

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS UTILIZANDO LA REACCIÓN EN  
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) CONVENCIONAL Y DE ALTA FIDELIDAD

Por  
Gabriela Cristina Romero Estévez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS  
en  
PROTECCIÓN DE CULTIVOS

DEPARTAMENTO DE CULTIVOS Y CIENCIAS AGROAMBIENTALES  
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2012

Aprobado por

---

Consuelo Estévez de Jensen, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

---

Fecha

---

José Carlos V. Rodrigues, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Carmen A. Vega, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

---

Hipólito O'Farrill Nieves, Ph.D.  
Director del Departamento

---

Fecha

## RESUMEN

Se comparó la sensibilidad de la PCR convencional y de alta fidelidad para la identificación del agente causal del "enverdecimiento de los cítricos", *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la "marchitez bacteriana del tomate" y *Pythium dissotocum*, agente causal de la "pudrición de la raíz" en cilantrillo y arveja. El ADN fue extraído mediante el "DNeasy Plant Mini Kit" de Qiagen. La amplificación de ADN de *Candidatus Liberibacter asiaticus* se realizó a partir de 138 hojas sintomáticas y asintomáticas de *Citrus sinensis*, *Citrus latifolia*, *Citrus limon* y *Myrtus communis*. La PCR de alta fidelidad fue más sensible para detectar a *Ca. L. asiaticus* con los iniciadores OI1 y OI2 en doce muestras que fueron negativas con la PCR convencional, amplificando una banda de 1160 pb del 16S rDNA. En la identificación de la región 16S del ADNr de *Ralstonia solanacearum* se utilizaron los iniciadores 759 y 760. La PCR convencional amplificó bandas de 280 pb correspondientes a *Ralstonia solanacearum* en 18 secciones de tallo de nueve plantas con síntomas de marchitez bacteriana. La PCR de alta fidelidad produce falsos negativos. La PCR convencional fue más sensible para identificar a *R. solanacearum* a partir de tejido de tomate. La identificación de *Pythium dissotocum* se realizó a partir de arveja y el cilantrillo con los iniciadores ITS1 y ITS4. La PCR de Alta Fidelidad fue más sensible que la PCR convencional, amplificando una banda de 808 pb correspondiente a *Pythium dissotocum* en todas las muestras analizadas. La PCR de alta fidelidad permitió una mayor sensibilidad en la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* a partir del tejido de cítricos y *Pythium dissotocum* a partir de arveja y cilantrillo

**Palabras clave:** PCR convencional, PCR de alta fidelidad, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ralstonia solanacearum*, *Pythium dissotocum*

## ABSTRACT

The sensitivity of standard PCR and high fidelity PCR was compared to identify *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causal agent of “citrus greening”, *Ralstonia solanacearum*, causal agent of “bacterial wilt in tomato” and *Pythium dissotocum*, causal agent of “root rot” in cilantro and pea. DNA was extracted using a “DNeasy Plant Mini Kit” of Qiagen. DNA amplification of *Candidatus Liberibacter asiaticus* was performed from 138 symptomatic and asymptomatic leaves of *Citrus sinensis*, *Citrus latifolia*, *Citrus limon* and *Myrtus communis*. The High Fidelity PCR was more sensitive to detect *Ca. L. asiaticus* with primers OI1 and OI2 from 138 samples, twelve samples, that were negative, amplified a 1160 bp band of the 16S rDNA with Hi-Fi PCR. Identification of 16S region of DNAr of *Ralstonia solanacearum* was carry out with primers 759 and 760. Standard PCR amplified bands of 280 bp corresponding to *Ralstonia solanacearum* in 18 stem sections of nine plants with bacterial wilt symptoms. High Fidelity PCR produced false negatives. Standard PCR was sensitive to identify *R. solanacearum* directly from tomato tissue. Identification of *Pythium dissotocum* was performed from pea and cilantro using primers ITS1 and ITS4. High Fidelity PCR was more sensible than standard PCR, amplified a band of 808 bp corresponding to *Pythium dissotocum* in all samples analized. High Fidelity PCR allowed increased sensitivity in detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* from citrus tissue and *Pythium dissotocum* from pea and cilantro tissue.

