmas	35
5.1.1	Extracción de DNA	35
5.1.2	Análisis de PCR-directa	35
5.1.3	Análisis de PCR-anidada	38
5.2	Resultados de la Digestión con Enzimas de Restricción	44
5.3	B) Genotipificación de plantas de papa resistentes y susceptibles a fitoplasmas	48
5.3.1	Análisis de RAPDS	48

VI	CONCLUSIONES	58
VII	LITERATURA CITADA	59

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
1	Fitoplasmas en tejido vegetal, formas esféricas y pleomórficas	4
2	Morfología y ciclo de vida del psílido <i>Bactericera cockerelli</i>	21
3	Sintomatología observada en papa	22
4	Muestras tomadas en el campo experimental. Tubérculo con brote ahilado. Apariencia de clones en el campo y muestra enferma como testigo positivo	24
5	Representación esquemática de la ubicación de los iniciadores empleados en los genes 16S y 23S rRNA y región intergénica	28
6	Etapas del método empleado desde la extracción de DNA, amplificación y visualización de los productos amplificados en geles de agarosa y acrilamida	30
7	Calidad de DNA extraído de follaje visualizado en geles de agarosa al 0.8%	35
8	Fragmentos amplificados con R16F2/P7 de 1400 pb	36
9	Fragmentos amplificados con P3/P7 de 350 pb	37
10	Fragmentos amplificados con R16F2/Ayint de 900 pb aproximadamente	38
11	Fragmentos amplificados de 1400 pb con PCR-anidada a partir de los iniciadores R16mF2/R16mR1	39
12	Fragmentos amplificados de 1200 pb con PCR-anidada a partir de los iniciadores R16F2/R16R2	40
13	Fragmentos amplificados de 1200 pb con PCR-anidada a partir de los iniciadores R16F2n/R16R2	41
14	Árbol que representa los grupos de fitoplasmas de fragmentos amplificados con los diferentes iniciadores	43

15	Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con Tru9	44
16	Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con Taq 1	44
17	Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con Hinf. 1	45
18	Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con Kpn I	45
19	Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con Eco RI	46
20	Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con Alu 1	46
21	Árbol construido con RFLPS	47
22	Geles de agarosa 1.2%. A: iniciador C-09 ROTH, B: iniciador C-12 ROTH, C: iniciador G-02 ROTH, D: iniciador G-10 ROTH, E: iniciador K 17 ROTH	48
23	Iniciador C-09 ROTH,. Carriles de 1-17 clones de papa, 18-24 plantas de papa sanas usadas como controles negativos y carril 25 planta de papa enferma de punta morada. Gel de acrilamida teñido con nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas)	50
24	Iniciador C-12, Carriles de 1-17 clones de papa, 18-24 plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 25 planta de papa enferma de punta morada	51
25	Iniciador G-02, Carriles de 1-17 clones de papa, 18-24 plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 25 planta de papa enferma de punta morada	52
26	Iniciador G-10 Carriles de 1-17 clones de papa, 18-23 plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 24 planta de papa enferma de punta morada	52

27	Iniciador K-17 Carriles de 1-17 clones de papa, 18-24 plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 25 planta de papa enferma de punta morada	53
28	Árbol construido con método UPGMA coeficiente de similitud Jaccard, en el programa estadístico NTSYS	54
29	Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para los clones de papa (A) y para las bandas obtenidas por cada uno de los iniciadores (B), producto del análisis factorial por correspondencia simple.	56

INDICE DE CUADROS

No.	CONTENIDO	PAGINA
1	Grupos de fitoplasmas clasificados mediante análisis de RFLP y secuenciación del gen 16S rRNA (Lee, 1994)	6
2	Grupos de fitoplasma clasificados mediante análisis de RFLP y secuenciación del gen 16S rRNA (Seemüller, 1998)	8
3	Clones de papa que mostraron cierta resistencia a la punta morada en el campo experimental del PICTIPAPA	23
4	Iniciadores utilizados en la PCR directa y PCR anidada, ubicación en los genes 16S, 23S rRNA y la Región intergénica (RI)	27
5	Pares de bases esperadas por cada una de las combinaciones de los iniciadores empleados	28
6	Clones y plantas de papa empleados para realizar la genotipificación con marcadores RAPDS	31
7	Iniciadores utilizados para RAPDs y su secuencia	34
8	Amplificaciones obtenidas con los diferentes iniciadores probados	42
9	Valores propios de los clones de papa a raíz del análisis factorial por correspondencia simple.	57

CARACTERIZACIÓN DE DNA DE CLONES DE PAPA Y FITOPLASMAS ASOCIADOS DEL VALLE DE TOLUCA MÉXICO.

DNA CHARACTERIZATION OF POTATO CLONES AND ASSOCIATED PHYTOPLASMS OF THE TOLUCA VALLEY, MEXICO

Norma Marina Alarcón Rodríguez ¹ y Héctor Lozoya Saldaña ²

RESUMEN

La mayor parte de la superficie sembrada de papa en México es afectada por la enfermedad conocida como punta morada, ocasionada por fitoplasmas, cuyo manejo no ha sido dominado. Una opción es generar variedades resistentes y que dicha resistencia pueda ser confirmada molecularmente. El objetivo de este trabajo fue detectar, identificar y caracterizar a los fitoplasmas asociados con clones de papa, así como tipificar con huellas de DNA a dichos. La detección del patógeno se hizo con PCR- directa y PCR anidada. Se caracterizaron cuatro grupos de fitoplasmas mediante el análisis del DNA con RFLP, usando las enzimas *Alu* 1, *Hinf* 1, *Kpn* 1, *Eco* R1, *Tru* 9, *Taq* 1. Cinco iniciadores de marcadores RAPDS tipificaron a los clones en dos grandes grupos; el primero incluyó a los que estaban infectados por el patógeno, pero eran asintomáticos, mientras que el otro agrupó a los clones libres de fitoplasmas.

Palabras clave: Punta morada, resistencia, RAPDS, RFLP.

ABSTRACT

¹ Tesista ² Director de Tesis

Most of the potato growing area in Mexico is affected by the disease known as purple top, induced by phytoplasmas, whose handling has not been dominated. One option is to generate resistant varieties and then the said such resistance could be molecularly confirmed. The objective of this work was to detect, identify, and characterize the phytoplasmas associated with potato clones, as well as to typify such clones through DNA fingerprinting. The pathogen was detected with direct and nested PCR. Four groups of phytoplasmas were characterized through DNA analysis by RFLP with the enzymes *Alu* 1, *Hinf* 1, *Kpn* 1, *Eco* R1, *Tru* 9, *Taq* 1. Five RAPDS primers typified the clones in two big groups; the first set included the ones infected by the pathogen, but they were symptomless, while the other consisted of phytoplasm-free clones.

Key words: Purple top, resistance, RAPDS, RFLP.

I. INTRODUCCIÓN

La papa ocupa el quinto lugar como fuente de alimento después del maíz, frijol, trigo y arroz; además es importante por su potencial industrial tanto en la rama alimenticia como en la química. Sin embargo, este cultivo es susceptible a más de 300 plagas (Hooker, 1981), aunque no todas son de importancia económica.

Desafortunadamente el 70% de la superficie sembrada es afectada por enfermedades conocidas como punta morada y brote de hilo que en México se encuentran distribuidas en los estados de Guanajuato, Chihuahua, Michoacán, Puebla, Veracruz, Durango, Coahuila, Tamaulipas, Aguascalientes, Nuevo León y Estado de México, las pérdidas pueden ser hasta de un 80% en el rendimiento del cultivo (Leyva, *et al.*, 2002). Por ello se han realizado diferentes estudios para determinar el agente causal y conocer detalles sobre la enfermedad que puedan ser útiles para su manejo, además que se ha establecido la Campaña Fitosanitaria Nacional contra el complejo Punta Morada-*Bactericera* (su vector) para contrarrestar las pérdidas económicas. Una clave para realizar un buen control es el diagnóstico oportuno y la identificación del agente causal. Muchas investigaciones se han realizado para determinar si se trata de un fitoplasma o simplemente la toxina del vector (*Paratrioza cockerelli*) o si obedece a un síndrome en donde intervienen virus, hongos, insectos y fitoplasmas (Ramos *et al.*, 2003).

Actualmente se cuenta con diversos métodos para determinar el agente causal, en donde las técnicas moleculares han mostrado ser una gran herramienta.

II. OBJETIVOS

GENERALES

- 1) Detectar y caracterizar fitoplasmas asociados a la punta morada presente en clones de papa en el Valle de Toluca, México.
- 2) Tipificar plantas de papas tolerantes y susceptibles a fitoplasmas procedentes de clones cultivados en el valle de Toluca, México.

ESPECÍFICOS

- 1) Detectar la presencia de fitoplasmas con PCR en clones de papa en el Valle de Toluca, México utilizando diferentes combinaciones de iniciadores degenerados.
- 2) Caracterizar y comparar los fitoplasmas detectados a través de fragmentos de restricción derivados del gen ribosomal 16S.
- 3) Diferenciar mediante marcadores RAPDs a los clones de papa tolerantes y susceptibles a fitoplasmas.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. EL CULTIVO DE LA PAPA

3.1.1 Origen y distribución

La papa es conocida en América desde hace 10,500 años tiene su centro de origen en los Andes de Sudamérica y su centro de Diversidad importante en la cuenca del Lago Titicaca, al sureste de Perú y noroeste de Bolivia, pero existen especies silvestres en Centroamérica y en México. La planta fue introducida en Europa en el siglo XVI por los exploradores españoles, el cultivo se difundió rápidamente sobre todo en las regiones templadas y, a principios del siglo XVIII, se introdujo en el norte de América (Montaldo 1984).

3.1.2. Importancia

El cultivo de la papa es muy importante para la economía mundial, se ubica en el quinto lugar de producción sólo después del maíz, trigo frijol y arroz; con cerca de 321.10 millones de toneladas anuales producidas (Santos, 2005). En México es de gran importancia por dos aspectos fundamentales, en primer lugar como alimento por su valor nutricional y debido a las diversas labores que demanda en la siembra, cosecha, comercialización, etc., tiene un fuerte impacto económico en las zonas donde se cultiva. Como cultivo a nivel nacional la papa ocupa el lugar 35 en orden de importancia por superficie sembrada, cosechándose en México alrededor de 75,000 ha, de las cuales se obtiene una producción de alrededor de 1 millón 780 mil toneladas. Los principales estados productores en México son Sinaloa, Chihuahua, Sonora, Nuevo León, Guanajuato, Edo. de México, Jalisco, Coahuila, Michoacán, Puebla y Veracruz (SIAP, 2005).

3.2. FITOPLASMAS

3.2.1. Características generales

Los fitoplasmas son organismos unicelulares altamente pleomórficos, sin pared celular, y están rodeados de una membrana trilaminar de aproximadamente 8-10 μm de grosor (Figura 1). Su diámetro varía mucho desde 200 a 800 μm , las formas esféricas miden de 175 a 400 μm , mientras que las filamentosas llegan a medir alrededor de 1700 μm (Arora, *et al* 1988) éstas formas filamentosas predominan en fases tempranas de la infección (Lee *et al.* 2000). El cuerpo de los fitoplasmas contiene un enrejado fibrilar de hebras, que se supone son ADN, y áreas con gránulos semejantes a ribosomas.

Estos organismos aparentemente se propagan por fisión binaria, gemación o fragmentación; los fitoplasmas son los procariontes más pequeños capaces de replicación autónoma (Chang and Donaldson 1985). Diversos estudios han revelado la presencia de elementos extracromosomales (plásmidos), particularmente en aquellos fitoplasmas causantes de síntomas como virescencias y filodias en sus plantas hospederas (Kirkpatrick, 1997)

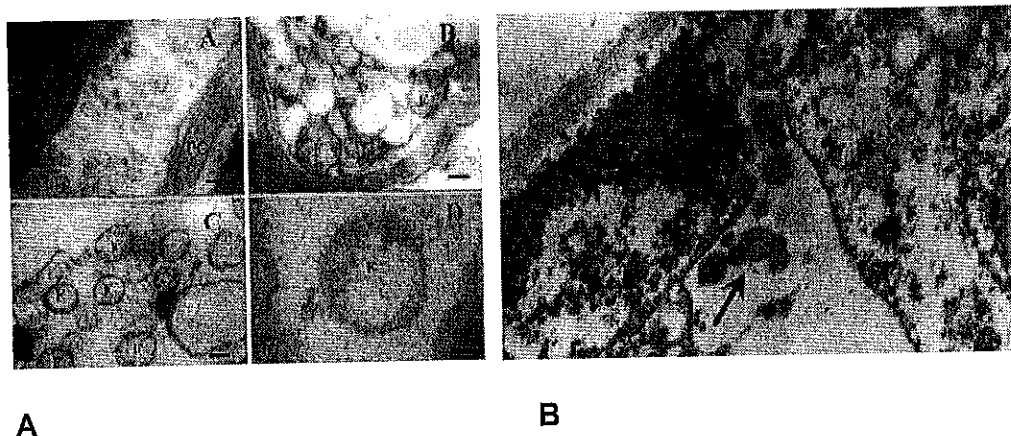


Figura 1. A Fitoplasmas en células del floema de peciolo de hojas de plantas de vides (Herrera y Madariaga, 2003). B. Fitoplasmas en tejido vegetal, formas esféricas y pleomórficas (Fuente. www.scielo.cl/scielo.php)

3.2.2. Clasificación y filogenia

Gracias a diversas investigaciones de las secuencias del gen 16S rDNA se ha supuesto que los fitoplasmas derivan de un ancestro común gram-positivo, clostridial, relacionándolos más estrechamente con *Acholeplasma* que con los verdaderos micoplasmas (Kirkpatrick, 1997). Se les ha ubicado dentro de la clase Mollicutes debido al tamaño de genoma que varía de 500 a 1185 kilobases (Lim y Sears, 1991) y por el % de G+C que va en un rango de 25 a 30%, valor que es similar al de otros miembros de la clase Mollicutes (Kollar, et al, 1990).

A través de diversas investigaciones del gen 16S RNA por diversos grupos de científicos, el Comité Internacional de la Sistemática Bacteriológica (ICSB), el Subcomité sobre Taxonomía de Mollicutes aceptó reemplazar el nombre trivial de MLO por el término fitoplasma. Este nombre esta bajo el status taxonómico provisional de "Candidatus" para referirse al nombre genérico de los micoplasmas patógenos de plantas, es decir de los fitoplasmas (Seemuller et al., 1998).

Lee et al. (1993) propusieron una clasificación tras haber realizado análisis de patrones de RFLP proponiendo 10 grandes grupos (llamados grupos 16 rRNA) y 15 subgrupos. Un año después tras diseñar iniciadores específicos y usar un número mayor de enzimas de restricción propuso 14 grupos y 38 subgrupos (Lee et al. 1994) (Cuadro 1). Por su parte Seemüller et al., en 1998 designaron 20 grandes grupos distintos de fitoplasmas (Cuadro 2), como resultado del análisis filogenético y secuenciación del gen 16S rRNA de 75 fitoplasmas distintos, a su vez presentaron una tabla que clasifica a 246 fitoplasmas, en la cual el grupo del amarillamiento de Aster (AY) es el que contiene mayor número de subgrupos

Cuadro 1. Grupos de fitoplasmas clasificados mediante análisis de RFLP y secuenciación del gen 16S rRNA.

Grupo de fitoplasma	subgrupos	Aislamiento	Origen geográfico	Hospedante
16SrI (Amarillamiento del Aster)	16SrI-A	Tomato bing bund	Arkansas	Tomate
	16SrI-B	Maryland aster yellows	Maryland	Vinca
	16SrI-C	Clover phyllody	Canada	Trébol
	16SrI-D	Paulownia broom	Taiwan	Paulownia
	16SrI-E	Blueberry stunt	E.U.A	Arándano
	16SrI-F	Apricot chlorotic leaf roll	España	Albaricoque
	16SrI-H	Chrysanthemum yellows	Italia	Crisantemo
	16SrI-K	Strawberry multiplier	Norteamérica	Fresa
16SrII (Escoba de bruja del Peanut)	16SrII-A	Escoba bruja cacahuete	Taiwan	Cacahuete
	16SrII-B	Escoba de bruja de lima	Arabia	Lima
	16SrII-C	Filodia del algodón	Africa, Asia	Algodón
16SrIII (Enfermedad del X)	16SrIII-A	Hoja pequeña remolacha Enfermedad X del durazno	Australia Canadá	Remolacha Durazno
	16SrIII-B	Filodia italiana del trébol	Italia	Trébol
	16SrIII-C	Pecan bunch	Georgia	Pecan
	16SrIII-D	Goldenrod yellows	E.U.A	Goldenrod
	16SrIII-E	Spirea stunt	E.U.A	
	16SrIII-F	Milkweed yellows	E.U.A	
	16SrIII-G	Escoba de bruja de nuez	E.U.A	Nuez
	16SrIII-H	Inducción del manchado de la nochebuena	E.U.A	Nochebuena
16SrIV (Amarillamiento letal del cocotero)	16SrIV-A	Amarillamiento letal coco	E.U.A, Caribe	Palma coco
	16SrIV-B	Declinamiento letal coco	África	Palma coco

Continuación Cuadro 1

Grupo de fitoplasma	Subgrupos	Aislamiento	Origen geográfico	Hospedante
16SrVI	16SrVI-A	Proliferación del trébol	Norteamérica	Trébol
(Proliferación del trébol)	16SrVI-B	Multiplicación de la fresa	Canadá	Fresas
16SrVII	16SrVII-A	Amarillamiento del Fresno	E.U.A	Fresno
(Amarillamiento del Fresno)	16SrVIII-A	Escoba de bruja de Loofah	Taiwan	Loofah
(Escoba de bruja Loofah)	16SrIX-A	Escoba de bruja guandú	Norteamérica	Guandú
(Escoba de bruja del guandú)	16SrX-A	Proliferación del manzano	Europa	Manzano
16SrX	16SrX-B	Enrollamiento hoja del albaricoque.	Italia	Albaricoque
(Proliferación de la manzana)	16SrX-C	Declinamiento del peral	Italia	Peral
	16SrX-D	Escoba bruja spartium	Italia	Spartium
16SrXI	16SrX-E	Escoba de bruja del aliso negro	Alemania	Aliso negro
(Enanismo y amarillamiento del Arroz)	16SrXI-A	Enanismo y amarillamiento del Arroz.	India, Japón	Arroz
	16SrXI-B	Hoja blanca de la Caña de Azúcar.	Tailandia	Caña azúcar
16SrXII	16SrXII-A	Stolbur	Italia, España	Chile, tomate
(Grupo del Stolbur)	16SrXII-B	Amarillamiento de la vid Australiana	Australia	Vid
16SrXIII	16SrXIII-A	Virescencia mexicana de la vinca	México	Vinca
16SrXIV	16SrXIV-A	Hoja blanca del pasto Bermuda	Asia, Italia	Pasto

Cuadro 2. Grupos de fitoplasma clasificados mediante análisis de RFLP y secuenciación del gen 16S rRNA.

Grupo de fitoplasma	Acrónimo	Hospedante	Distribución Geográfica
Aster yellows	AY	Amplio	Mundial
Australian grapevine yellows	AUSGY	Vid	Australia
Italian bindweed stolbur	IBS	<i>Convolvulus arvensis</i>	Italia
Stolbur	STOL	Chile, tomate, tabaco, vinca, etc.	Europa
Buckthorn broom	Witch's BWB	<i>Rhamnus catharticus</i>	Alemania
Spartium broom	Witch's SpaWB	<i>Spartium junceum</i>	Italia
Apple proliferation	AP	Manzano	Europa
X-disease	WX	Durazno	E.U.A
Italian alfalfa broom	Witch's IAWB	Alfalfa	Italia
Faba bean phyllody	FBP	Haba	Sudan
Pigeon pea broom	Witch's PPWB	<i>Cajanus cajan</i>	Florida
Cirsium phyllody	CirP	<i>Cirsium arvense</i>	Alemania
Sugarcane white leaf	SCWL	Caña de azúcar	Tailandia
Bermuda grass white leaf	BGWL	Pasto	Tailandia e Italia
Tanzanian decline	Letal TLD	Palma de coco	Tanzania y Kenia
Letal yellowing	LY	Palma de coco	E.U.A
Loofah witch's broom	LFWB	<i>Luffa cylindrica</i>	Taiwán
Ash yellows	AshY	Fresno	E.U.A
Clover proliferation	CP	Trébol	Canadá
Elm yellows	EY	Olmo	E.U.A. y Europa

3.3. Mecanismo de acción

Aunque no hay estudios concluyentes sobre el mecanismo de acción de los fitoplasmas, éste se ha asociado con los problemas que le ocasionan al hospedero en su balance hormonal. Numerosos estudios en la década de los 70 y 80's indican que las virescencias y filodias inducidas por los fitoplasmas pueden ser producto de la alteración de los niveles de fitohormonas endógenas del hospedante; sin embargo Smart y Kirpatrick (1996) demostraron que no es así necesariamente, ya que el efecto de la infección del fitoplasma amarillamiento del aster sobre diversos mutantes de *Arabidopsis thaliana* no mostraron cambios sobre el ácido abscísico, auxinas, etileno y giberelinas por lo que concluyeron que los cambios en estas fitohormonas no son responsables de los síntomas (Lee *et al.*, 2000).

Por su parte Chang (1998) al trabajar con el mismo fitoplasma señala que se presenta un deterioro en la función del floema, un nivel bajo de la actividad oxidativa del ácido indol 3-acético, un desbalance en las hormonas del crecimiento, además de inhibición y traslocación de las mismas; pero al trabajar con *Catharanthus roseus* L. encontró que la infección por fitoplasmas reduce el contenido de clorofila provocando un envejecimiento prematuro de hojas y la aparición de virescencia en las flores.

En un estudio realizado a las palmas de coco infectadas con el fitoplasma causante del Amarillamiento Letal, se comprobó que la infección y multiplicación del fitoplasma reduce drásticamente la concentración de azúcar y almidón, lo cual impide el transporte óptimo de azúcares dificultando la respiración de raíces, la absorción de iones, la síntesis de citocininas, la transferencia de electrones provocando los síntomas característicos de la enfermedad y la muerte de la planta (Maust *et al* 2003).

3.4. Sintomatología

Los fitoplasmas se encuentran asociados con enfermedades de aproximadamente 1000 especies de plantas (Andersen *et al.*, 2006). Los síntomas incluyen virescencia (flores verdes o baja pigmentación), filodias (pétalos con apariencia de hojas), esterilidad de flores, proliferación de brotes axilares (escoba de brujas), elongaciones anormales de los internodos, enanismo generalizado, decoloraciones de hojas y raíces, enchinamiento y encopamiento de hojas, apariencia de racimos en las partes terminales del crecimiento de los tallos y declinamientos generalizados (Lee *et al.* 2000). En los tubérculos se observa la producción de brotes muy delgados (ahilados) y necrosis interna (Khurana *et al.* 1988, Cadena *et al.* 2003). Seemüller y colaboradores (1998) señalan que los síntomas son caracterizados por malformaciones florales, aberraciones en el crecimiento y amarillamientos o enrojecimientos de hojas.

Por su parte Lee, *et al.* (1994) señalan que si existe más de un fitoplasma en la misma planta, el fitoplasma secundario puede fortalecer el desarrollo de la enfermedad modificando así la expresión de los síntomas ocasionados por el fitoplasma primario los cuales pueden variar de acuerdo al hospedante.

3.5. Transmisión

3.5.1. Por vectores

La manera más eficiente de transmisión es por insectos que se alimentan de floema (Bressan *et al.*, 2006; Danet, *et al.*, 2003; Lee, *et al.*, 2000; Crosslin, *et al.*, 2006).

Hasta ahora los vectores reconocidos de fitoplasmas son especies de insectos de las familias Cicadellidae, Psyllidae, chicharritas de los géneros *Agallia*, *Agalliopsis*, *Carneocephala*, *Draeculacephala*, *Empoasca*, *Macrolestes*,

etc. No más de 12 especies han sido implicadas en la transmisión de fitoplasmas en papa, aunque más de 130 han sido reconocidas como vectores de éstos fitopatógenos; sin embargo, aún existe mucha confusión acerca de los vectores de los mismos para la papa (Bujanos, *et al.* 2004; Bressan, *et al.*, 2006; Cadena, *et al.*, 2003).

Los fitoplasmas son considerados patógenos transmitidos en forma persistente, por lo tanto requieren de largos periodos de adquisición muy variables. La gran mayoría son adquiridos en 2 o más de 30 días, aunque algunas variantes del amarillamiento del aster pueden ser transmitidos entre 8 y 24 horas (Lee, *et al.*, 1994, 1998; Tsai, 1979).

En todos los casos hasta ahora estudiados, los vectores de fitoplasmas requieren de un periodo de incubación, es decir de un tiempo desde la adquisición hasta la transmisión y éste varía dependiendo del fitoplasma entre 10 y 35 días. Varios estudios han demostrado que los fitoplasmas son propagativos en su vector y pueden inducir cambios benéficos y detrimentales en ellos. Estos organismos pueden persistir en su vector hasta 88 días en algunos casos. Durante este tiempo los insectos pueden transmitir al fitoplasma (Tsai, 1979).

Kawakita *et al.* (2000) demostraron que los fitoplasmas se pueden transmitir a través de los huevecillos y órganos genitales de algunos vectores como *Hishimonoides sellatiformis* (transmisión transovárica) y por órganos genitales y glándulas salivales de *H. sellatus* en el caso del enanismo de la mora. Hay vectores que pueden transmitir varios tipos de fitoplasmas pero también hay especificidad de transmisión de un fitoplasma y un sólo hospedero como los que reporta Danet *et al.* (2003) en el caso de *Cixius wagneri* que es el vector del "Candidatus *Phlomobacter fragariae*" en la fresa; así como el cicadélido que describen Bressan *et al.* (2006) *Euscelidius plebejus* F., que transmite el Flavescence Doreé Phytoplasma causante del amarillamiento en vid.

3.5.2. Por injerto

A través de injerto se puede lograr la transmisión de mollicutes de manera natural como en la enfermedad "Sandal spike" y también se logra de manera artificial, cabe señalar que en ambos casos no es muy eficaz. Cervantes (2005) reportó un porcentaje muy bajo, 5 a 30%, al injertar plantas de *Alstroemeria* y vinca debido a la persistencia y distribución de los fitoplasmas en la planta hospedera. Schneider (1970) pudo transmitir el fitoplasma que ocasiona el decaimiento del peral al injertar raíces. La persistencia de los fitoplasmas obedece a muchos factores, McCoy (1979) señaló que sólo persisten en los tubos cribosos funcionales pero no en aquellos que están en degeneración, ya que el fitoplasma ocasiona necrosis en el floema bloqueando el intercambio de la savia infectada del injerto al portainjerto (Seliskar y Wilson, 1981). Hernández (2000) logró la reproducibilidad de síntomas de punta morada en plantas de papa a través de injerto, aunque no todas las plantas manifestaron el total de síntomas de la enfermedad, esto concuerda con los experimentos realizados por García (1996) en la transmisión de fitoplasmas a través de injerto en plantas de papa y cuya eficacia fue del 50 %. Las condiciones ambientales y la compatibilidad son importantes para el injerto por lo que muchas veces no se dan resultados satisfactorios.

3.5.3. Por cúscuta

Este método es comúnmente utilizado para transmitir enfermedades del tipo de amarillamientos, tanto en plantas herbáceas como árboles debido principalmente a que no se requiere compatibilidad y ha sido muy eficaz en distintas investigaciones (Chen *et al.*, 1993; Davis and Lee, 1993). Cervantes (2005) reportó un porcentaje de transmisión de fitoplasma por cúscuta del 60% en plantas de *Alstroemeria* con síntomas de deformación y amarillamiento a plantas sanas de Vinca.

3.6. Detección de Fitoplasmas

3.6.1. Rango de hospederos y sintomatología

Por décadas la clasificación e identificación se basaba principalmente en características biológicas tales como especificidad de transmisión, plantas susceptibles, síntomas etc, pero estas pruebas requieren una labor intensiva, se consume mucho tiempo y puede llevar a identificaciones erróneas (Davis and Lee, 1993). Las enfermedades causadas por organismos parecidos a micoplasmas (MLO), ahora denominados fitoplasmas, se consideraban causadas por virus con características poco usuales hasta 1967, cuando Doi *et al.* (1967) demostraron la presencia de organismos tipo micoplasmas en el floema de plantas infectadas con el enanismo de la mora, escoba de brujas de la papa, amarillamiento del aster o escoba de brujas de "Paulownia". Estos organismos se hallan en las células cribosas del floema y aparentemente en raras ocasiones en células del parénquima floemático de las plantas infectadas.

El hospedero, el síntoma y hasta la distribución geográfica son importantes ya que ha muchos fitoplasmas se les da el nombre tomando en consideración esos aspectos (Seemüller *et al.* 1998), e inclusive una de las primeras clasificaciones de los fitoplasmas se hizo con base la manifestación de síntomas en *Catharanthus roseus* propuesta por Marwits (1990).

3.6.2. Microscopia electrónica y de fluorescencia

La inhabilidad de aislar a los fitoplasmas en medios de cultivo (a excepción de *Spiroplasma citri*) para observarlos se supero un poco con la microscopia electrónica, ya que permite su observación y comparación directa con otros patógenos presentes en el tejido del floema, pero tiene el inconveniente que sólo se puede analizar muy poca cantidad de tejido por lo que esta limitada cuando la población de fitoplasmas es muy baja (Cervantes,

2005); además de no poderlos diferenciar y ubicar en un grupo específico (Ahrens y Seemüller, 1992).

La técnica con el fluorocromo 4,6-diamino-2-phenilindole (DAPI) es una buena prueba histológica para detección de fitoplasmas, sin embargo no es determinante ya que el colorante puede reaccionar con cualquier molécula de DNA localizada intracelularmente (Dale, 1988) esta técnica se basa en la coloración específica de los pares de bases adenina-timina que se encuentran en mayor concentración en los fitoplasmas (Davis *et al.* 1997). El hecho de que no se encuentren distribuidos uniformemente en la planta también es una desventaja para estas técnicas (Lee *et al.* 1995). Pese a ello diversos investigadores han podido reportar gracias a estas técnicas el tamaño y forma de los fitoplasmas como el Amarillamiento de la cebolla "Onion Yellows Phytoplasma" (Oshima *et al.* 2001) y el fitoplasma asociado al amarillamiento de la vid "Flavescence doreé" (Herrera y Madariaga, 2003), entre otros.

3.6.3. Serología

La serología es una alternativa viable en la detección de fitoplasmas. Además de ser rápida, ofrece una sensibilidad alta (1-10 ng/mL). El uso de anticuerpos monoclonales y policlonales han sido útiles para detectar fitoplasmas siempre y cuando se encuentren en título razonable en el hospedante (Kirkpatrick, 1997). Giménez, *et al* (2002) utilizaron anticuerpos monoclonales para detectar al enanismo arbustivo ("Maize Bushy Stunt Phytoplasma") y el achaparramiento ("Corn Stunt Spiroplasma") en maíz con buenos resultados. Por su parte Herrera y Madariaga (2003) lograron confirmar la presencia del fitoplasma causante del amarillamiento de la vid a través del uso de inmunoglobulinas policlonales en combinación con el uso de membranas de nitrocelulosa y la técnica de inmunocaptura-PCR. Chen y Chen (1998) diseñaron anticuerpos monoclonales específicos para el enanismo del maíz (Corn stunt spiroplasma), pero el poco conocimiento de los componentes

antigénicos, especificidad, patogenicidad y capacidad biológica de los spiroplasmas y fitoplasmas fueron limitantes para producir anticuerpos directamente contra estos componentes.

Una de las desventajas de esta técnica es la especificidad de los antisueros, ya que impide la detección de una misma especie de fitoplasma que procede de dos regiones geográficas distantes, por lo que su uso para clasificarlos a nivel de especie es limitado (Kirkpatrick, 1997). Por el contrario Lin y Chen (1986) observaron que un mismo antisuero diseñado contra el fitoplasma de la enfermedad X del oeste (WX-P) reconoce dos tipos de antígenos que inducen el arrosamiento del peral y el que provoca la escoba de bruja del olmo.

3.6.4. Métodos Moleculares

Normalmente los fitoplasmas en las plantas afectadas se presentan en títulos muy bajos y su distribución en el hospedero no es uniforme; por lo que su identificación y clasificación hasta hace pocos años era difícil; pero actualmente las técnicas moleculares han contribuido a solucionar dichos problemas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta muy poderosa ya que permite una detección rápida, sencilla y con un alto nivel de sensibilidad de hasta de 1 pg/ μ L de ácido nucleico extraído de plantas infectadas por fitoplasmas (Levy *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Bertaccini *et al.*, 1996; Gibb *et al.*, 1995). La técnica consiste básicamente en tres pasos: 1) desnaturalización en la cual las hebras de DNA se separan a temperatura de 94°C, 2) alineamiento en la que los iniciadores específicos reconocen secuencias complementarias en las cadenas de DNA en posiciones opuestas (5'-3' y 3'-5') a temperaturas variables que oscilan entre los 30 y 60°C y 3) Extensión de los iniciadores en la que la DNA polimerasa ensambla nucleótidos y se origina la cadena complementaria.

Para la clasificación de los fitoplasmas se usan frecuentemente dos estrategias: los fragmentos de restricción (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, RFLPs), obtenidos de fragmentos de mayor tamaño amplificados con PCR, los cuales se digieren con diferentes enzimas de restricción para generar perfiles que se comparan entre los fitoplasmas en estudio. La segunda estrategia consiste en el análisis molecular del gen 16S rDNA (Figura 5) que es un gen altamente conservado en procariontes (Barros *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1998; Harrinson *et al.*, 2001; Andersen, *et al.*, 2006), este gen se detecta mediante el uso de iniciadores específicos para su reconocimiento. Esta técnica ha sido fundamental ya que ha permitido la caracterización de diversos fitoplasmas en un sin número de cultivos de importancia económica (Almeyda, *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003).

La clonación de DNA de fitoplasmas ha sido ampliamente utilizada, aquí el DNA se somete a una serie de centrifugaciones en gradientes de densidad de cloruro de cesio para aislar una banda rica en adeninas-timinas la cual se clona en un plásmido y se introduce en una bacteria (Kirkpatrick, 1997), o pueden utilizarse diferentes kit y vectores comerciales.

Actualmente se emplean otros marcadores filogenéticos basados en el gen 23S rDNA pero también en el espacio intergénico (ITS) ubicado entre los genes 16S -23S rRNA, ya que en esta región se encuentran algunos contrastes evolutivos. Otras técnicas empleadas son el uso de genes que codifican para proteínas ribosomales y el uso del gen *tuf* que codifica para el factor de elongación el cual esta presente como una copia simple en todos los Mollicutes incluyendo los fitoplasmas, estos genes son muy específicos y pueden ser secuenciados fácilmente (Smart *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 2006).

La más reciente innovación en la detección de fitoplasmas es la PCR cuantitativa en tiempo real (real time PCR), ya que es una técnica ultrasensible (detecta cantidades muy pequeñas de inóculo en la planta), completamente más rápida que los procedimientos de PCR anidada (nested-PCR), reduce

cualquier error de contaminación ya que no necesita abrirse entre la primera ronda y la reacción anidada y elimina la necesidad de analizar los productos de reacción por geles de electroforesis (Crosslin *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2005). Una ventaja de esta técnica es que cuantifica el inóculo, esto no es necesario en fitoplasmas, aunque Chávez y colaboradores (2004) indicaron que muestras negativas por PCR anidado fueron detectadas como positivas en tiempo real debido a la mayor sensibilidad de ésta. Un inconveniente es el alto costo en comparación con la PCR tradicional.

Los RAPDs (Amplificación inespecífica del polimorfismo de DNA) es una técnica que utiliza pequeños iniciadores de oligonucleótidos de secuencias aleatorias (6 a 10 nucleótidos) que usualmente tienen un contenido de GC mayor entre 50-70%, estos iniciadores no contienen secuencias repetidas inversas internas y se pegan a distintos sitios del genoma, la amplificación es exitosa solo si el sitio blanco (en donde se pegó) está localizado en ambas cadenas de DNA molde en polaridad opuesta y a una distancia de 50-6000 bases en promedio. Esta técnica provee marcadores dominantes, los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas. Como ventaja de esta técnica es que no se precisa conocimiento previo del genoma, se necesitan pequeñas cantidades de DNA, son marcadores abundantes en el genoma y se encuentran distribuidos al azar. Como desventajas se tiene la baja reproducibilidad debido a las condiciones de reacción tales como tipo de enzima, tipo de termociclador, reactivos empleados, etc. (Valadez y Kahl, 2000; Torres y Moreno, 2001; Weising, et al 2005).

3.7. Fitoplasmas de la papa

En la papa se han reportado varias enfermedades producidas por fitoplasmas, tales como enrollamiento púrpura del ápice, flavesencia marginal, escoba de brujas, filodia de la papa, punta morada de la papa y "stolbur". Se presentan características comunes entre estas enfermedades como son el

rango de hospederos, síntomas, tipo de vectores (cicádelidos) y eficiencia de transmisión, por lo que se sugiere que todas son causadas por fitoplasmas (Salazar, 1997; Almeyda *et al.*, 2001; Munyaneza *et al.*, 2005).

Un síntoma común de todas estas enfermedades es la clorosis de los folíolos, usualmente a lo largo de los márgenes en las plantas infectadas. El fitoplasma responsable del enrollamiento púrpura del ápice (PTR) causa enrollamiento de la parte basal de los folíolos de las hojas jóvenes del brote y los tubérculos de plantas afectadas usualmente son pequeños y producen brotes ahilados. El agente causal del PTW origina brotes erectos y las hojas se enrollan hacia arriba con el progreso de la enfermedad, la pigmentación púrpura se produce en la base de los folíolos y los tallos se marchitan debido a necrosis del floema, el cual no permite la fluidez de agua. Plantas jóvenes afectadas producen tubérculos aéreos y engrosamiento de los nudos del tallo. Los tubérculos producidos por las plantas infectadas pueden ser flácidos y producen brotes ahilados cuando se rompe la dormancia.

El causante de la escoba de brujas (WB) produce una detención severa del crecimiento de las plantas debido al acortamiento de los entrenudos, y también induce clorosis marginal de los folíolos. Las plantas no producen tubérculos o sólo algunos pequeños con brotes ahilados. El fitoplasma responsable de la filodia de la papa (PP) causa achatamiento de los tallos y el desarrollo de hojas cloróticas con folíolos pequeños, las flores pueden proliferar y producir brotes vegetativos. También se pueden producir tubérculos aéreos. Las plantas afectadas por "stolbur" muestran clorosis y enrollamiento de los folíolos tipo cuchara. Las plantas generalmente se secan y marchitan. Los tubérculos son blandos y pueden desarrollar brotes delgados y ahilados (Salazar, 1997; Crosslin *et al.*, 2006; Munyaneza *et al.* 2005).

3.8. Punta Morada

La "punta morada" de la papa como enfermedad se mencionó por primera vez en México por Cervantes y Rubio en 1963. Cadena la reportó en

1974, en los estados de México, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala, causando fuertes reducciones de rendimiento y calidad del tubérculo de la papa que en frecuentes casos llegó a ser hasta del 95 %. Los síntomas mencionados se caracterizan por una brotación anormal de tallos en tubérculos y la coloración morada en las hojas apicales, asociado con una coloración oscura de la pulpa, lo cual desmerita drásticamente su calidad (Cadena, 1974; Cadena *et al.*, 2003). El agente causal es un fitoplasma que ha sido asociado al grupo I del *Wester aster yellow*. Estudios recientes concluyeron que los síntomas de Punta Morada y Brote de Hilo son causados por diferentes fitoplasmas, basándose en el análisis de la secuencia del gen 16S ribosomal, que al ser comparadas con otras secuencias de este grupo de patógenos en el banco de datos, fue posible asociar a la "punta morada" con el *Wester aster yellows* del Grupo I, y a "bola de hilo" con fitoplasmas del Grupo II, de la clasificación internacional de fitoplasmas (Leyva *et al.*, 2002; Leyva y Martínez, 2003). En México hasta esos años, no existían estudios sobre el agente causal y el vector de esta enfermedad, sólo por sintomatología, se le relacionaba con la "punta morada" reportada en EU (Almeyda, *et al.*, 2001).