**Palabras clave:** Standard PCR, High Fidelity PCR, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ralstonia solanacearum*, *Pythium dissotocum*

Quiero consagrar todo mi esfuerzo y dedicación a las personas que han sido y serán mi luz, mi guía, mi referente, mi identidad y mi esperanza: mis padres, mi hermano David y mi esposo José, por ser la esencia de mi vida y por su amor y comprensión, por su apoyo incondicional y por sus consejos. A mis abuelos maternos, mis segundos padres, quienes formaron parte esencial de mi formación física e intelectual.

## AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud imperecedera a la Dra. Consuelo Estévez de Jensen, por darme la oportunidad de formarme en el área de la fitopatología y de incursionar en el ámbito de la investigación con mi trabajo en los proyectos Z-52 y Z-173c. Gracias por ser un ejemplo de éxito y superación desde mi infancia y por incentivar me a cumplir meritorias metas; por brindarme su cariño y apoyo, por compartir conmigo sus experiencias y sabios consejos que han contribuido a mi crecimiento profesional y personal.

Mi reconocimiento muy especial a la Dra. Lydia I. Rivera Vargas y al Dr. José Carlos Rodríguez por sus recomendaciones y por compartir sus conocimientos. A los científicos Aaron Palmateer, Paul Vincelli y Andre Lavesqué, por proporcionarme información importante para el desarrollo de mi investigación.

Agradezco al personal técnico de la Estación Experimental Juana Díaz por su colaboración en los experimentos realizados en el vivero; al departamento de Protección de Cultivos y a su director, el Dr. Hipólito O' Farrill y a todos los profesores por sus invaluable enseñanzas.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que conocen el verdadero significado de la amistad y que han tenido la generosidad de compartirlo conmigo durante todos estos años. Gracias por todos esos valiosos momentos de compañerismo y camaradería.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE APÉNDICES</b> .....	xviii
<b>JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN GENERALES DE LA TESIS</b> .....	1
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	1
<b>DISEÑO DE LA TESIS</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
Diagnóstico e Identificación de enfermedades .....	4
Reacción en cadena de la polimerasa.....	6
PCR de Alta Fidelidad .....	8
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	14
<b>APÉNDICES</b> .....	21
<b>Apéndice 1.1</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	22
<b>RESUMEN</b> .....	22
<b>IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Ralstonia solanacearum</i>, AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA DEL TOMATE</b> .....	22
<b>ABSTRACT</b> .....	23
<b>IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF <i>Ralstonia solanacearum</i>, THE CAUSAL AGENT OF BACTERIAL WILT IN TOMATO</b> .....	23
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	24
<b>Obtención de las muestras y sintomatología</b> .....	27
<b>Aislado de <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	27
<b>Identificación Morfológica y Bioquímica</b> .....	28
Tinción de Gram .....	28
Prueba de KOH y de Oxidasa .....	28
Crecimiento a 40°C.....	29

<b>Identificación mediante Pruebas de Serología</b> .....	29
Tira serológica (Immunostrip®) .....	29
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) .....	29
<b>Identificación Molecular</b> .....	30
Extracción y amplificación del ADN.....	30
Tejido Vegetal.....	30
<b>Determinación de la densidad óptica del ADN</b> .....	31
<b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	31
<b>PCR de alta fidelidad (Hi-Fi PCR)</b> .....	32
<b>Identificación del Biovar de <i>R. solanacearum</i></b> .....	32
<b>Conservación de las cepas</b> .....	33
<b>Purificación del producto de PCR para la secuenciación</b> .....	33
<b>Análisis de la región 16 S del ADN ribosomal</b> .....	34
<b>Pruebas de patogenicidad para <i>Ralstonia spp.</i></b> .....	34
Ensayo de patogenicidad y preparación del inóculo.....	34
<b>Determinación del número de células viables en un cultivo</b> .....	36
<b>Análisis estadístico</b> .....	36
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>Obtención de las muestras y sintomatología</b> .....	36
<b>Características morfológicas y culturales</b> .....	38
<b>Prueba del KOH 3%, Tinción Gram y Oxidasa</b> .....	39
<b>Pruebas de serología</b> .....	40
<b>Identificación molecular</b> .....	43
<b>Secuenciación del gen 16S</b> .....	45
<b>Identificación de biovares</b> .....	46
<b>Pruebas de Patogenicidad con <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	50
Sintomatología .....	50
Identificación serológica.....	53
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y de alta fidelidad .....	55
<b>CONCLUSIONES</b> .....	64