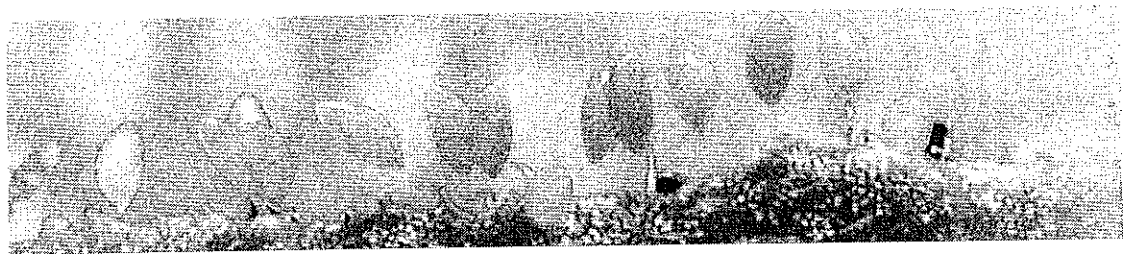
El síndrome punta morada ocupa el primer lugar en importancia en México, es transmitida por insectos del orden Homóptera (chicharritas) y Psílidos como *Bactericera cockerelli* (Figura 2) que se presenta en las principales zonas productoras de papa de México (Bujanos *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2003). En conjunto estos agentes reducen el rendimiento (30 a 95%), la calidad comercial y la utilización del tubérculo como semilla. Los síntomas en follaje son disminución en el crecimiento (Figura 3 A y B), enrollamiento apical y coloración purpúrea en los folíolos (Figura 3 C y D), mientras que los tubérculos presentan diversos grados de pardeamiento en la parte interna, así como brotación anormal (Figura 3 E y F), la cual al sembrarse producen plantas débiles o no brotan (Almeyda, 2001, Cadena *et al.*, 2003; Crosslin *et al.*, 2006).

En forma artificial sólo puede ser transmitida por injerto. La enfermedad es endémica en las zonas áridas y semiáridas que se encuentran generalmente

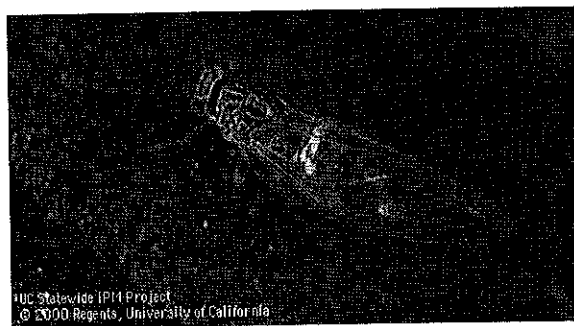
a alturas superiores a los mil metros sobre el nivel del mar. Las poblaciones iniciales adquieren el fitoplasma en hospedantes silvestres y puede entonces ser transmitido a la descendencia en forma transovárica. El insecto necesita para poder adquirir el fitoplasma, períodos de alimentación en el floema de las plantas enfermas de cuando menos una hora. Tanto los adultos (Figura 2 B) como las ninfas (Figura 2 C) son capaces de adquirir el patógeno, éste no se pierde durante la muda. Una vez adquirido lo retiene durante toda la vida útil como vector. El fitoplasma tiene la capacidad de multiplicarse tanto en las células del insecto (tejido graso y glándulas salivales) como en las células de los tejidos vasculares de la planta (floema). A partir de los puntos de infección el fitoplasma se distribuye en la planta vía los tejidos del floema pudiendo llegar hasta los tubérculos (Salazar, 2002; Cadena *et al.*, 2003; Almeyda *et al.*, 2001; Leyva *et al.*, 2002)

Las investigaciones sobre el papel de *B. cockerelli* en la transmisión de este fitoplasma determinaron que el insecto puede transmitirlo en un tiempo de 15 minutos después de su adquisición y es la forma de transmisión más eficiente, ya que este no se transmitió mecánicamente, por contacto, o por semilla (López, 2002; Garzón, 2002).

Dada la importancia del problema, es indispensable buscar variedades de papa resistentes, aunque los reportes señalan que sólo las especies silvestres exhiben esta característica, pero desafortunadamente no tienen valor comercial (Cadena, 1993).



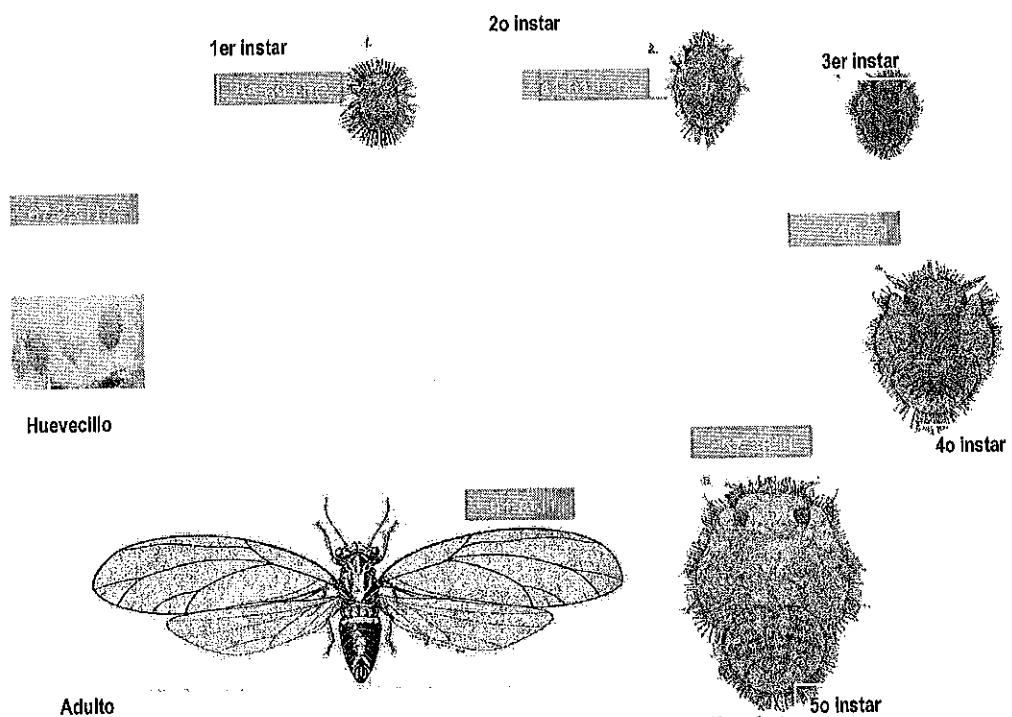
A



B



C



D

Figura 2. Morfología y ciclo de vida del psílido *Bactericera cockerelli*. A, huevecillos amarillos, alargados con un pedicelo claro. B, ninfas de diferentes instares. C, adulto desarrollado, alado y D, ciclo de vida.

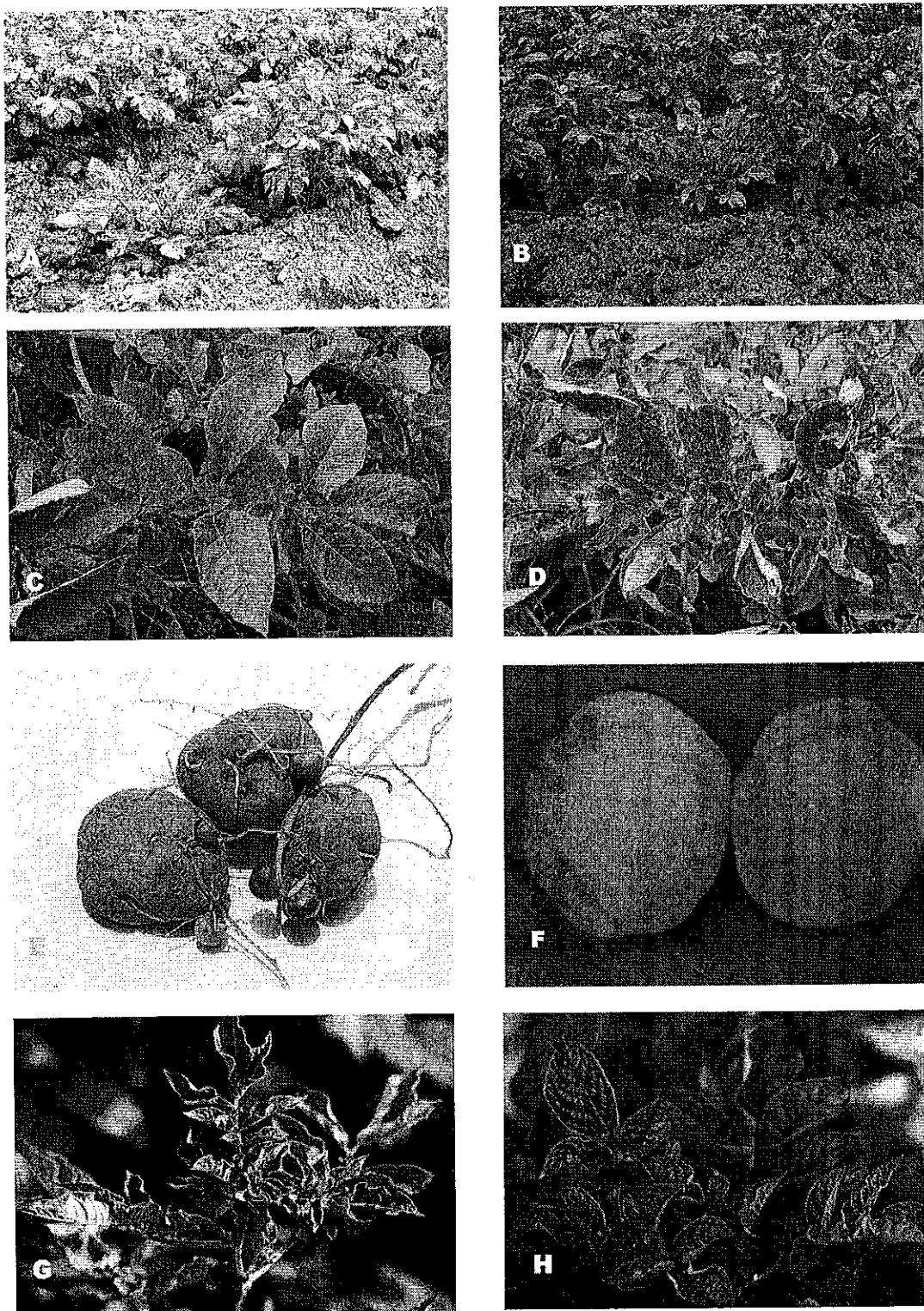


Figura 3. Sintomatología observada en papa. A y B, achaparramiento y falta de desarrollo de la planta en general. C y D, pigmentación púrpura en las hojas apicales, D enrollamiento de folíolos. E, brotes delgados, ahilados y F, pardeamiento interno del tubérculo. G y H, enrollamiento de folíolos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. A) Detección y caracterización de fitoplasmas, con marcadores de DNA, asociados a la punta morada presente en clones de papa

4.1.1. Material Vegetal

Durante el ciclo de cultivo del 2005 se colectaron follaje y tubérculos (Figura 4 A y B) de plantas de papa aparentemente sanas, enfermas (Figura 4 H) y aquellos clones que no manifestaron síntomas y/o presentaron cierta tolerancia al fitoplasma (en la apariencia), en el campo experimental del PICTIPAPA en el Valle de Toluca (Figura 4 C-G; Cuadro 3)

Se realizó la inducción de brotes en los tubérculos que no presentaron esta estructura, colocándolos por 10 min en solución de ácido giberélico 10 ppm y se incubaron en oscuridad a temperatura de 28 °C hasta la brotación.

Cuadro 3. Clones de papa que mostraron cierta tolerancia a la punta morada en el campo experimental del PICTIPAPA.

Clave clon PICTIPAPA USDA	Clave en geles utilizada en investigación	Año	Procedencia	Fenotipo a fitoplasma	Progenitores
LB 9-21	Clon 9	2°	USDA/ARS	Asintomático	
LB 4-36	Clon 8	2°	PROSSER	Asintomático	
LB 11-10	Clon 7	2°	WA, USA	Asintomático	
LB 99	Clon 12	2°		Asintomático	
LB 27-25	Clon 18	2°		Asintomático	
A02327-6	Clon 10	2°	USDA/ARS	Asintomático	A97011-2LB X A096893-3
A02327-5	Clon 4	2°	ABERDEEN,	Asintomático	A97011-2LB X A096893-3
A02327-66	Clon 6	2°	IO USA	Asintomático	A97011-2LB X A096893-3
A00419-68	Clon 2	2°		Asintomático	A96764-19 X Stirling
A00419-40	Clon 13	2°	USDA/ARS	Asintomático	A96764-19 X Stirling
A00419-73	Clon 15	2°	ABERDEEN,	Asintomático	A96764-19 X Stirling
A02499-46	Clon 14	4°	IO USA	Asintomático	B0767-2 X Lugovskoy
A00499-38	Clon 11	4°		Asintomático	Bol 575045 X PI 583331
A00535-2	Clon 3	3°	USDA/ARS	Asintomático	77-69-43 X A96764-19
A02 497-1	Clon 1	2°	ABERDEEN,	Asintomático	B0767-2 X A096 893-3
A02 497-51	Clon 5	2°	IO USA	Asintomático	B0767-2 X A096 893-3
A01 237-62	Clon 16	3°		Asintomático	A9505-2 X A096 893-3
A01 237-14	Clon 17	3°	Campo	Asintomático	A9505-2 X A096 893-3
Alfa	Testigo +		experimental	Sintomático	

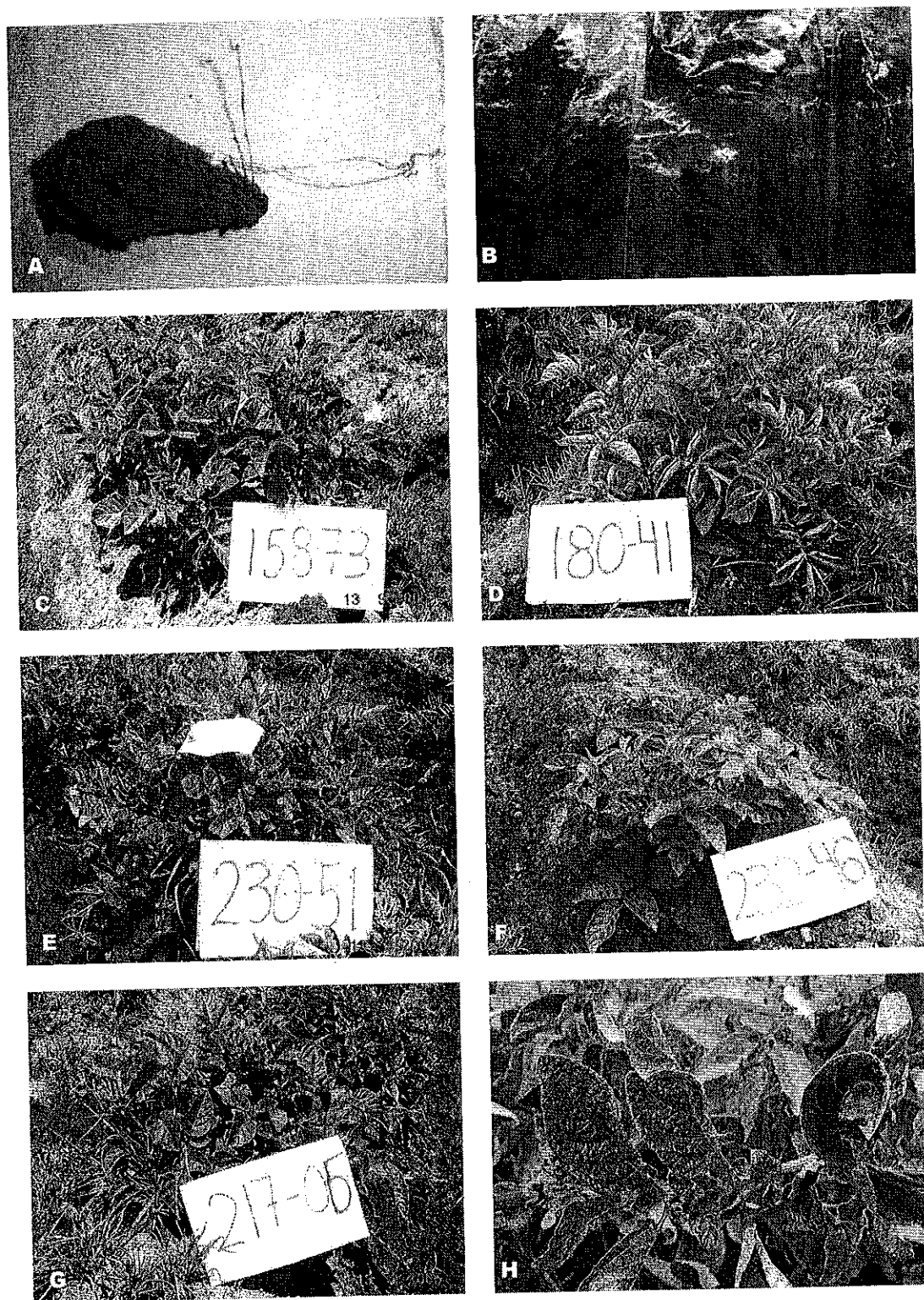


Figura 4. Muestras tomadas en el campo experimental. A, tubérculo con brote ahilado. B, muestras etiquetados. C-G, apariencia de clones en el campo y H muestra enferma usada como testigo positivo.

4.1.2. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA del material vegetal se consideró follaje (Figura 6 A) y brotes, se utilizó el método de Neal Stewart Jr & Laura Evia, 1993 con algunas modificaciones que se señalan más adelante, se maceraron en un mortero estéril y congelado 0.3 g de tejido desinfectado (Figura 6 B) al cual se le adicionó nitrógeno líquido (Figura 6 C). Una vez pulverizada la muestra se colocó en un tubo eppendorf que contenía 700 μ L del amortiguador de extracción (bromuro de cetildimetiletilamonio 2%, polivinilpirrolidona 2%, NaCl 1.42 M, EDTA 20 mM, Tris-HCL pH 8 10 mM y 2- β -mercaptoetanol 0.4%) Figura 6 D. Se homogenizó e incubó a 65°C durante 10 minutos en baño maría, posteriormente se adicionaron 600 μ L de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1).

Las fases se separaron por centrifugación a 5000 xg por 10 minutos (Figura 6 E); se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionó enzima ribonucleasa A 100 μ g/mL (ROTH) incubándose 30 min a 37°C en un horno de temperatura controlada (LAB LINE). Se adicionó 700 μ L de isopropanol frío y se dejó en reposo durante 1 hora a -20°C (Figura 6 F), después se centrifugó a 12,000 xg durante 20 min, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ L etanol al 70% para lavar la pastilla, centrifugándose nuevamente a la misma velocidad durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 μ L de agua HPLC estéril.

Para la extracción de DNA se usó ácido ascórbico 5 mM, metabisulfito de sodio al 1% y RNAasa 100 μ g/mL.