<b>RECOMENDACIONES</b> .....	65
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	75
<b>RESUMEN</b> .....	75
<b>IDENTIFICACIÓN DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> AGENTE CAUSAL DEL ENVERDECIMIENTO DE LOS CÍTRICOS (CITRUS GREENING) CON PCR CONVENCIONAL Y DE ALTA FIDELIDAD</b> .....	75
<b>ABSTRACT</b> .....	76
<b>IDENTIFICATION OF <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> CAUSAL AGENT OF CITRUS GREENING WITH STANDART AND HIGHT FIDELITY PCR</b> .....	76
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	77
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	80
<b>Obtención de las muestras</b> .....	80
<b>Identificación Molecular</b> .....	80
Extracción y amplificación del ADN.....	80
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....	81
PCR de alta fidelidad (Hi-Fi PCR) .....	82
<b>Análisis de la secuencia 16S del ADN ribosomal</b> .....	83
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	83
<b>Síntomas</b> .....	83
<b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y del Alta Fidelidad</b> .....	94
<b>CONCLUSIONES</b> .....	105
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	106
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	107
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	111
<b>RESUMEN</b> .....	111
<b>IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Pythium</i> sp., AFECTANDO CILANTRILLO EN HIDROPONÍA</b> .....	111
<b>ABSTRACT</b> .....	112
<b>IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF <i>Pythium</i> sp., AFFECTING CILANTRO IN HYDROPONIC CROPS</b> .....	112
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	113

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	115
<b>Obtención de las muestras</b> .....	115
<b>Identificación Morfológica</b> .....	116
<b>Identificación Serológica</b> .....	116
<b>Identificación Molecular</b> .....	118
Extracción de DNA y PCR .....	118
PCR de Alta Fidelidad .....	118
<b>Purificación del producto de PCR para la secuenciación</b> .....	119
<b>Análisis de la secuencia ITS del ADN ribosomal</b> .....	119
Conservación de los aislados .....	120
<b>Pruebas de Patogenicidad realizadas con <i>Pythium sp.</i></b> .....	120
Análisis estadístico .....	121
<b>Comparación del PCR convencional y de Alta Fidelidad en la detección de <i>Pythium dissotocum</i> a partir de ocho diluciones seriadas de ADN.</b> .....	122
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	123
<b>Obtención de las muestras y sintomatología</b> .....	123
<b>Identificación morfológica</b> .....	123
<b>Identificación serológica</b> .....	126
<b>Identificación molecular</b> .....	127
<b>Secuenciación de la región del espaciador intergénico ITS</b> .....	129
<b>PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CON <i>Pythium sp.</i></b> .....	131
Sintomatología .....	131
Identificación serológica.....	135
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y de alta fidelidad .....	138
<b>Comparación del PCR convencional y de Alta Fidelidad en la detección de <i>Pythium dissotocum</i> a partir de ocho diluciones seriadas de ADN.</b> .....	153
<b>CONCLUSIONES</b> .....	161
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	162
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	163

## LISTA DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>Páginas</b>
Tabla 2.1: Características de los aislados obtenidos en plantas de tomate con síntomas de marchitez bacteriana, pertenecientes al género <i>Ralstonia</i> .....	40
Tabla 2.2: Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> con la tira serológica específica (ImmunoStrip Test, Agdia, Inc.).....	41
Tabla 2.3: Prueba serológica DAS ELISA específica para <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	42
Tabla 2.4. Prueba ELISA para la identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> en colonias bacterianas.....	42
Tabla 2.5. Identificación molecular de aislados de <i>Ralstonia solanacearum</i> de tomate, utilizando la secuenciación de la región ITS del rADN y el programa BLAST.....	45
Tabla 2.6. Prueba de producción de ácido a partir de disacáridos y alcoholes y prueba de reducción de nitrito y producción de gas nitrito a partir de nitrato con los aislados 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares) de <i>R. solanacearum</i> . ....	48
Tabla 2.7. Promedios de la severidad en plantas de tomate inoculadas con <i>R. solanacearum</i> .....	50
Tabla 2.8. Porcentaje de severidad de la marchitez bacteriana en tomate. ....	53
Tabla 2.9: Prueba DAS ELISA para <i>R. solanacearum</i> en plantas de tomate. ....	54
Tabla 2.10. Concentración del ADN obtenido de las plantas de tomate del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.....	56