La calidad y cantidad de DNA obtenido se determinó en un espectrofotómetro (Lambda Bio 12 Perkin Elmer) a lecturas de 260 y 280 nm (Figura 6 G) además se verificó la integridad del DNA a través de cargar 4 μ L de DNA en cada pozo de geles de agarosa al 0.8% (Figura 6 H), dejándose correr aproximadamente una hora a 90 volts, teñidos posteriormente con bromuro de etidio 0.5 μ g/mL, visualizándose en una lámpara de luz ultravioleta.

4.1.3. PCR-directa

Con la finalidad de detectar presencia de fitoplasmas en las muestras seleccionadas se utilizaron los iniciadores P1/ P7, R16F2/P7, R16F2/Ayint y P3/P7 (Cuadro 4). Las condiciones para la PCR fueron: 100 ng/ μ L DNA de las muestras, 20 picomoles de cada iniciador, 200 μ M de dNTP's, 2mM de $MgCl_2$, 1X de buffer Taq y 1U de enzima Taq polimerasa (Promega) (Figura 6 J), ajustándose a un volumen final de 25 μ l con agua libre de nucleasas estéril.

Los testigos fueron DNA de hoja de papa sana variedad alfa como testigo negativo y DNA de palma de coco infectado con Amarillamiento Letal proporcionado por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SAGARPA como testigo positivo.

Las muestras se amplificaron en un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con el siguiente programa: un ciclo de temperatura inicial de desnaturalización 94°C durante 2 min; seguido de 35 ciclos de temperatura de desnaturalización de 94°C durante 1 min, temperatura de alineamiento de 56 °C durante 2 min, temperatura de polimerización de 72°C durante 3 min, con un ciclo final de temperatura de extensión de 72°C durante 7 minutos (Figura 6 I). Además se probaron 2 temperaturas de alineamiento adicionales: 54 y 60°C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.2% (Figura 6 K) a un voltaje de 90 volts durante 40 minutos, transcurrido ese tiempo fueron teñidos en solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/mL y se fotodocumentaron en un equipo KODAK Digital Science (Figura 6 L). Se uso un marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas) para poder comparar las bandas obtenidas.

4.1.4. PCR-anidada

A partir de los productos de la primera amplificación se realizó la PCR anidada, para esto los productos obtenidos de la PCR directa se diluyeron 1:10

y 1:30 con agua libre de nucleasas, pero además se utilizaron también sin diluir como DNA molde para la segunda amplificación con las condiciones anteriormente descritas para la PCR-directa, sólo que utilizando los pares de iniciadores R16mF2/R16mR1, R16F2/R16R2 y R16F2n/R16R2 (Cuadro 4) con volumen final de 25 µL. El programa de termociclaje fue una temperatura inicial de 94°C durante 2 min y 35 ciclos adicionales con el siguiente programa: 1 min de desnaturalización a 94°C; 1 min de alineamiento a 56°C; 1 min y 30 segundos de polimerización a 72 °C, posteriormente una fase de extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Los productos se observaron en geles de agarosa 1.2% a una corriente de 90 volts durante 40 minutos y fueron teñidos bajo las mismas condiciones antes señaladas.

Cuadro 4. Iniciadores utilizados en la PCR directa y PCR anidada, ubicación en los genes 16S, 23S rRNA y la Región intergénica (RI).

Iniciador	Ubicación	Secuencia de nucleótidos	Referencia
P1 *	16S	5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT-3'	Deng y Hikuri, 1991
P7 *	23S	5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	
P3 *	16S	5'- GGA TGG ATC ACC TCC TT-3'	Smart et al., 1996
R16 F2 **	16S	5'-ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3'	Smart et al., 1996
R16 R2 **	16S	5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'	Smart et al., 1996
Ayint ***	RI	5'- TAC AAT TTG CAA GCA AGT TAC-3'	Lee et al., 1998
R16F2n *	16S	5'- GAA ACG ACT AAG ACT GG-3'	Smart et al., 1996
R2 *	16S	5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA CCC G	Lee et al., 1993
R16mF2**	16S	5'- CAT GCA AGT CGA ACG GA-3'	Lee et al., 1993
R16mR1**	16S	5'- CTT AAC CCC AAT CAT CGA C-3'	Lee et al., 1998
			Lee et al., 1998

* Iniciadores sintetizados en Sigma Co.

** Iniciadores sintetizados por Invitrogen

*** Iniciadores sintetizados por Gibco BRL

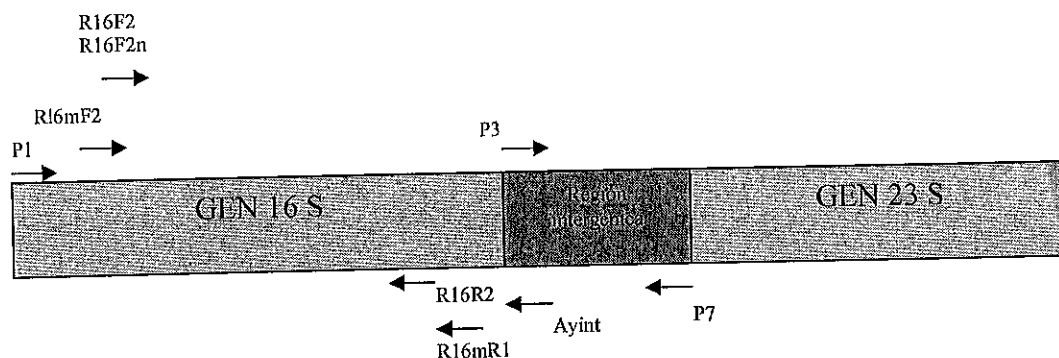


Figura 5. Representación esquemática de la ubicación de los iniciadores empleados en los genes 16S y 23S que codifican para el RNA ribosomal y el espacio intergénico.

Cuadro 5. Pares de bases esperadas por cada una de las combinaciones de los iniciadores empleados.

COMBINACIÓN DE INICIADORES	TIPO DE AMPLIFICACIÓN	PM DEL FRAGMENTO ESPERADO
P1/P7	PCR directa	1800 pb
P3/P7	PCR directa	350 pb
R16F2/P7	PCR directa	1200 pb
R16F2/Ayint	PCR directa	900 pb
R16mF2/R16mR1	PCR anidada	1400 pb
R16F2/R16R2	PCR anidada	1200 pb
R16F2n/R16R2	PCR anidada	1200 pb

4.2. Digestión con Enzimas de Restricción

Para caracterizar con RFLP los fragmentos de los fitoplasmas detectados con el par de iniciadores R16F2n/R16R2, en los distintos clones de papa, se digirió el fragmento de 1200 pb obtenido en la PCR anidada con las siguientes enzimas: *Alu* I (Promega), *Eco* RI (Promega), *Kpn* I (Boehringer Mannheim), *Hinf* I (Promega), *Tru* 9 (Promega), *Taq* I (Boehringer Mannheim) conforme a las especificaciones del proveedor. La concentración de DNA que se utilizó fue de 1000 ng en un volumen final de reacción de 20 µL.

El producto de digestión se visualizó en geles de acrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata para lo cual se siguió el siguiente procedimiento: se sumergió el gel durante 8 minutos en solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 1%), se enjuagó con agua destilada estéril y se colocó en solución de tinción (nitrato de plata 0.2%) durante 5 minutos; posteriormente se colocó en solución reveladora (hidróxido de sodio al 3%) y se añadieron 500 µL de formaldehído por cada 500 mL de solución, se mantuvo en agitación hasta la presencia de bandas, una vez concluido esto se colocó en una solución para detener la reacción (EDTA 3%, TBE 5x) (Sambrook, *et al.*, 1989). En los geles se incluyeron los marcadores de peso molecular de 50 pb (Promega), 100 pb (Fermentas) y 1 kb (Fermentas) con la finalidad de estimar el peso molecular de los fragmentos de digestión obtenidos.

Con los patrones de restricción se elaboró una matriz de datos considerando la presencia de bandas como 1 y la ausencia como 0. El análisis de disimilaridad se realizó utilizando el análisis factorial por correspondencias simple (Rohlf, 2002) Se emplearon matrices de similaridad, generadas con el coeficiente de Jaccard (Sneth and Sokal, 1973) para llevar a cabo el análisis de agrupamiento usando el (UPGMA) con el programa NTSYSpc2.2, indicando con dendrogramas la similaridad estimada entre las especies utilizadas.

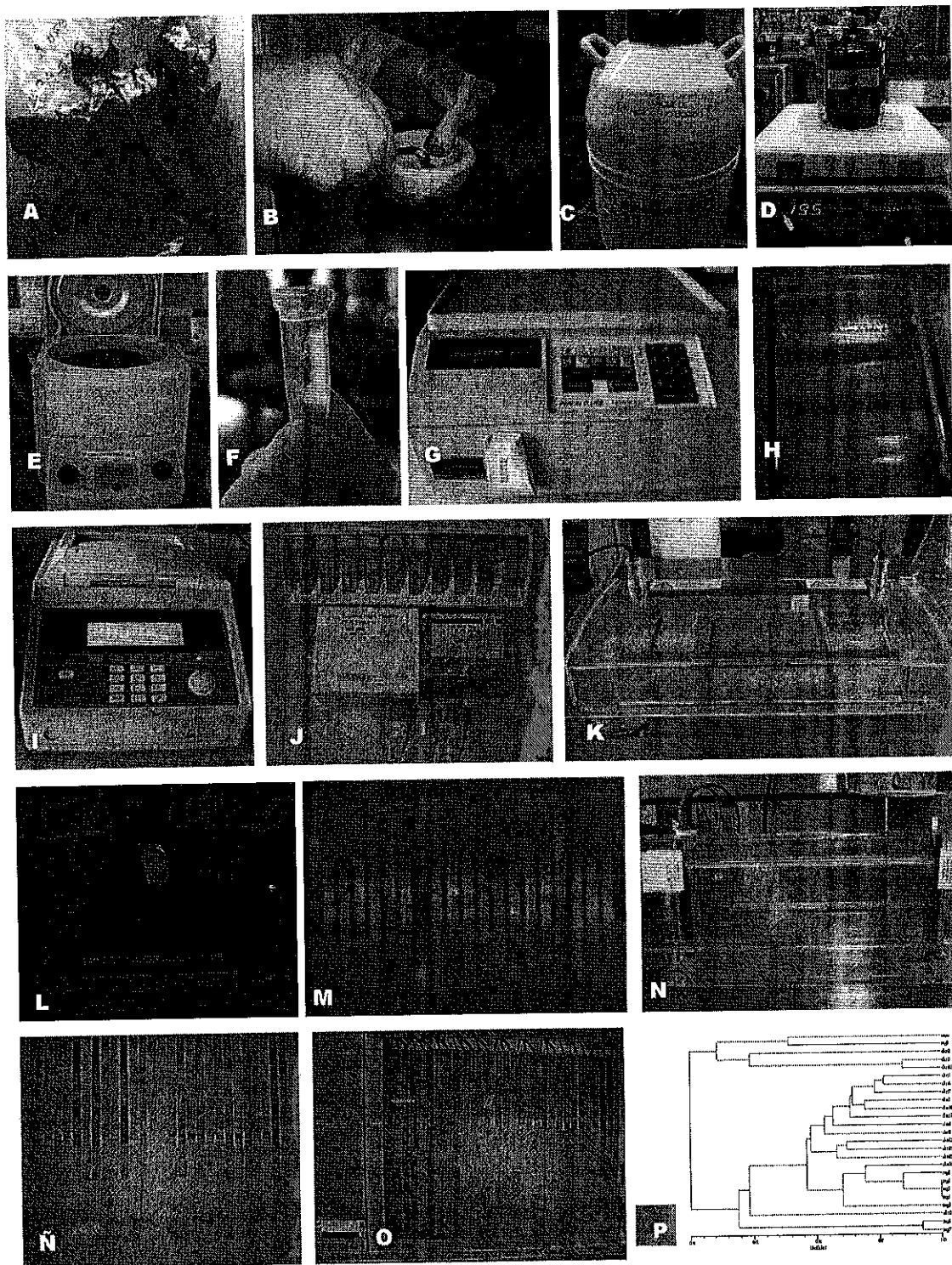


Figura 6. Etapas del método empleado desde la extracción de ADN seguido de la amplificación y visualización de los productos amplificados en geles de agarosa y acrilamida, así como su respectiva interpretación.

4.3. B) Genotipificación de plantas de papas tolerantes y susceptibles a fitoplasmas asociados.

4.3.1. Material vegetal

Durante el ciclo de cultivo del 2005 se colectó follaje de plantas de papa aparentemente sanas, plantas enfermas que correspondieron a aquellas con claros síntomas de punta morada y aquellos clones que no manifestaron síntomas pero que coincidieron en tiempo y espacio con plantas enfermas o sintomáticas, en el campo experimental del PICTIPAPA en el Valle de Toluca, además se consideraron algunas plantas asintomáticas en Amecameca (Cuadro 6) como testigos negativos con el fin de ampliar la probabilidad de tener plantas sanas.

Cuadro No. 6. Clones de papa que mostraron cierta tolerancia a la punta morada en el campo experimental del PICTIPAPA.

Clave clon	Clave en geles	Procedencia	Progenitores
LB 9-21	Clon 13	USDA/ARS	
LB 4-36	Clon 16	PROSSER WA,	
LB 11-10	Clon 15	USA	
LB 99	Clon 14		
A02327-6	Clon 10	USDA/ARS	A97011-2LB X A096893-3
A02327-5	Clon 4	ABERDEEN, IO	A97011-2LB X A096893-3
A02327-66	Clon 6	USA	A97011-2LB X A096893-3
A00419-40	Clon 8		A96764-19 X Stirling
A00419-68	Clon 2	USDA/ARS	A96764-19 X Stirling
A00419-73	Clon 11	ABERDEEN, IO	A96764-19 X Stirling
A02499-46	Clon 12	USA	B0767-2 X Lugovskoy
A00499-38	Clon 9		Bol 575045 X PI 583331
A00535-2	Clon 1	USDA/ARS	77-69-44 X A96764-19
A02 497-1	Clon 7	ABERDEEN, IO	B0767-2 X A096 893-3
A02 497-51	Clon 5	USA	B0767-2 X A096 893-3
A01 237-62	Clon 3		A9505-2 X A096 893-3
Testigo +	positivo	PICTIPAPA	
Testigos -	Negativo 1- 8	AMECAMECA	

4.3.2. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA del material vegetal que consistió en follaje y brotes se utilizó el método de Neal Stewart Jr & Laura Evia (1993) con algunas modificaciones en el buffer de extracción, el cual se suplemento con metabisulfito de sodio al 1% y ácido ascórbico 20 mM. De cada muestra se maceraron en un mortero estéril y congelado 0.3 g de tejido desinfectado, al cual se le adicionó nitrógeno líquido. Una vez pulverizada la muestra, ésta se colocó en un tubo eppendorf que contenía el amortiguador de extracción (bromuro de cetildimetiletilamonio 2%, polivinilpirrolidona 2%, NaCl 1.42 M, EDTA 20 mM, Tris-HCL pH 8 10 mM y 2-β-mercaptoetanol 0.4%), se homogenizó e incubó a una temperatura de 65°C durante 10 minutos en un baño maría, posteriormente se adicionaron 600 µL de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1).

Las fases se separaron por centrifugación a 5000 xg por 10 minutos; se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adiciono enzima ribonucleasa A 100 µg/mL (ROTH) incubándose 30 min a 37°C en un horno de temperatura controlada (LAB LINE). Se adicionó 700 µL de isopropanol frío y se dejó en reposo durante 1 h a -20°C, después se centrifugó a 12,000 xg durante 20 min, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL etanol al 70% para lavar la pastilla, centrifugándose nuevamente a la misma velocidad durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua para PCR estéril.

4.3.3. PCR-RAPDS

Para realizar la amplificación inespecífica del polimorfismo de DNA (RAPDs), se usaron algunos iniciadores de tres series (serie C, G, K ROTH): seleccionando finalmente: Serie C (iniciador C-09, iniciador C-12); Serie G

(iniciador G-02, iniciador G-10) y la serie K (iniciador K-17), la secuencia de bases de los iniciadores se describe en el cuadro 7.

Para la reacción se utilizaron 20 pMoles de iniciador, 100 ng de DNA y el Kit Taq PCR Core (Quiagen, Germany) usando 1.5 Unidades de la enzima Taq polimerasa, 200µM de dNTPs, 25 mM de MgCL₂, amortiguador para enzima a una concentración 1X y 5 µL de solución Q; todo ello se llevo a un volumen final de reacción de 25 µL. Se adicionó una gota de aceite mineral estéril a cada uno de los tubos y se colocaron en un termociclador (9700 Perkin Elmer) con el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C durante 1 minuto; seguido de 35 ciclos de 94°C de temperatura de desnaturalización durante 30 segundos, 40°C de alineamiento durante 30 segundos y 72°C de temperatura de extensión durante 1 minuto 30 segundos; por último una extensión final de un ciclo de 72°C durante 2 minutos 30 segundos.

Se visualizaron los productos de amplificación en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/mL) en un transiluminador UV y en geles al 8% de acrilamida (29:1 Acrilamida: bisacrilamida) teñidos con nitrato de plata para lo cual se siguió el siguiente procedimiento: se sumergió el gel durante 8 minutos en solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 1%), se enjuagó con agua destilada estéril y se colocó en solución de tinción (nitrato de plata 0.2%) durante 5 minutos, posteriormente se colocó en solución reveladora (hidróxido de sodio al 3%) y se añadieron 500 µL de formaldehído por cada 500 mL de solución, se mantuvo en agitación hasta la aparición de bandas, una vez concluido esto se colocó en una solución para detener la reacción (EDTA 3%, TBE 5x) (Sambrook, *et al.*, 1989).

Cuadro 7. Iniciadores utilizados para RAPDs y su secuencia.

Iniciador	Serie	Secuencia
C-09	C ROTH	5'- CTC ACC GTC C-3'
C-12	C ROTH	5'- TGT CAT CCC C-3'
G-02	G ROTH	5'- GGC ACT GAG G-3'
G-12	G ROTH	5'- AGG GCC GTC T-3'
K-17	K ROTH	5'- CCC AGC TGT G-3'

4.3.4 Análisis de datos

El patrón de bandas generado en los geles de acrilamida se codificó otorgándole el valor de 1 a la presencia de banda y 0 a la ausencia de banda, con esos datos se construyó la matriz binaria por cada uno de los iniciadores empleados y una matriz binaria total abarcando todos los iniciadores utilizados.

Una vez obtenida la matriz binaria se elaboró un dendrograma, basado en los resultados obtenidos de los RAPD; para lo cual, los datos fueron sometidos a un análisis multivariado de taxonomía numérica mediante la técnica del análisis factorial por correspondencia simple (Rohlf, 2002). El objetivo primario de este tipo de análisis fue agrupar las bandas obtenidas en un grupo pequeño de variables sin perder su variabilidad original (Johnson, 2000). El interés de los análisis multivariados es encontrar relaciones entre las variables respuestas y las unidades experimentales. Para el caso de nuestra investigación, este análisis se realizó utilizando el coeficiente de similitud Jaccard (Sneth and Sokal, 1973) para generar una matriz de similitud. Los agrupamientos se realizaron usando el Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) con el programa NTSYSpc2.2, indicando con dendrogramas la similaridad estimada entre los clones de papa estudiados.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. A) Detección y caracterización de fitoplasmas, con marcadores de DNA, asociados a la punta morada presente en clones de papa.

5.1.1. Extracción de ADN

Con las modificaciones al amortiguador de extracción y el uso de RNAasa se observó una mejor calidad de DNA reflejándose en bandas compactas y definidas en la mayoría de las muestras (Figura 7 B) analizadas en geles de agarosa (0.8%), en contraste con el protocolo de extracción sin modificar (Figura 7 A). El incremento en la calidad se debió a que al adicionar una sal más (metabisulfito de sodio) se ayuda a la disociación de las proteínas nucleares y polisacáridos durante la precipitación con alcohol; por su parte el ácido ascórbico actúo como agente reductor, ambos casos respaldan lo señalado por Weising *et al.* (2005) en donde explican que al aumentar una sal se incrementa la disociación de histonas, específicamente y que el ácido ascórbico es un agente reductor que inhibe los procesos de oxidación, los cuales interfieren directa o indirectamente en el deterioro del ADN.