Tabla 2.11: PCR convencional y de alta fidelidad para la identificación de <i>R. solanacearum</i> a partir del tejido vegetal de platas de tomate.....	57
Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR tradicional y PCR de alta fidelidad en la identificación de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	85
Tabla 4.1. Diluciones de ADN utilizadas en la comparación del PCR convencional y de Alta Fidelidad para la detección de <i>Pythium dissotocum</i> .....	122
Tabla 4.2. Prueba ELISA para la identificación de <i>Pythium</i> sp. en los aislados 1271 y 1272. ..	126
Tabla 4.3. Identificación molecular de aislados de <i>Pythium dissotocum</i> de cilantrillo, utilizando la secuenciación de la región ITS del rADN y el programa BLAST.....	130
Tabla 4.4. Promedios de la severidad en plantas de arveja inoculadas con el aislado 1271 de <i>Pythium dissotocum</i> . .....	131
Tabla 4.5. Promedios de la severidad en plantas de cilantrillo inoculadas con el aislado 1271 de <i>Pythium dissotocum</i> . .....	132
Tabla 4.6. Porcentaje de severidad de la pudrición de la raíz en arveja y cilantrillo.....	135
Tabla 4.7. Prueba DAS ELISA específica para <i>Pythium ultimum</i> realizada en plantas de arveja del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad. ....	136
Tabla 4.8. Prueba DAS ELISA específica para <i>Pythium ultimum</i> realizada en plantas de cilantrillo del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad. ....	137
Tabla 4.9. Concentración del ADN obtenido de las plantas de arveja inoculadas con <i>P. dissotocum</i> en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad .....	139
Tabla 4.10. Concentración del ADN obtenido de las plantas de cilantrillo inoculadas con <i>P. dissotocum</i> en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.....	140

Tabla 4.11 Detección de <i>Pythium dissotocum</i> en tejido vegetal de plantas de arveja mediante PCR convencional y de alta fidelidad.....	141
Tabla 4.12. Detección de <i>Pythium dissotocum</i> en tejido vegetal de plantas de cilantrillo mediante PCR convencional y de alta fidelidad .....	143
Tabla 4.13. Número y porcentaje de plantas inoculadas de arveja y cilantrillo en la que se detectó a <i>P. dissotocum</i> con PCR convencional .....	149
Tabla 4.14. Número y porcentaje de plantas inoculadas de arveja y cilantrillo en la que se detectó a <i>P. dissotocum</i> con PCR de Alta Fidelidad.....	151
Tabla 4.15. Diluciones seriales para la identificación de <i>P. dissotocum</i> con PCR convencional y de Alta Fidelidad. Primer Ensayo .....	154
Tabla 4.16. Diluciones seriales para la identificación de <i>P. dissotocum</i> con PCR convencional y de Alta Fidelidad. Segundo Ensayo .....	155

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Páginas</b>
Figura 2.1 Síntomas observados en tomate proveniente del municipio de Aguada en la muestra identificada como 1287. A) Pudrición y necrosis del sistema vascular con presencia de exudado B) Marchitez general de la planta. C) Pérdida de firmeza de las hojas. ....	37
Figura 2.2. Síntomas observados en tomate proveniente del municipio de Lares en la muestra identificada como 1290. A) Pudrición del sistema vascular. B) Marchitez severa, C) Clorosis, necrosis en el borde de la hoja y pérdida de firmeza en las hojas. ....	38
Figura 2.3. Prueba de Oxidasa. Resultados oxidasa negativos obtenidos con el aislado 1287: 1, 2, 3, 4 y con el aislado 1290: 5 y 6. ....	39
Figura 2.4. Tinción de Gram. Resultados Gram negativos obtenidos en el aislado 1287:1, 2, 3 y el aislado 1290: 4, 5, 6 y 7. ....	39
Figura 2.5. Tira serológica (ImmunoStrip Test, Agdia, Inc.) indicando la presencia de <i>R. solanacearum</i> . A) muestra 1290. B) aislado 9 de la muestra 1287. C) asilado 6 de la muestra 1287. D) aislado 2 de la muestra 1290.....	41
Figura 2.6. Producto de PCR observado en gel de agarosa para <i>R. solanacearum</i> utilizando los cebadores 759f y 760r. Marcador molecular de 2000 bp, control positivo (C+) aislado 993 (Coamo), control negativo agua molecular para PCR, aislados bacterianos 1290-1, 1290-2, 1290-5, 1287-2, 1287-7, 1287-8, 1287-9, 1287-6 y 1287-10 (Aguada). La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 280 bp.....	44
Figura 2.7. Prueba de producción de ácido a partir de disacáridos y alcoholes con los aislados 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares) de <i>R. solanacearum</i> . A) Resultados positivos de la producción de ácido a partir de dextrosa: aislados 2, 9, 6 y control negativo. B) Resultados positivos de la producción de ácido a partir de trehalosa: aislados 2, 9, 6 y control negativo. C) Resultados negativos de la producción de ácido a partir de sorbitol: aislados 2, 9, 6 y control negativo.....	47