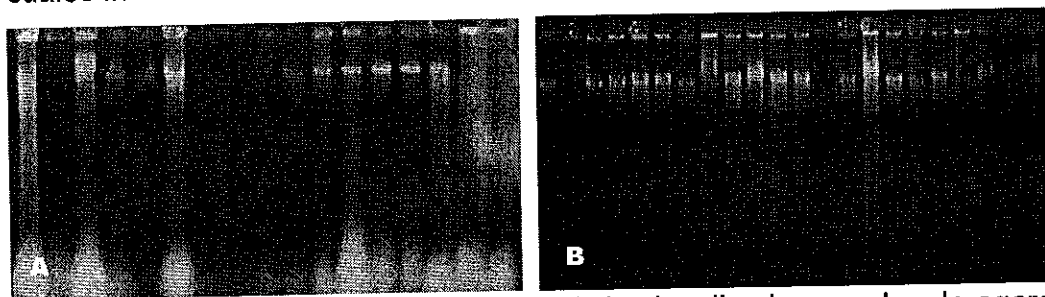


Figura 7. Calidad de DNA extraído de follaje visualizado en geles de agarosa al 0.8%. A: método original y B: con las modificaciones realizadas.

5.1.2. Análisis por PCR directa

La detección de fitoplasmas de manera directa con los iniciadores P1/P7 (Cuadro No. 8) no mostró ningún dato, ya que no se detectó o no se visualizó ningún fragmento. En lo que se refiere al par de iniciadores R16F2/P7 (Figura 8) se logró amplificar un fragmento de 1,400 pb que corresponde al gen 16S rDNA casi completo reportado por Lee *et al.* (1993), pero no se obtuvo en todas las

muestras de follaje, solamente en las muestras 1, 3, 5, 9, 10, 12, 13-19 y 20 (testigo positivo de coco con ALC); pero también en las mismas muestras se detectaron otras amplificaciones que se consideran como “inespecíficas” y que consistieron en una banda muy marcada de 900 pb y otra de 750 pb, las cuales no se corrigieron con las diferentes temperaturas de alineamiento que se evaluaron (54°C, 56°C y 60°C). Considerando la distribución de las bandas inespecíficas y la posición de las mismas en el gel, las muestras 17, 19 y 20 se distinguen del resto porque se presentan sólo dos fragmentos bien definidos, el esperado y otro de menor tamaño a diferencia de las otras muestras que presentaron más bandas inespecíficas de pesos moleculares distintos. Esta situación refiere Almeyda (2001) que se puede deber a dos razones, la primera que el par de iniciadores pueden ser inestable por la alta ocurrencia de dímeros ocasionando la formación de horquillas en el DNA y la segunda a que los iniciadores se pueden alinear a múltiples sitios en el gen 16S rDNA y en la región intergénica entre los genes 16S y 23S de los fitoplasmas, indicando su posible inespecificidad. Cabe destacar que en las muestras de brote no se detectó amplificación alguna en ninguna de las reacciones de PCR realizadas a excepción del control positivo (ALC).

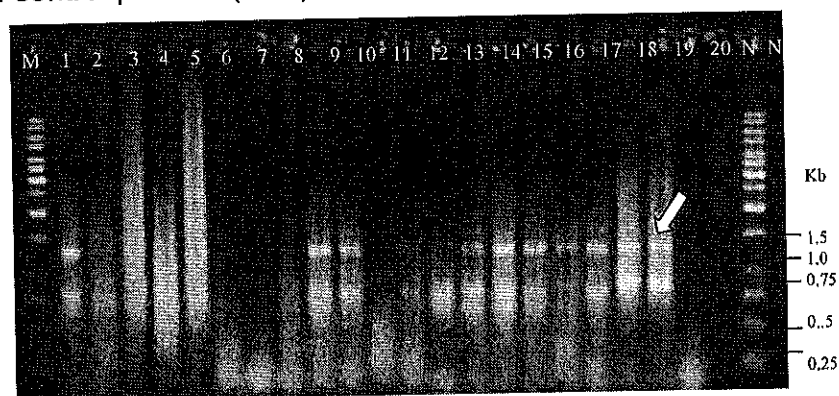


Figura 8. Fragmentos amplificados con R16F2/P7 de 1400 pb (flecha). Carriles 1, 3, 5, 9, 10, 12, 13 al 19: muestras positivas a fitoplasmas de clones de papa. Carriles 2, 4 al 8, 11, 13: muestras negativas de clones de papa. Carril 20: testigo positivo de coco con ALC y Carriles N: testigos negativos de papa sana alfa. M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

Con el par de iniciadores P3/P7 que reconocen a la región intergénica (Figura 5) se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 pb en todas las muestras de follaje (Figura 9). Este par de iniciadores reconocen la región intergénica entre los genes 16S y 23S rDNA, Smart *et al.*, (1996) señalan que no obstante de ser una región muy conservada para los fitoplasmas, presenta también una gran variabilidad, lo que ha sido utilizado para la separación de grupos, tal es el caso de la frutilla Aroria. Se verificó que la reacción fuera correcta con los testigos positivo y negativo.

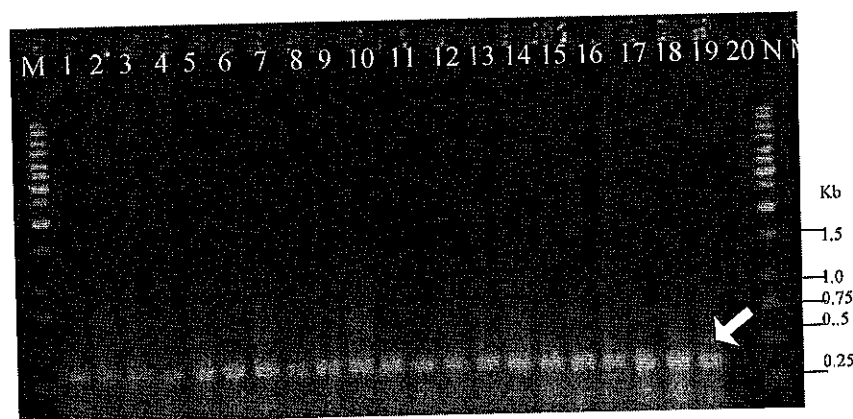


Figura 9. Fragmentos amplificados con P3/P7 de 350 pb (flecha). Carriles 1 al 19: muestras de follaje de clones de papa. Carril 20: testigo positivo de coco con ALC y carril N: testigo negativo de papa sana alfa. M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

Con el par de iniciadores R16F2/Ayint (Figura 10) se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 900 pb en once muestras, observándose bandas inespecíficas de menor peso molecular. Cabe mencionar que el fragmento del testigo positivo fue de menor tamaño con respecto a las muestras de papa, esto puede deberse a que probablemente en el espacio intergénico es donde se finca la diferencia en tamaño entre los fitoplasmas que afectan papa y el que infecta al coco.

Smart *et al.* (1996) señalan que con el par de iniciadores P1/Ayint se detectan fitoplasmas correspondientes al grupo del amarillamiento del áster mediante un fragmento de 1500 pb, pero se optó por sustituir P1 por R16F2, ya

que éste fue un iniciador que en todas las combinaciones empleadas en esta investigación siempre presentó amplificación, por ello es más pequeño el fragmento amplificado. Las muestras 1, 3, 9, 16, 17, 18, 19 presentaron sólo el fragmento esperado, mientras que la muestra 10 y 12 otro fragmento adicional de aproximadamente 700 pb. Por su parte las muestras 14 y 15 presentaron mayor numero de bandas inespecíficas siendo evidente, por la intensidad de la banda, la mayor concentración de DNA la banda de 700 pb en la muestra 15

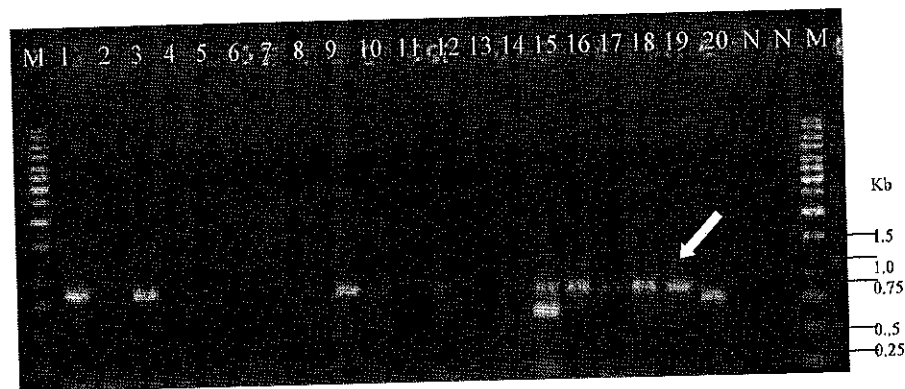


Figura 10. Fragmentos amplificados con R16F2/Ayint de aproximadamente 900 pb. (flecha) Carriles 1, 3, 9, 10, 12, 14 al 19: muestras positivas a fitoplasmas de clones de papa. Carriles 2, 4 al 8, 11, 13: muestras negativas de clones de papa. Carril 20: control positivo de coco con ALC y Carriles N: controles negativos de papa sana alfa. M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

5.1.3. Análisis por PCR-anidada

Para realizar la PCR-anidada se utilizaron los productos amplificados por PCR directa de P1/P7, ya que son iniciadores que bordean todo el gen 16S rDNA hasta el inicio del gen 23S rDNA. Estos iniciadores han sido empleados en diversos trabajos como base para PCR anidado; Crosslin *et al.* (2006) los empleó de esta manera para detectar PPT (Punta morada) en plantas de papa, aunque en esta investigación no se observó ningún fragmento amplificado, se

usaron como base para una dilución 1:30 del producto amplificado, ya que fue la que dio mejores resultados para usarse en la PCR- anidada.

Los iniciadores para la anidada fueron R16mF2/R16mR1 (Figura 11) con los cuales se obtuvieron cuatro muestras positivas con el fragmento esperado de 1400 pb (muestra 2, 6, 8, 10), sin embargo las muestras 1, 3, 9, 10, 12, 15-19 presentaron un fragmento de mayor tamaño, aproximadamente 1500 pb. El testigo positivo (ALC) amplificó el fragmento esperado de 1400 pb como lo refieren Gundersen y Lee (1996) y la cual fue una reacción correcta ya, que el testigo negativo no mostró ninguna tipo de amplificación. Nuevamente se obtuvieron amplificaciones inespecíficas en algunas muestras.

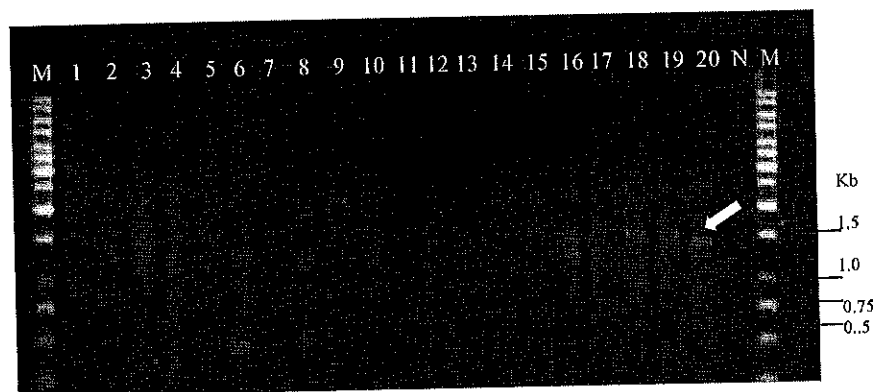


Figura 11. Fragmentos amplificados de 1400 pb (flecha) con PCR-anidada a partir de los iniciadores R16mF2/R16mR1 (Invitrogen). Carriles 1, 3, 6, 9, 10, 12, 14 al 19: muestras positivas a fitoplasmas de clones de papa. Carriles 2, 4 al 8, 11, 13: muestras negativas de clones de papa. Carril 20: control positivo de coco con ALC y Carril N: control negativo de papa sana alfa. M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

Con el par de iniciadores R16F2/R16R2 (Figura 12) se obtuvo amplificación de un fragmento de 1200 pb en nueve muestras, siendo las muestras marcadas con número 15 al 19 muy tenues, por lo que no se alcanza apreciar con claridad en la figura 9; las muestras marcadas con los números 3,

7, 14, 16 al 19 coinciden con las amplificaciones realizadas con los iniciadores utilizados en la PCR directa. Cabe señalar que se presentó la amplificación inespecífica de un fragmento de menor tamaño. La banda del testigo positivo fue ligeramente de mayor tamaño en comparación con las muestras de papa, esto coincide con las amplificaciones con otros iniciadores.

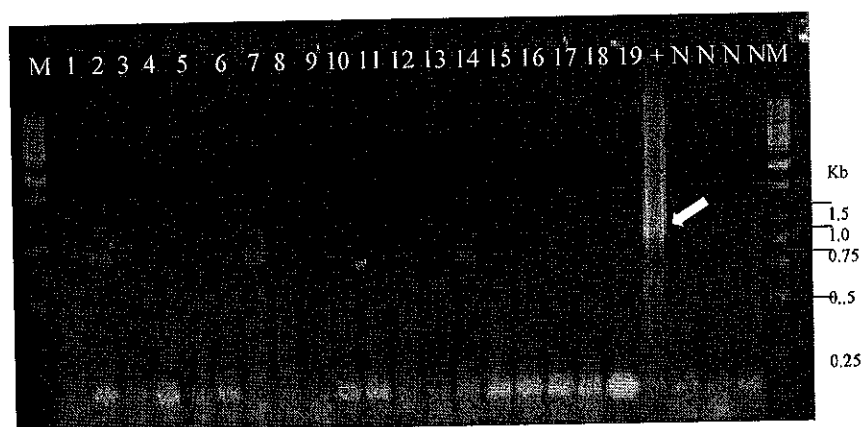


Figura 12. Fragmentos amplificados de 1200 pb (flecha) con PCR-anidada a partir de los iniciadores R16F2/R16R2 (Invitrogen). Carriles 2, 3, 7, 14, 16, 18, 19: muestras positivas a fitoplasmas de clones de papa. Carriles 1, 4 al 6, 8 al 13, 15, 17: muestras negativas de clones de papa. Carril 20: control positivo de coco con ALC y Carriles N: control negativo de papa sana alfa. M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

Con el par de iniciadores R16F2n/R16R2 (Figura 13) se logró la amplificación del fragmento esperado de aproximadamente 1200 pb, en la mayoría de muestras se aprecia la banda definida y gruesa salvo en tres muestras que aunque la banda está presente, es tenue. Este fragmento estuvo acompañado por dos fragmentos bien marcados, uno ligeramente más pequeño y otro de alrededor de 750 pb, aunque se amplificó en diferentes condiciones no se logró desaparecerlas, tal vez debido a lo señalado anteriormente de la posibilidad de inestabilidad o formación de dímeros que no se pueden alinear (Almeyda, *et al.*, 2003). Los iniciadores R16F2n/R16R2 facilitan la detección de

fitoplasmas que se encuentra en bajas concentraciones, debido a que amplifican una región conservada del gen 16S rRNA (Lee *et al.*, 1993), esto queda claramente confirmado al compararlos con los resultados obtenidos con los iniciadores R16mF2/R16mR1 y R16F2/R16R2 también utilizados para el PCR anidado, ya que aunque se amplificaron con la misma dilución a partir de P1/P7, no dieron los mismos resultados.

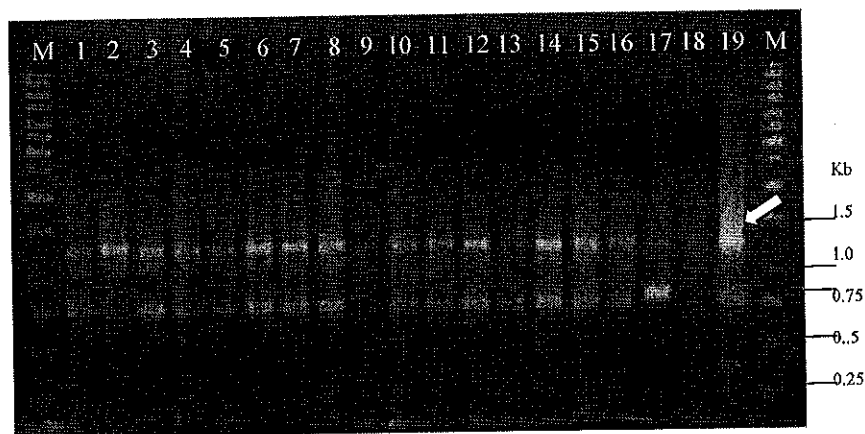


Figura 13. Fragmentos amplificados de 1200 pb (flecha) con PCR-anidada a partir de los iniciadores R16F2n/RI6R2 (Sigma). Carriles 1 al 19 muestras positivas a fitoplasmas de clones de papa. Carril 20: testigo positivo (ALC). M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

En general se logro la amplificación del fragmento esperado que corresponde a un fitoplasma con varios juegos de iniciadores, tanto en PCR directa como en PCR anidada, siendo algunas muestras claramente positivas, ya que se amplificaron con todos los iniciadores evaluados. En el cuadro 8 se aprecia cuales clones son los que podemos considerar como portadores de tal microorganismo. Cabe señalar que en todas las amplificaciones realizadas se presentaron bandas inespecíficas de bandas de menor tamaño que acompañaron al fragmento esperado en cada uno de los casos.

Cuadro No. 8. Amplificaciones obtenidas con los diferentes iniciadores probados

Muestra	PCR Directa				PCR-anidada		
	P1/P7 1800 pb	R16F2/ P7 1400 pb	RI6F2/ Ayint 900 pb	P3/P7 350 pb	RI6mR1/ RI6mR2 1400 pb	R16F2/ RI6R2 1200 pb	RI6F2n/ RI6R2 1200pb
Clon1	-	+	+	+	+	-	+
Clon2	-	-	-	+	-	+	+
Clon3	-	+	+	+	+	+	+
Clon4	-	-	-	+	+	-	+
Clon5	-	+	-	+	+	-	+
Clon6	-	-	-	+	+	-	+
Clon7	-	-	-	+	-	+	+
Clon8	-	-	-	+	-	-	+
Clon9	-	+	+	+	+	-	+
Clon10	-	+	+	+	+	-	+
Clon11	-	-	-	+	-	-	+
Clon12	-	+	+	+	-	-	+
Clon13	-	+	-	+	-	-	+
Clon14	-	+	-	+	+	+	+
Clon15	-	+	+	+	+	-	+
Clon16	-	+	+	+	+	+	+
Clon17	-	+	+	+	+	-	+
Clon18	-	+	+	+	+	+	+
Test+ p	-	+	+	+	+	+	+
Test+c	+	+	+	+	+	+	+
Test -	-	-	-	-	-	-	-

+ Si se presento amplificación del fragmento esperado.

- No se presento amplificación del fragmento esperado.

Test + p Testigo positivo de papa planta alfa enferma con síntomas de punta morada

Test + c Testigo positivo a Amarillamiento Letal del cocotero.

Test - Testigo negativo planta de papa variedad alfa, asintomática.

✦ Muestras que amplificaron con todos los iniciadores empleados.

Con los fragmentos amplificados de las diferentes combinaciones de iniciadores se elaboró una matriz binaria de datos, tras realizar el análisis estadístico correspondiente resultaron 4 grupos de fitoplasmas (A, B, C, D) con un coeficiente de similitud de 0.70 (Figura 14). El grupo A contiene a las muestras que resultaron positivas con el mayor número de iniciadores, quedando dentro de éste los testigos positivos de papa (posp) y ALC en coco (indicar nombre abreviado). Tanto el grupo B como C contienen las muestras que presentaron amplificaciones con menor número de iniciadores y por último el grupo D que sólo contiene al testigo negativo.