Figuras 2.8. Severidad observada en las pruebas de patogenicidad en el 1er y 2do ensayo utilizando la escala 1-4. A) Severidad 2: hoja inferior marchita, necrosis en el tallo y lesiones necróticas de color café; B) y C) Severidad 1: planta sana, vigorosas con tejido verde, sin síntomas visuales y severidad 4: planta muerta, presencia de exudado bacteriano. D); e) Severidad 3: estrangulamiento y constricción del tallo; E) y F) Severidad 3: amarillamiento y marchites de hojas, hojas inferiores amarillas, exudado y constricción o estrangulamiento del tallo. .... 52

Figura 2.9. Producto de PCR observado en gel de agarosa que comprueba la presencia de *R. solanacearum* en el tejido de plantas de tomate el primer ensayo de las pruebas de patogenicidad: escalera (ladder) controles C1, C2, C3, positivo y plantas inoculadas 6 (6.1 y 6.2), 7 (7.1 y 7.2), 12 (12.1 y 12.2), 14 (14.1 y 14.2) y 15 (15.1 y 15.2). A) PCR convencional B) PCR de alta fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 280 bp. .... 58

Figura 2.10. Productos de PCR en gel de agarosa que comprueba la presencia de *R. solanacearum* en el tejido de tomate en el primer ensayo de las pruebas de patogenicidad: escalera (ladder) controles C1, C2, C3, positivo y plantas inoculadas: 1 (1.1 y 1.2), 5 (5.1 y 5.2), 8 (8.1 y 8.2) y 16 (16.1 y 16.2). A) PCR convencional. B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 280 bp. .... 59

Figura 3.1. Síntomas del Enverdecimiento de los cítricos en la Estación Experimental de Juana Díaz. A) Árbol de limón con síntomas de amarillamiento en las hojas, B) árbol de limón con síntomas de amarillamiento de las hojas, ramas y reducción del tamaño de la planta, C) Huerto de limón con síntomas del Enverdecimiento de los cítricos y D) Mosaico y clorosis en hojas de limón. E) Deformación del tejido foliar, patrón de mosaico y clorosis. G) Amarillamiento y reducción del tamaño del fruto . .... 84

Figura 3.2. Porcentaje de muestras positivas para *Ca. L. asiaticus* con las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad. Muestras Positivas incluyen: PCR convencional, y de Alta Fidelidad y PCR de Alta Fidelidad. Ejes Y: Porcentajes del total de muestras analizadas, muestras positivas y negativas para *Ca. L. asiaticus* ..... 95

Figura 3.3. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI2. Ladder (1kb bp), control negativo C - , control positivo C+, (Juana Díaz), muestras provenientes de Ciales: C3-10Y, C3-6S, C3-7S, C3-8S, C3-9S, C3-3<sup>a</sup>, C3-5A, C3-4A, C3-1A y C3-2A. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 1160 bp. 96

Figura 3.4. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C -, control positivo C+, (Juana Díaz), muestras provenientes de Isabela: 343, 344, 345, 346 y 347, Adjuntas: 395 y 397, Juana Díaz: Vivero JE, J. Díaz lima, J. Díaz limón y Sabana Grande. A) PCR convencional y B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 1160 bp..... 97

Figura 3.5. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C -, control positivo C+ muestra 899, (Adjuntas), muestras provenientes de Adjuntas ADR, Corozal: 915 y Juana Díaz: JD R. A) PCR convencional y B) PCR de Alta Fidelidad La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 1160 bp. .... 98

Figura 3.6. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C -, control positivo C+, (Juana Díaz), muestras provenientes Ciales: C1, C3, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C8 y C10. A) PCR convencional y B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 1160 bp. .... 99

Figura 3.7. Porcentaje de muestras positivas para *Ca. L. asiaticus* con las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad. Muestras positivas incluyen: HI-FI, PCR y Hi-FI. .... 103

Figura 4.1. Micelio de *Pythium dissotocum* en medio de cultivo PDA con Rifampicin y Pimaricin 2,5 %. A. asilado 1271 y B. asilado 1272. .... 124

Figura 4.2. *Pythium dissotocum* a1-7. Oogonia terminal y subglobosa (20.55  $\mu\text{m}$ ), b2-6 Oopora globosa y aplerotica (17.18  $\mu\text{m}$ ), c1-3 anteridios monoclinos y sésiles (100x). A y C. Nomarski. B, D y E. Contraste interdiferencial (DIC). .... 124

Figura 4.3. *Pythium dissotocum* a1-3 espora enquistada (21.51  $\mu\text{m}$ ). b1-2 tubo germinativo (100x). A. Nomarski. B y C. Contraste interdiferencial (DIC)..... 125

Figura 4.4. *Pythium dissotocum* a1-2 hifa (10.12  $\mu\text{m}$ ). b1-3 esporangia filamentosa con forma dendroide (100X). A, B y D. Contraste interdiferencial (DIC) y C. Nomarski. Describir las estructuras. .... 125

Figura 4.5. Gel de agarosa para la determinación de *Pythium dissotocum* utilizando los cebadores ITS-1 y ITS-4. Ladder (1 Kb), control negativo C - , pocillos 1, 2 y 3: Aislado 1271 y pocillos 4, 5 y 6: Aislado 1272. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 280 bp..... 128

Figuras 4.6. Severidad de la pudrición de la raíz en el 1er y 2do ensayo en arveja utilizando la escala 1-9. A: a1, a2 y a3 síntomas de marchitez en el tejido foliar en los niveles de severidad 3, 4 y 5 respectivamente. B: b1 severidad 3 = 10% de necrosis, b2 severidad 5 = 25% de necrosis, C: c1 severidad 50% de necrosis y c2 severidad 9 = mayor al 50% de necrosis y marchitez del tejido foliar..... 132

Figuras 4.7. Severidad de la pudrición de la raíz en el 1er y 2do ensayo en cilantrillo utilizando la escala 1-9. A: a1 y a2 severidad 1= raíz sana, 0% de necrosis en la raíz, B: b1 y b2 severidad 3 = 10% de necrosis, C: c1 y c2 severidad 5 = 25% de necrosis, D: d1 y d2 severidad 7 = 50% de necrosis y E: e1 y e2 severidad 9 = mayor al 50% de necrosis y marchitez del tejido foliar. 133

Figura 4.8. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde el tejido de plantas de arveja inoculadas. Escalera (ladder) controles C-, C+ y plantas inoculadas I1, I3, I4 y I5. A) PCR convencional B) PCR de alta fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Primer ensayo de las pruebas de patogenicidad ..... 144

Figura 4.9. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde el tejido de plantas de arveja inoculadas. Escalera (ladder) controles C+, C1, C2, C3 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. A) PCR convencional B) PCR de alta fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad..... 145

Figura 4.10. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde el tejido de plantas de cilantrillo inoculadas. Escalera (ladder) A) PCR convencional controles C+, C1, C2, C3 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. B) PCR de alta fidelidad controles C+, C1 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Primer ensayo de las pruebas de patogenicidad.... 146

Figura 4.11. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde el tejido de plantas de cilantrillo inoculadas. Escalera (ladder) A) PCR convencional controles C+, C1, C2, C3 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. B) PCR de alta fidelidad controles C+, C1 y plantas inoculadas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.  
 .....147

Figura 4.12. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde ocho diluciones seriales de ADN de la muestra 1271. Primer Ensayo A) PCR convencional y B) PCR de alta fidelidad controles de C- (control negativo), (1)  $10^0$ , (2)  $10^{-1}$ , (3)  $10^{-2}$ , (4)  $10^{-3}$ , (5)  $10^{-4}$ , (6)  $10^{-5}$ , (7)  $10^{-6}$ , (8)  $10^{-7}$ , (9)  $10^{-8}$ . La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. .... 155