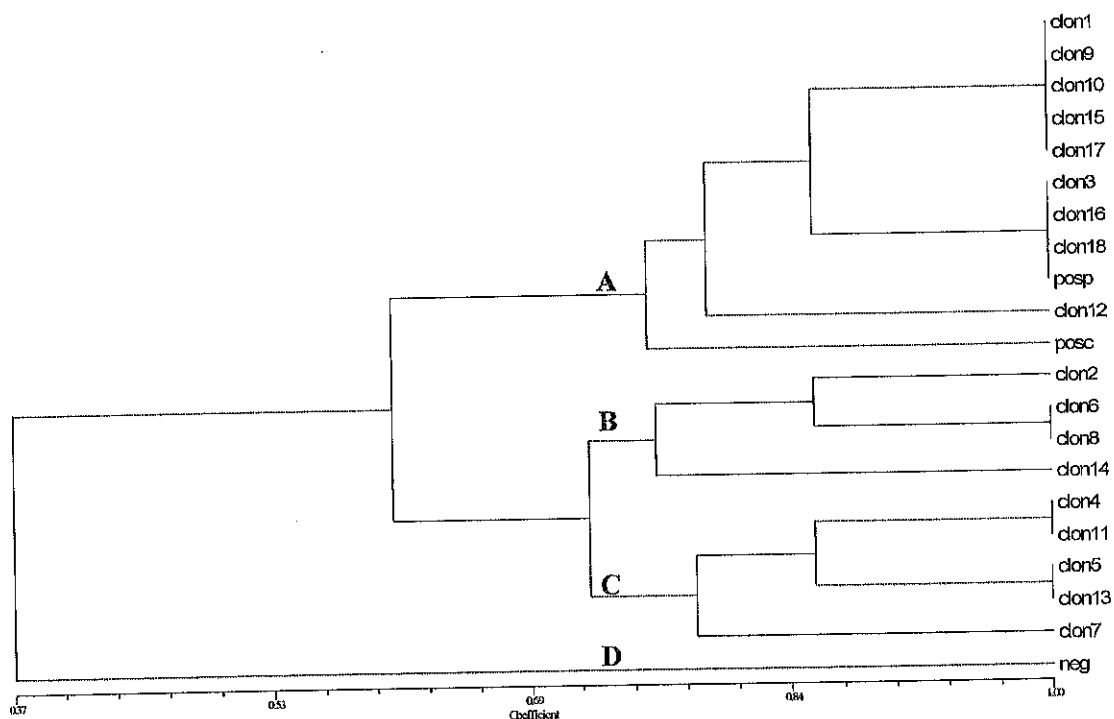


Figura 14. Árbol que representa los grupos de fitoplasmas de acuerdo al análisis estadístico de los fragmentos amplificados con los diferentes iniciadores específicos, construido con el método UPGMA y el coeficiente de similitud Jaccard en el programa estadístico NTSYS 2.2.

5.2. Resultados de la Digestión con Enzimas de Restricción

Los patrones de restricción generados fueron uniformes para casi la mayoría de las muestras tratadas con la enzima *Tru9*. Todas ellas presentaron una banda de 120 pb (figura 14) y una banda de 250 pb en la mayoría, salvo la muestra 1 presentó una banda de mayor tamaño, de aproximadamente 310 pb y la muestra 2 una de 260 pb en comparación a las demás.

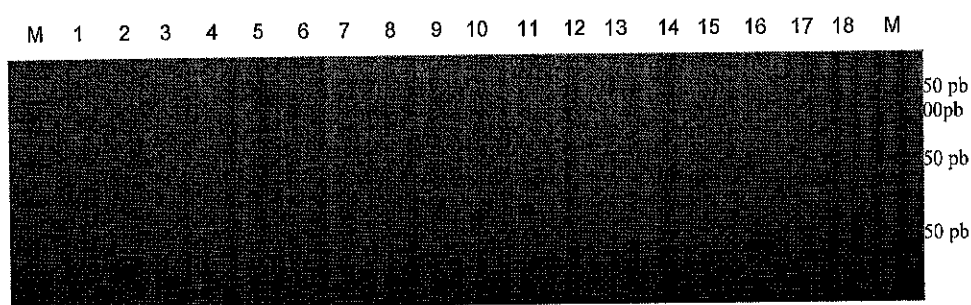


Figura 15. Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con *Tru 9*. Gel 8% acrilamida. M: Marcador de 50pb (Promega) carriles 1 al 19: muestras de papa.

La enzima *Taq I* generó solo una banda de 400 pb aproximadamente, por lo que se asume que no hubo digestión del ADN, aunque esto se repitió algunas veces, siempre se obtuvo lo mismo.

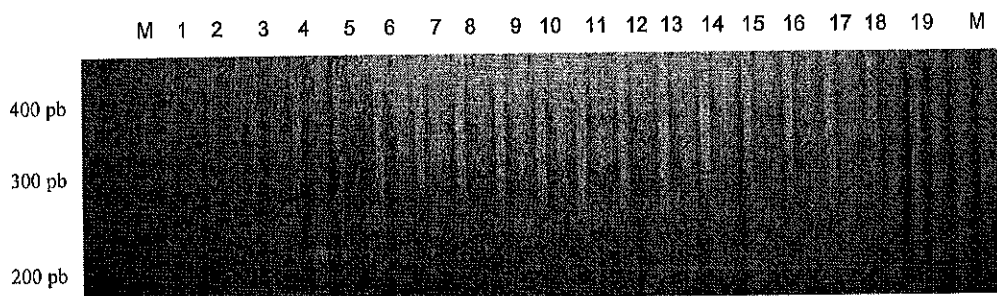


Figura 16. Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con *Taq I*. Gel 8% acrilamida. M: Marcador de 50pb (Promega) carriles 1 al 19: muestras de papa.

La enzima *Hinf* I generó tres bandas en las muestras 3, 4, 5 y 7 una de 600 pb, otra de 280 pb presente en la mayoría, excepto en la muestra 8 y la tercera banda de 320 pb también presente en la mayoría salvo en las muestras 1, 8 y 10.

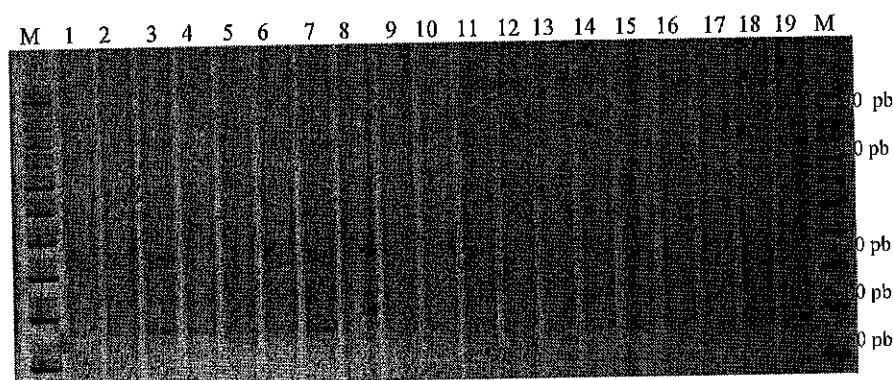


Figura 17. Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con *Hinf* I. Gel 8% acrilamida. M: Marcador de 50pb (Promega) carriles 1 al 19: muestras de papa.

El patrón de digestión con la enzima *Kpn*I fue el mismo para todas las muestras donde se obtuvieron tres bandas; una de 550 pb que en la figura 27 casi no se observa en las muestras 16 a 19, sin embargo, en el gel se apreciaban claramente. La segunda banda de 270 pb aproximadamente y la tercera de alrededor de 240 pb en todos los clones.

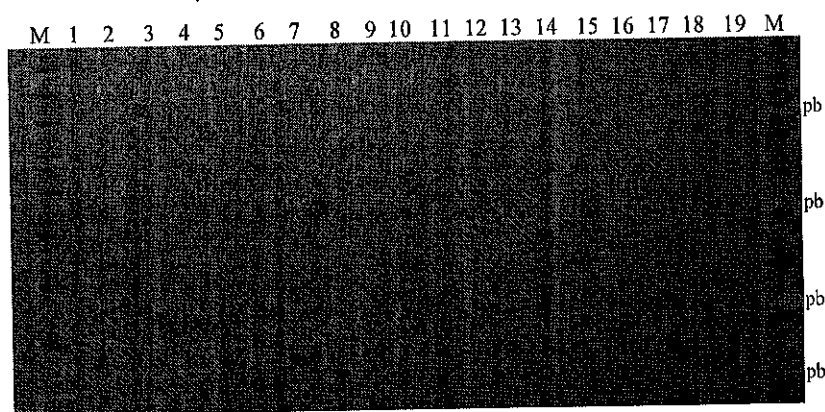


Figura 18. Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con *Kpn* I. Gel 8% acrilamida. M: Marcador de 50pb (Promega) carriles 1 al 19: muestras de papa.

Con la enzima *EcoR*I se presentó un patrón variado en los clones. Las muestras correspondientes a los clones 2 y 19 presentaron un patrón de digestión similar, una banda de 500 pb y otra de 700 pb aproximadamente; los clones 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14 y 15 mostraron otro patrón de dos bandas; una de 780 pb aproximadamente y otra de 700 pb. Mientras que el clon 1, 8, 10 no presentaron bandas.

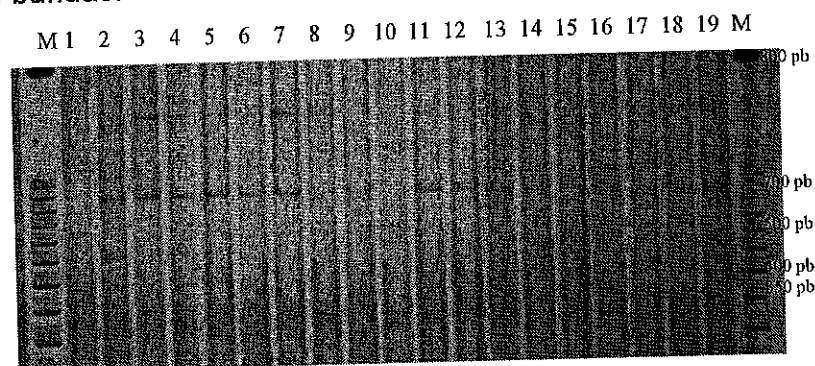


Figura 19. Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con *EcoR*I. Gel 8% acrilamida. M: Marcador de 50pb (Promega) carriles 1 al 19: muestras de papa.

La digestión del DNA con la enzima *Alu*I originó un fragmento de 230 pb aproximadamente en las muestras 1 al 7, 11 al 15; mientras que en la muestra 2 se observó también una banda de alrededor de 520 pb.

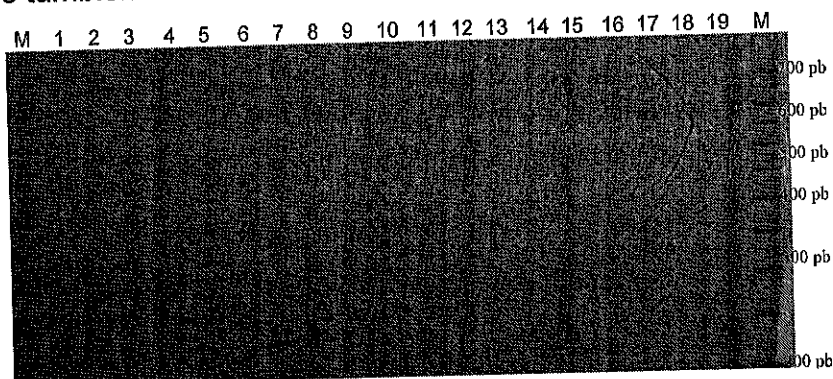


Figura 20. Análisis de RFLP de productos de PCR-anidada con iniciadores R16F2n/R16R2 digeridos con *Alu*I. Gel 8% acrilamida. M: Marcador de 50pb (Promega) carriles 1 al 19: muestras de papa.

Una vez conformada la matriz binaria con todos los fragmentos de restricción obtenidos en las diferentes muestras y realizado el análisis estadístico respectivo, se obtuvo el dendrograma correspondiente. En la Figura 21 se aprecian los agrupamientos conformados, destacando cuatro grupos de fitoplasmas presentes en los clones de papa: grupos A, B, C y D con un coeficiente de similitud de 0.72. Estos grupos atienden tal vez a la concentración de fitoplasmas en la planta, ya que en las amplificaciones realizadas todas las muestras amplificaron con al menos dos pares de iniciadores utilizados, manteniéndose la asociación de muestras del grupo A y B con respecto al A y C del árbol de PCR (Figura 14). Además cabe señalar que los perfiles de restricción obtenidos a partir del gen 16S, no corresponden ni tienen afinidad con los reportados por diferentes autores para los grupos de fitoplasmas reportados para la punta morada.

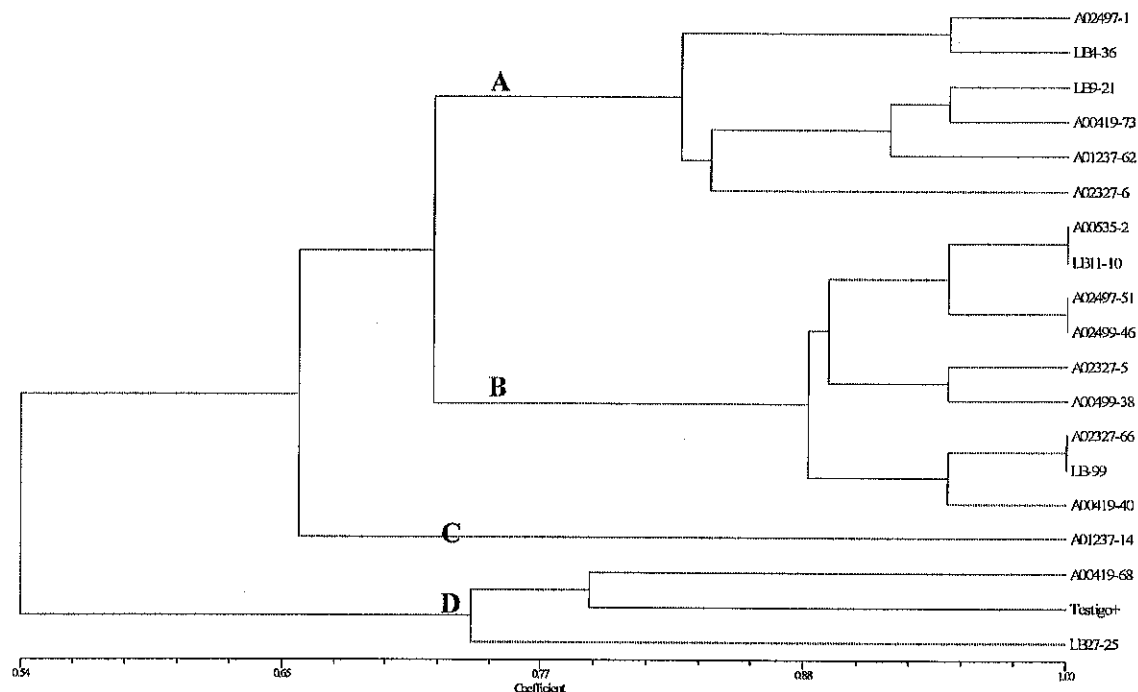


Figura 21. Árbol que representa los grupos de fitoplasmas de acuerdo al análisis de los fragmentos RFLP construido con método UPGMA y el coeficiente de similitud Jaccard en el programa estadístico NTSYS 2.2.

5.3. B) Genotipificación de plantas de papas tolerantes y susceptibles a fitoplasmas asociados del valle de Toluca, México.

5.3.1. Análisis de RAPDS

Con la finalidad de observar perfiles de DNA que permitieran diferenciar los clones de papa en estudio, se utilizaron dos sistemas de separación, geles de agarosa y acrilamida. En la Figura 22 se muestran los perfiles RAPDs separados en agarosa. Como se puede apreciar la capacidad de resolución con fines de diferenciación no es la adecuada. Los mismos productos RAPDs se separaron en geles de acrilamida al 8% (Figura 23 a 27) que mostraron la información deseada.

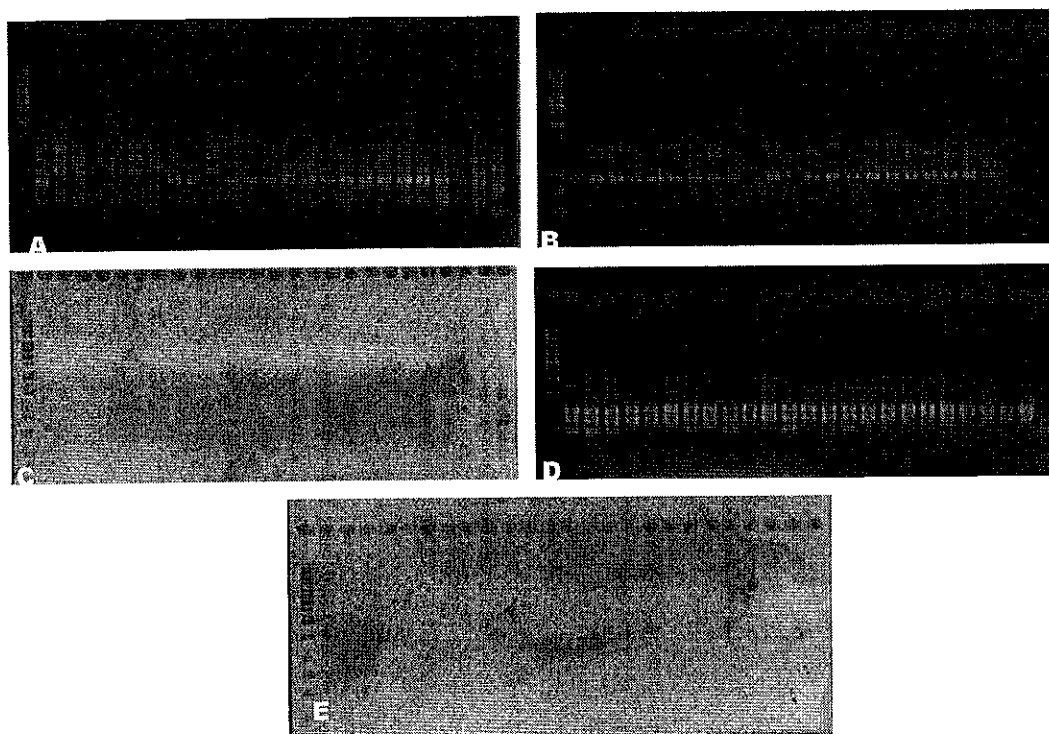


Figura 22. Geles de agarosa 1.2%. A: iniciador C-09 ROTH, B: iniciador C-12 ROTH, C: iniciador G-02 ROTH, D: iniciador G-10 ROTH, E: iniciador K 17 ROTH Germany. Carriles 1 a 17: clones de papa tardíos, 18 a 24: plantas de papa sanas usadas como controles negativos y carril 25: planta de papa enferma de punta morada. M: marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

Aún cuando la técnica RAPD ha sido criticada y desfasada por nuevas tecnologías debido a que muchos autores mencionan que tienen bajo nivel de reproducibilidad y que son marcadores dominantes (Torres y Moreno, 2001, Weising, *et al* 2005), también ha sido de bastante utilidad porque su implementación es sencilla, los iniciadores que utiliza son cortos y no requieren el conocimiento previo de secuencias específicas del ADN.

Para los propósitos del presente trabajo los RAPD fueron bastante informativos porque fueron capaces de mostrar diferencias en clones de papa con cierto grado de relación genética tal como se observa en los geles de acrilamida, además de que en cada experimento que se realizó independientemente durante el desarrollo de la investigación, los resultados siempre fueron reproducibles en las tres ocasiones que se hicieron las reacciones y las cinco veces en que se corrieron las muestras en los geles. El éxito de los resultados dependió principalmente de la calidad del DNA obtenido, de la temperatura de alineamiento utilizada, ya que la detección para cada caso fue más específica así como el sistema de separación.

Estudios similares se realizaron en ajo, que es una planta propagada también asexualmente; Ipek, *et al.*, (2003) compararon las técnicas AFLP, RAPD e isoenzimas encontrando una alta concordancia entre los resultados de AFLP y RAPD. Esta situación se ha repetido de especies como melón, arroz y chile; razones por las cuales, se consideró emplearla para realizar la presente investigación.

Con el iniciador C-09 (Figura 23) se logro apreciar un gran número de bandas monomórficas de aproximadamente 250 pb, 380 pb, 500 pb, 1200 pb. Se observaron bandas polimórficas entre las bandas de 250 y 500 pb referidas por el marcador. Así como entre la banda de 500 y 750 pb (señaladas con flechas). Cabe señalar que el carril 25 corresponde al testigo positivo y se

observó muy diferente a simple vista de los demás carriles ya que careció de bandas en donde la mayoría presentaba, sólo compartió algunas monomórficas.

Con el iniciador C-12 Roth (Figura 24), se obtuvieron bandas monomórficas de aproximadamente 500, 950, 1500, 2200 y 3000 pb. Los polimorfismos los encontramos en su mayoría entre 250 y 1500 pb destacándose las bandas en los carriles 4, 6, 9, 12-18 de aproximadamente 400 pb, las de 740 pb aproximadamente que no se encuentra en los carriles 1, 4, 6, 8, 9, 12, 20; y por último, el de 1400 pb presente en los carriles 4, 5, 8, 10.

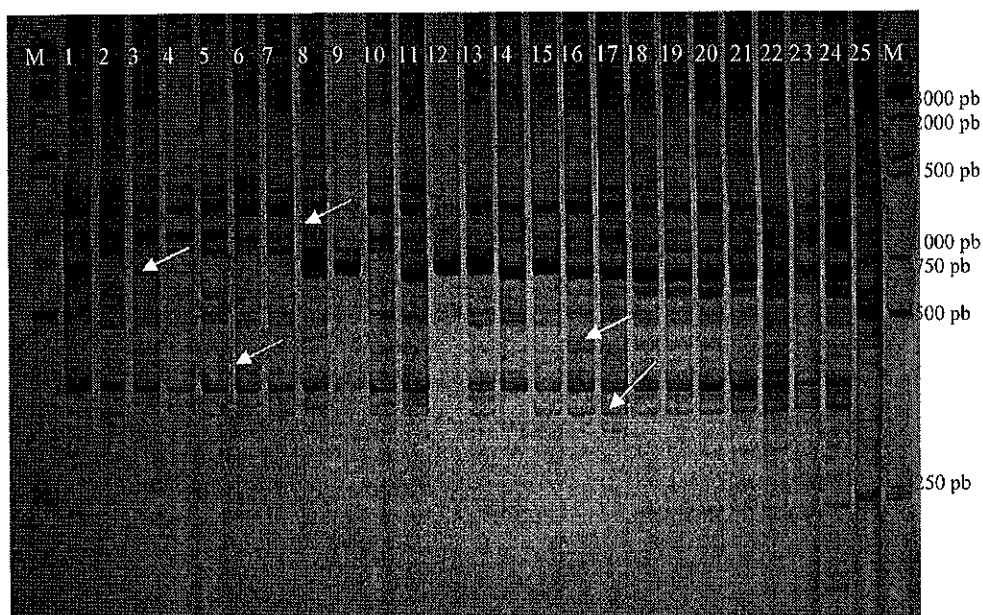


Figura 23. Iniciador C-09 ROTH, Germany. Carriles de 1 a 17: clones de papa, 18 a 24: plantas de papa sanas usadas como controles negativos y carril 25: planta de papa enferma de punta morada. Gel de acrilamida teñido con nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas)

En lo que se refiere a la serie G, el perfil de bandas observado con el iniciador G-02 Roth (Figura 25) presento varias bandas monomórficas de distintos pesos moleculares superiores de 1000 pb. La mayor cantidad de polimorfismos se presentaron en bandas de menor peso molecular, sin embargo en comparación con los demás iniciadores hubo un menor número de

bandas. Con el iniciador G-10 Roth (Figura 26) se observó un considerable número de bandas, las monomórficas se presentaron entre 500 y 600 pb aproximadamente y algunas de peso molecular mayor a 1000 pb.

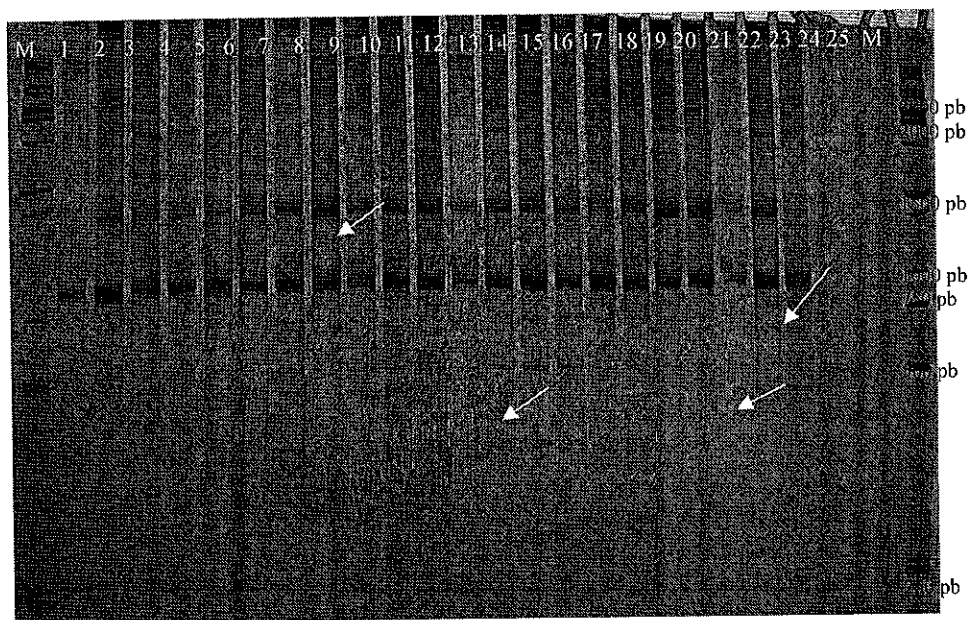


Figura 24. Iniciador C-12 ROTH, Germany. Carriles de 1 a 17: clones de papa, 18 a 24: plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 25: planta de papa enferma de punta morada. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas)

Por su parte de la serie K se obtuvo un buen perfil de bandas con el iniciador K-17 (Figura 27), presentándose el mayor número de bandas entre 300 y 1000 pb aproximadamente, las bandas monomórficas se presentaron con un peso molecular de 700, 800 y 1600 pb aproximadamente, mientras que los polimorfismos fueron bandas de 350 y en su mayoría entre los 700 y 1000 pb.

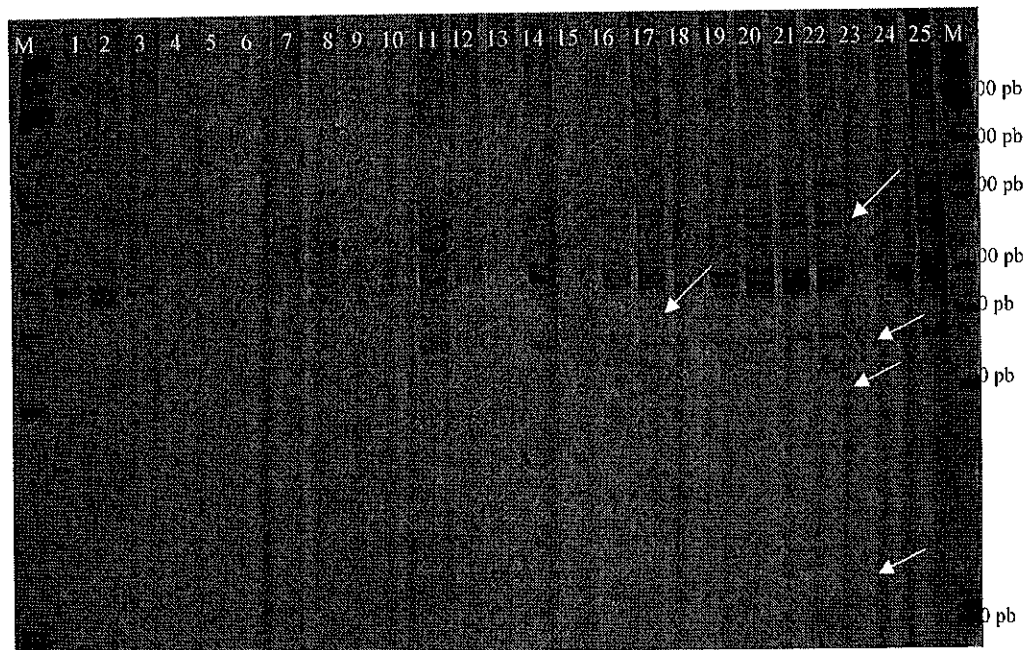


Figura 25. Iniciador G-02 ROTH, Germany. Carriles de 1a 17: clones de papa, 18 a 24: plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 25: planta de papa enferma de punta morada. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas)

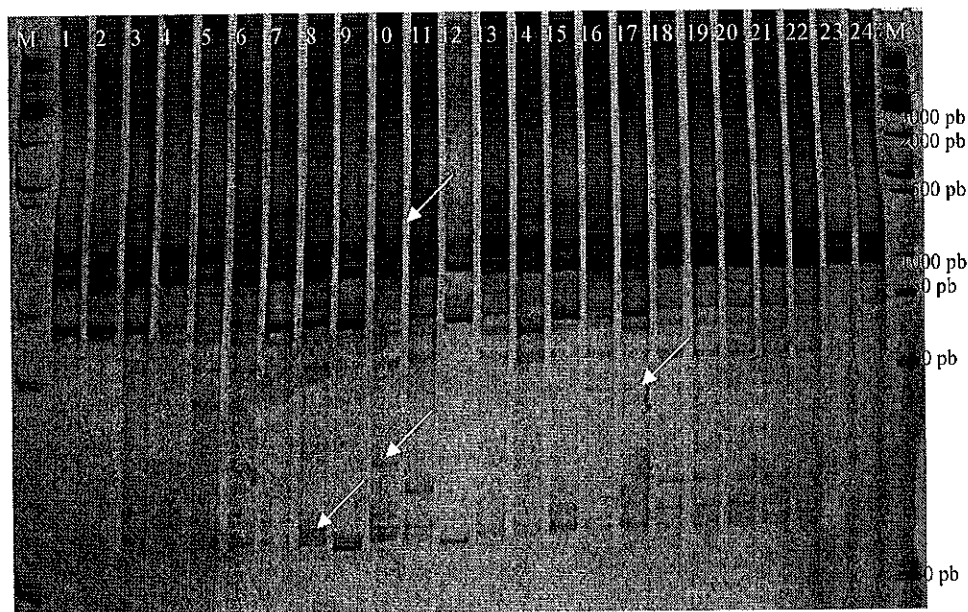


Figura 26. Iniciador G-10 ROTH. Carriles de 1 a 17: clones de papa, 18 a 23: plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 24: planta de papa enferma de punta morada. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas)

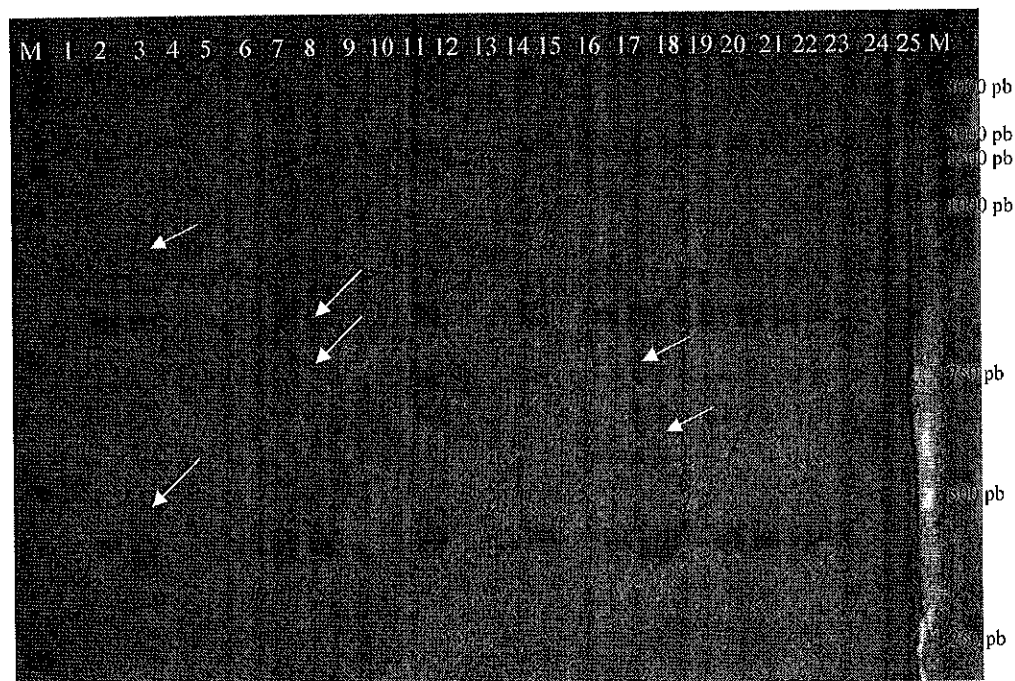


Figura 27. Iniciador K-17 ROTH, Germany. Carriles de 1 a 17: clones de papa, 18 a 24: plantas de papa sanas usadas como testigos negativos y carril 25: planta de papa enferma de punta morada. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas)

Con base en el número de fragmentos amplificados se generó un dendrograma (Figura 28) formándose cuatro grupos (A, B, C, D) con un coeficiente de similitud del 0.58. El grupo A se subdividió en dos grupos homogéneos, en uno se ubicaron los clones A02 497-1, A00499-38 y A02499-46 que al parecer no tienen progenitores comunes con los demás pero se detectó fitoplasma. El grupo B contiene a A00419-68, A00419-40 y al A00419-73 también con detección de fitoplasma con pocos iniciadores, sin embargo comparten progenitores. El grupo C fue heterogéneo, en él se agrupó el resto de los clones de papa y el testigo positivo, destacando que la mayoría de las muestras resultaron positivas a fitoplasma con un número significativo de iniciadores, excepto el clon LB 436 que amplificó con dos iniciadores para fitoplasma, referido en el cuadro 8, el clon LB 99 que amplificó con cuatro iniciadores se asoció estrechamente con el control positivo; cabe señalar que

este grupo comparte al menos un progenitor entre ellos, lo cual se puede observar en el cuadro 6. Por último se formó el grupo D en el cual están todas las plantas que sirvieron como testigos negativos sin embargo se formaron dos grupos, esto se debe a que las plantas se recolectaron de lugares diferentes unas en el campo experimental del PICTIPAPA y otras en Amecameca, Edo. de México.

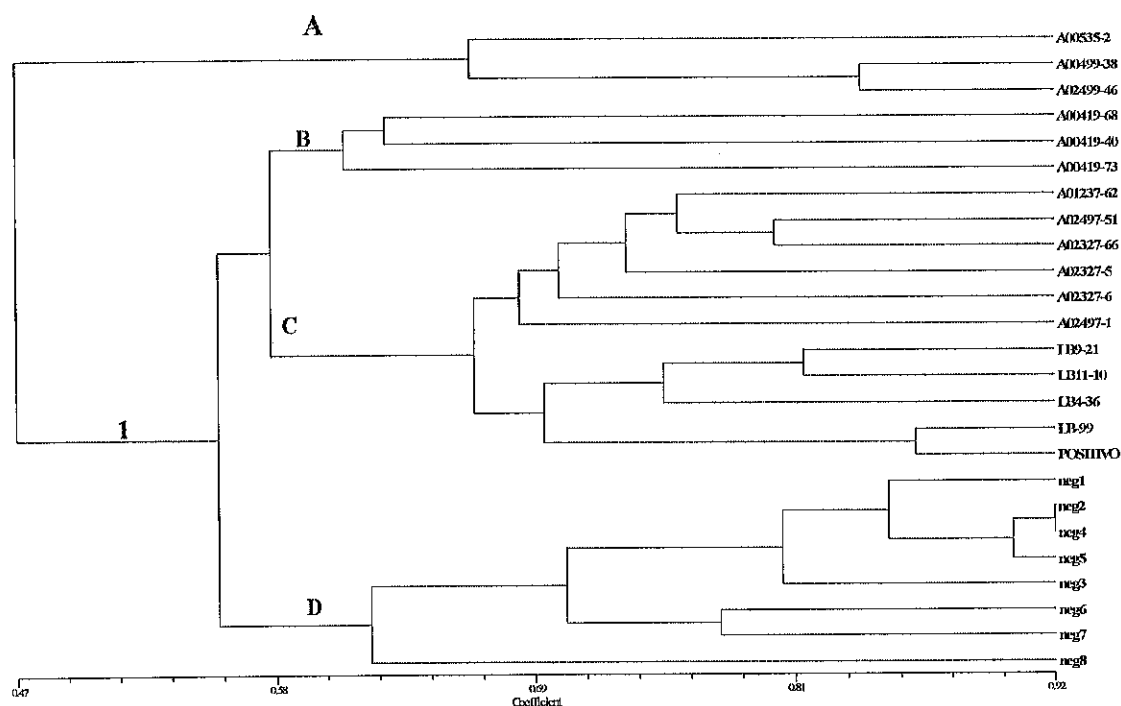


Figura 28. Árbol construido a partir de marcadores RAPDS con método UPGMA coeficiente de similitud Jaccard, en el programa estadístico NTSYS.

El uso del coeficiente de asociación de Jaccard eliminó el considerar las dobles ausencias como motivo de similitud lo cual conduce a errores, ya que pueden ser ausencias no homologas, de esta manera los dendrogramas se vieron menos afectados por bandas erráticas (Moreno, 2001). En un estudio de especies del género *Solanum* diploides y morfológicamente muy similares Spooner, *et al* (1996) estimaron que 650 es el número mínimo de bandas que se requieren para establecer relaciones genéticas precisas a nivel

intraespecífico. Por lo que se sugiere otro tipo de estudios para asociar marcadores genéticos a resistencia del fitoplasma ya que no se pudo delimitar que bandas son las que correspondían a esta característica en cada uno de los iniciadores utilizados.

Queda claro que el hecho de poder diferenciar en grupos distintos las plantas sanas de los clones que presentan fitoplasmas es una gran ventaja, ya que éstos a pesar de tener este patógeno eran asintomáticas, aunque se trata de clones silvestres fueron expuestos al mismo tiempo a las mismas condiciones ambientales con plantas que claramente presentaron síntomas de punta morada. Los resultados sugieren la búsqueda o el uso como progenitores de estos materiales como posibles fuentes de resistencia hacia la enfermedad, lo que concuerda con Jansky y Rouse (2003) quienes afirman que las especies silvestres son la fuente genes de resistencia a múltiples enfermedades.

Los datos de los resultados se sometieron a un Análisis Multivariado mediante la técnica estadística del Análisis Factorial por Correspondencia Simple, permitiendo agrupar las bandas obtenidas de cada clon de papa con los cinco iniciadores utilizados (Figura 29), lo cual facilitó la interpretación del análisis tanto en forma gráfica como numérica. En el cuadro 9 se observan los valores de los clones estudiados, donde se explica sólo el 42% de la variabilidad entre los tres componentes principales, ya que para explicar la variabilidad al 100% se necesitarían 24 componentes (Johnson, 2000).

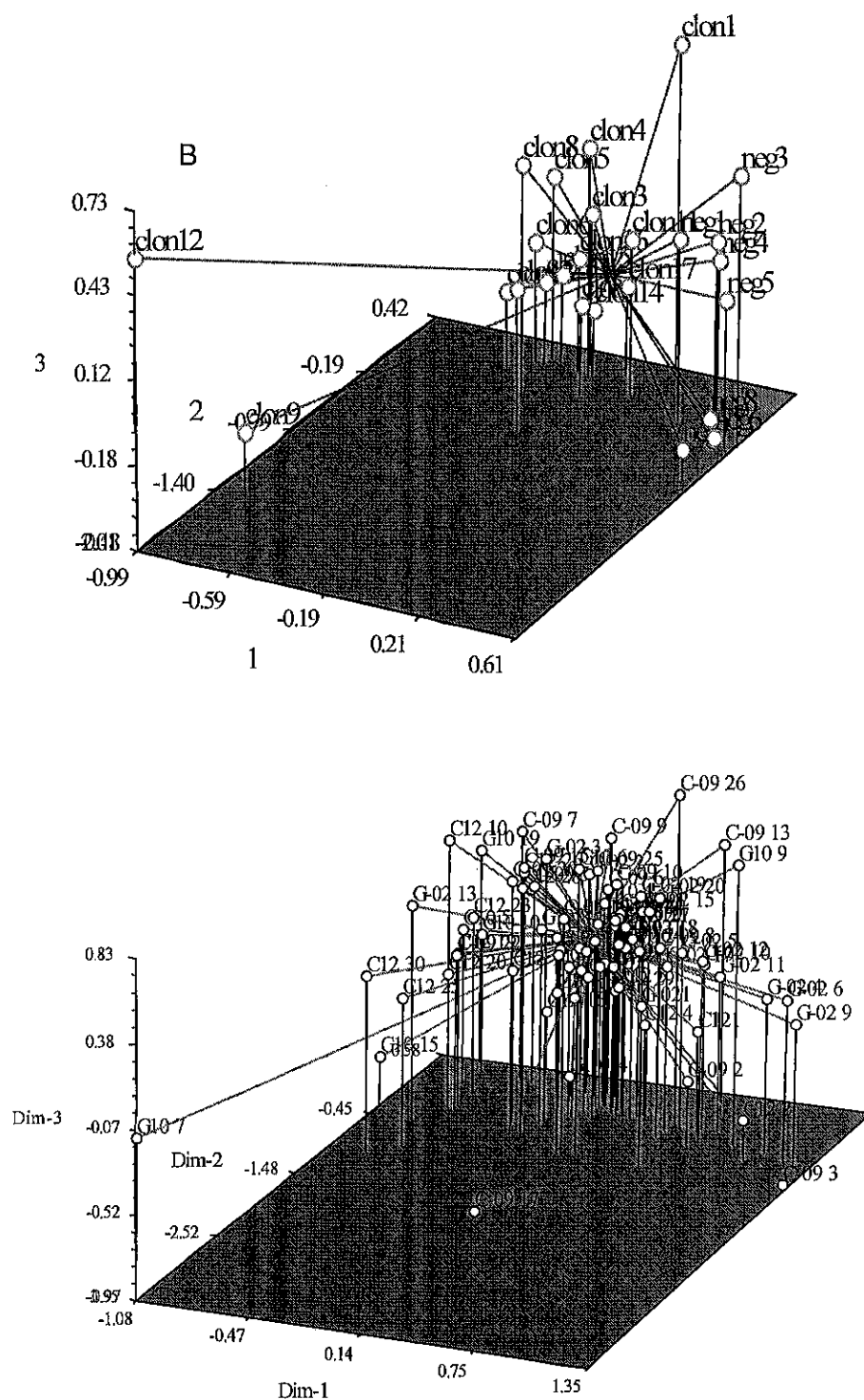


Figura 29. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para los clones de papa (A) y para las bandas obtenidas por cada uno de los iniciadores (B), producto del análisis factorial por correspondencia simple.

Cuadro No. 9 Valores propios de los clones de papa basados en el análisis factorial por correspondencia simple.

Componente Principal	Valor propio	Varianza Explicada en (%)	Varianza Acumulada en (%)
1	0.1705	19.43	19.43
2	0.1297	14.78	34.21
3	0.0734	8.36	42.57
4	0.0679	7.74	50.32
5	0.0561	6.40	56.71
6	0.0537	6.12	62.83
7	0.0435	4.96	67.79
8	0.0414	4.72	72.51
9	0.0377	4.30	76.81
10	0.0306	3.49	80.29
11	0.0252	2.88	83.17
12	0.0225	2.56	85.73
13	0.0192	2.19	87.92
14	0.0172	1.96	89.88
15	0.0155	1.77	91.65
16	0.0134	1.52	93.17
17	0.0125	1.42	94.59
18	0.0112	1.28	95.87
19	0.0090	1.03	96.90
20	0.0079	0.91	97.81
21	0.0061	0.70	98.50
22	0.0053	0.60	99.10
23	0.0048	0.54	99.65
24	0.0031	0.35	100.00

VII. CONCLUSIONES

La mayoría de los iniciadores utilizados detectaron la presencia de fitoplasmas en casi todos los clones de papa estudiados en esta investigación.

El análisis estadístico de la longitud de los fragmentos amplificados con las distintas combinaciones de iniciadores sugirieron la presencia de tres grupos de fitoplasmas.

Con los fragmentos RFLP se conformaron cuatro grupos diferentes de fitoplasmas a partir del análisis del gen 16S del RNAr, manteniéndose la asociación de muestras en al menos dos grupos de los conformados con los fragmentos específicos para fitoplasmas.

Los marcadores RAPDs utilizados para la diferenciación de las clones de papa fueron capaces de separar tanto las plantas sanas como las enfermas por fitoplasmas. Así como la separación en base a progenitores comunes de los clones.

VIII. LITERATURA CITADA

Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.

Almeyda, L. I. H., Rocha, P. M. A., Piña, R. J., and Martínez, S. J. P. 2001. The use of Polymerase Chain Reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 1-9.

Andersen, M. T., Newcomb, R. D., Liefting, L. W., and Beever, R. E. 2006. Phylogenetic analysis of "*Candidatus* Phytoplasma australiense" reveals distinct populations in New Zealand. *Phytopathology* 96:838-845.

Arora, Y. K., and Sinha, R. C. 1988. Plant pathogenic mycoplasmas: morphological and biochemical characteristics. In: *Mycoplasma disease of crops: basic and applied aspects*. Maremhorsh, K., and Raychaudhuri, S. P. (eds). Springer-Verlag. N. Y. 3-28 pp.

Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende, R. O., and Dally, E. L. 2001. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease* 85:475-480.

Barros, T.S.L., Davis, R. E., Resende, R. O., and Dally, E. L. 2002. Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16SrRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* 86:1142-1148.

Berges, R., Rott, M., and Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma Concentrations in various plant hosts determined by Competitive Polymerase Reaction. *Phytopathology* 90:1145-1152.

Bertaccini, A., and Vibio, M. 1996. Phytoplasma identification in Italy. Results of 16S rDNA analysis pp 13-14.

Bressan, A., Clair, D., Sémétey, O., and Boudon-Padieu, E. 2006. Insect Injection and Artificial Feeding Bioassays to Test the Vector Specificity of Flavescence Dorée Phytoplasma. *Phytopathology* 96:790-796.

Bujanos, M. R., y Marín, J. A. 2004. Insectos vectores de virus y fitoplasmas del cultivo de papa en México. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Ver.

Cadena, H. M. A. 1974. Estudio sobre la punta morada de la papa en México. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 70 p

Cadena, H. M. A. 1993. La punta morada de la papa en México. Incidencia, búsqueda de resistencia. *Agrociencia* 4:247-256.

Cadena H. M. A., Guzmán P. R., Díaz, V. M., Zavala Q. T. E., Almeyda, L. I. H., López, D. H., Rivera, P. A., y Rubio, C. O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 248-258

Cervantes, D. L. 2005. Identificación biológica y molecular de fitoplasmas y geminivirus de la *Alstroemeria* (*Alstroemeria* L.). Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo Edo de México. 88 p

Chang, C. J. 1998. Pathogenicity of aster yellow phytoplasma and spiroplasma citri on periwinkle. *Phytopathology* 88: 1347-1350.

Chang, C. J., and Donaldson, R. C. 1985. Effects of plant growth regulators on periwinkle infected with aster yellow mycoplasma-like. *Phytopathology* 75: 489 (Abs.)

Chávez, M. J. A., Santos, C. M. E., Fierro, C. J. A, Briceño, L. P. G., Méndez, L. J. y Leyva, L. N. E. 2004 Uso de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas asociados a enfermedades en papa. *Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Veracruz, Ver.

Chen, K. H. Jr., Guo, X.F.W, Loi, N., Carraro, L., Guo, Y. H., Chen, Y. D., Osler, R., Pearson, R., and Chen, T. A. 1993. Comparison of monoclonal antibodies DNA probes and PCR for detection of grapevine yellows diseases agent. *Phytopathology* 83:915-922.

Chen, Y. D., and Chen, T. A. 1998. Expression of engineered antibodies in plants: A possible tool for spiroplasma and phytoplasma disease control. *Phytopathology* 88:1367-1371.

Crosslin, J.M., Vandemark, G. J., and Munyaneza, J. E. 2006. Development of a Real-Time, quantitative PCR for detection of the Columbia Basin potato purple top phytoplasma in plant and beet leafhoppers. *Plant Disease* 90:663-667.

Dale, J. L. 1988. Rapid compression technique for detecting mycoplasma-like organisms in leaf midrib sieve tubes by fluorescence microscopy. *Phytopathology* 78:118-120.

Danet, J.-L., Foissac, X., Zreik, L., Salar, P., Verdin, E., Nourrisseau, J.-G., and Garnier, M. 2003. «*Candidatus Phlomobacter fragariae* » is the prevalent agent

- of marginal chlorosis of strawberry in French production fields and transmitted by the planthopper *Cixius wagneri* (China). *Phytopathology* 93:644-649.
- Davis, R. E., and Lee, I.-M. 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:1008-1011.
- Davis, R. E., Schneider, B., and Gibb, K. S. 1997. Detection and differentiation of phytoplasmas in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 48:535-544.
- Davis, R. E., and Sinclair, W. A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88:1372-1376.
- Deng, S. L., and Hikury, Y. C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mycoplasmas. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61.
- Doi, Y., Terenaka, M., Yora, A., and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the floem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellow, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 33:259-266
- Doyle, J. and Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus (Life Technol.)* 12:13-15
- García, Q. J. R. 1996. Etiología y transmisión del oscurecimiento interno del tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L) para industria. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 65 p.

Garzón, T. J. A., Velarde, F. S., Ceballos, R. J.A., Garzón, C. J. A., Moreno, C. J. A., Ramos, M. J., y Félix, A. B. 2004. Asociación de fitoplasmas en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicum esculentum* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y tomatillo (*Physalis* sp.) en México. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Ver.

Giménez, P. M. P., De Oliveira, E., Resende, R. O., Laguna, I. G., Avila, A., Herrera, P., Galdeano, E., Virla, E., and Nome C. F. 2002. Ocorrência de doenças causadas por Mollicutes e por vírus em miho nas Províncias de Tucumán e de Córdoba na Argentina. Fitopatol. Bras. [online]. 2002, vol. 27 no. 4 (citado 8 nov 06), pp 403-407. Disponible en: www.scielo.br/scielo.php

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

Guo, Y. H., Cheng, Z.-M., and Walla, J. A. 2000. Characterization of X-disease phytoplasmas in chokecherry from North Dakota by PCR-RFLP and sequence analysis of the rRNA gene region. Plant Disease 84:1235-1240.

Harrinson, N. A., Boa, E., and Carpio, M. L. 2003. Characterization of phytoplasmas detected in Chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia. Plant Pathology 52: 147-157.

Harrinson, N. A., Griffiths, H., Carpio, M. L., and Richardson, P. A. 2001. Detection and characterization of an elm yellows (16SrV) group phytoplasma infecting Virginia crrper plants in southern Florida. Plant Disease 85:1055-1062.

Hernández, M. J. 2000. Detección de fitoplasmas asociados a la enfermedad punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante técnicas

moleculares. Tesis Doctoral Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 91 p.

Herrera, M. G y Mandariaga, V. M. 2003. Evidencias inmunológicas, microscópicas y moleculares de la presencia de fitoplasmas en vides. Agric. Téc. (online). Ene., 2003, vol 63, no. 1(citado 8 nov del 2006), p 15-22. Disponible en la Word Wide web www.scielo.cl/scielo.php.

Hooker, W. J. 1981. Compendium of Potato Disease. APS Press, U.S.A. 125 p.

Ipek, K. M., Ipek, A., and Simon P. W. 2003. Comparasion of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germoplasm collections. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:246-252.

Jacobs, K. A., Lee, I.-M., Griffiths, H. M., Miller, F. D. Jr., and Bottner, K. D. 2003. A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. Plant Disease 87:241-246.

Jansky, S, H., and Rouse, D. I. 2003. Multiple disease resistance in interespecific hybrids of potato. Plant Disease 87:266-272.

Johnson, D. E. 2000. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Editorial Thomson. México. pp 566.

Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K., and Soito, M. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper Hishimonoides sellatiforms in trees mulberry. Phytopathology 90: 909-914

Kirkpatrick, B. C. 1997. Phytoplasmas: The Evolution of a Molecular Taxonomic Genus. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 49(5):126-130.

Kollar, A., Seemüller E., Bonnet, F., Sillard, C., and Bové, J. M. 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80:233-237.

Lee, I.M., Bertaccini A., Vibio, M., and Gundersen, D. E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728-735.

Lee, I.M, Davis, R. E., and Gundersen- R., D. E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:221-255.

Lee, I.M., Dawn E., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., and Bartoszyk, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.

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

Lee, I. M., Hammond, R., 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.

Lee, I.-M., Martín, M., Bottner, K. D., Dane, R. A., Black, M- C., and Troxclair, N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas

involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93:1368-1377.

Levy, L., Lee, I. M., and Hadidi, A. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *Jour. Virol. Meth.* 49: 295-304.

Leyva, L. N. E., y Martínez, S. J. P. 2003. Detección diferencial de fitoplasmas asociados a enfermedades de papa usando PCR múltiple anidado. *Memorias del XXX Congreso Nacional y V Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. South Padre Island, Texas, E.U.A.

Leyva, L. N. E., Ochoa, S. J. C., Leal, K. D. S., and Martínez S. J. P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México. *Canadian journal of Microbiology* 48:1062-1068.

Lim, P.O., and Sears, B. B. 1991. The genome size of a plant pathogenic mycoplasma-like organisms resemble those of animal mycoplasmas. *Jour. Bacteriol.* 173: 2128-2130.

Lin, C. P., and Chen, T. A. 1986. Comparasion of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies in detection of the aster yellows mycoplasma-like organism. *Phytopathology* 76: 45-50.

Lorenz, H. 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.

López, L. F.I. 2002. Estudios sobre el psílido de la papa (*Paratrioza cockerelli*) en la región del Bajío. *Memorias del XI Congreso Nacional de la papa*. León, Guanajuato, México. pp. 98-109.

Luna, E. G. 2003. Caracterización molecular de fitoplasmas presentes en especies Hortícolas. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados Montecillo Edo. de México. 51 p.

Maust, B. E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J. M., and Oropeza, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93:976-981.

McCoy, R. E. 1979. Mycoplasmas and yellows diseases. In: *The Mycoplasmas*. Vol. III. Plant and Insect Mycoplasmas. Whitcomb, R. F., and Tully, J. G. (Eds). Academic Press. NY. 351 p.

Montano, H. G., Davis, R. E., Dally, E. L., Pimentel, J. P., and Brioso, P. S. T. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plants Disease* 84:429-436.

Moreno, V. S. 2001. Análisis de resultados en la caracterización molecular. En: *Conservación y caracterización de recursos filogenéticos*. González, A. F., y Pita, V. J. M. (Eds) INEA Esc. Univ. De Ingeniería Técnica Valladolid.

Munyanza, J. E., Jensen, A. S., Hamm, P. B., and Crosslin, J. M. 2005. Phenology of the beet leafhopper, major vector of the potato purple top phytoplasma in the Columbia Basin. *Potato Association of America Annual Meeting* (G73).

Oshima, K., Shiomi, T., Kuboyama, T., Sawayanagi, T., Nishigawa, H., Kakizawa, S., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2001. Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. *Phytopathology* 91:1024-1029.

Orona, C. F., Almeyda, L. I. H., Pecina, Q. V., Rocha, P. M. A., y Cadena H. M. A 2004. Detección de marcadores asociados con resistencia a punta morada de la papa. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Ver.

Rohlf, F. J. 2002. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.10) Exeter Software, Applied Biostatistic., New York.

Rubio, C. O., Almeyda, L. I. H., Ireta, M. J., Sánchez, S. A., Fernández, R., Borbón, S. J., López, D. H., Díaz, H. C., Garzón, T. A., Rocha, P. R., y Cadena H. M. 2003. Distribución del Síndrome Punta Morada de la papa en México. Memorias del XXX Congreso Nacional y V Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. South Padre Island, Texas, E.U.A.

Salazar, L. F. 1997. Identificación y control de enfermedades virales y fitoplasmas de la papa. Simposio Internacional de la papa México www.codesan.org/org/e-foros/infopapa/papa27.htm

Salazar, L. F. 2002. Fitoplasmas: Un factor negativo para la producción de semilla de papa. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSH)

Santos, C. M. E. 2005. Distribución geográfica de fitoplasmas asociados con enfermedades de papa en México. Memorias XXXII Congreso Nacional de Fitopatología. L-45. Chihuahua, Chih., México.

Scheider, H. 1970. Graf Transmisión and host range of the pear decline causal agent. *Phytopathology* 60: 204-207.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, M.-T., and Semüller, E. 1997. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103:675-686.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.

Seliskar, C. E., and Wilson, C. 1981. Yellow diseases in trees. In: *Mycoplasma diseases of the trees and shrubs*. Maramorosch, K., and Raychaudhuri, S. P. (Eds). Academic Press. N.Y. 350 p.

SIAP 2005. Servicio de Información y estadística, Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA www.sagarpa.gob.mx.

Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrinson, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.

Smart, C. D. and Kirkpatrick, B. C. 1996. Identification of host plant genes whose expression is altered upon aster yellows phytoplasma infection. *IOM Lett.* 4:274.

Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco, Cal.

Subandiyah, S., Iwanami, T., Tsuyumu, S., and Ieki, H. 2000. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. *Plant disease* 84:15-18.

Spooner, D. M.; Tivang, J.; Nienhuis, J.; Miller, J. T; Douches, D. S., and Contreras, A. 1996. Comparasion of four molecular markers in mesuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* . Theoretical and Applied Genetics, 92: 532-540

Tanne, E., Boundon-Padieu, E., Clair, D., Davidovich, M., Melamed, S., and Klein, M. 2001. Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and ITS use in determining vectoring ability. *Phytopathology* 91:741-746.

Tedeschi, R and Alma, A. 2006. *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as vector of "Candidatus Phytoplasma mali". *Plant Disease* 90:284-290.

Tolu, G., Botti, S., Garau, R., Prota, V. A., Sechi, U. And Bertaccini, A. 2006. Identification of a 16SrII-E Phytoplasma in *Calendula arvensis*, *Solanum nigrum* and *Chenopodium* spp.

Torres, L. M. E. y Moreno V. S. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. En: Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. González, A. F., y Pita, V. J. M. (Eds) INEA Esc. Univ. De Ingeniería Técnica Valladolid.

Tsai, J. H. 1979. Vector transmission of mycoplasmal agent of plant diseases. In: The Mycoplasmas. Vol. III. Plant and Insect Mycoplasmas. Whitcomb, R. F., and Tully, J. G. (Eds). Academic Press. NY. 351 p.

Valadez, M. E., and Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi- Prensa, México. 140 p.

Wang, K., and Hikuri, C. 2001. Use of Heteroduplex Mobility Assay for Identification and Differentiation of Phytoplasmas in the Aster Yellows Group and the Clover Proliferation Group. *Phytopathology* 91:546-552.

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 Disease* 85:76-79.

Weising, K; Nybom, H; Wolff, K., and Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles, Methods and Applications 2a. ed. CRC Press 444p.