Figura 4.13. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde ocho diluciones seriales de ADN de la muestra 1271. Segundo Ensayo A) PCR convencional y B) PCR de alta fidelidad controles de C- (control negativo), (1)  $10^0$ , (2)  $10^{-1}$ , (3)  $10^{-2}$ , (4)  $10^{-3}$ , (5)  $10^{-4}$ , (6)  $10^{-5}$ , (7)  $10^{-6}$ , (8)  $10^{-7}$ , (9)  $10^{-8}$ . La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. .... 156

Figure 4.14 Curva de calibración de las ocho diluciones seriales. Primer Ensayo..... 157

Figure 4.15. Curva de calibración de las ocho diluciones seriales. Segundo Ensayo..... 157

## LISTA DE APÉNDICES

Apéndices	Páginas
Apéndice 1.1. Patógenos identificados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes .....	21
Receta para la preparación de medios de cultivo.....	72
<i>Ralstonia solanacearum</i> .....	72
Apéndice 2.1. Medio de cultivo Agar Nutritivo (NA).....	72
Apéndice 2.2. Medio selectivo con tetrazolium CPG Y TZC .....	72
Apéndice 2.3. Media de cultivo base para la diferenciación de <i>Ralstonia solanacearum</i> basado en la diferenciación de carbono. Acumulación de Poli-B-hydroxybutyrato (PHB) Medio Mineral .....	73
Apéndice 2.4. Medio de cultivo Agar suave (Soft Agar) .....	73
Apéndice 2.5. Medio de cultivo YDC (glucosa yeast extract calcium carbonate agar.....	74
<i>Pythium</i> spp.....	168
Apéndice 3.1. PDA Potato Dextrosa agar.....	168
Apéndice 3.2. Agar Agua.....	168
Apéndice 3.3. Medio de cultivo V8 clarificado .....	169
Apéndice 3.4. Diámetro promedio de 20 oogonias, oosporas, oosporas germinadas e hifas de <i>Pythium dissotocum</i> .....	170

## CAPÍTULO 1

### JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN GENERALES DE LA TESIS

#### JUSTIFICACIÓN

La introducción de plagas y enfermedades nuevas representan una amenaza para la agricultura de Puerto Rico. Debido a la localización estratégica de la Isla, el turismo y las condiciones medioambientales favorables para las enfermedades en plantas existe un riesgo constante de nuevas introducciones de patógenos. En la última década en Puerto Rico, se ha reportado la presencia de nuevas enfermedades. Algunos ejemplos son la “sigatoka negra” en banano causada por *Mycosphaerella fijiensis* (Irish et al., 2006), *Dolabra nepheliae* agente causal de la enfermedad del cancro del tallo (“stem canker disease”) que afecta al rambután (*Nephelium lappaceum* L.) y al litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) (Sapindaceae) (Rossman et al., 2007 y 2009), *Phytophthora colocasiae* afectando al taro (Ortiz et al., 2007), *Phytophthora palmivora*, agente causal de la enfermedad conocida como mazorca negra (black pod), afectando al cacao (Irish and Goenaga, 2007), *Candidatus liberibacter asiaticus* (Estévez de Jensen et al., 2009), que afecta los cítricos, la marchitez súbita de la sandía (Rodrigues et al., 2009). Estas enfermedades han sido descritas y caracterizadas debido a la capacidad de los diferentes laboratorios en la Isla de detectar e identificar los organismos causales utilizando métodos tradicionales y moleculares. En ocasiones la presencia de un patógeno en el tejido del hospedero puede pasar sin ser detectado a pesar de que este se encuentre presente o este en estado latente e inclusive observándose la expresión de los síntomas. Esto dificulta al personal oficial de inspección en los aeropuertos detectar enfermedades ya que muchas veces el síntoma de la enfermedad no es visible. En otros casos la humedad y la temperatura las cuales son críticas en el proceso de una enfermedad hacen que en el hospedero no muestre síntomas o signos ya que el patógeno puede estar dormante. Durante esta fase es difícil identificar el organismo causal de la enfermedad utilizando métodos convencionales como por ejemplo el aislamiento del patógeno en medio artificial. Estos métodos de identificación pueden ocasionar errores en la identificación y como consecuencia pueden producir la introducción de enfermedades exóticas como es el caso de agentes patogénicos. En el caso de parásitos obligados que no pueden ser aislados, la rapidez

del diagnóstico es aún más crítica. Por lo que, las técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son de gran utilidad. Sin embargo los contenidos de las células del hospedero (compuestos orgánicos e inorgánicos) y el ADN genómico del hospedero pueden interferir con la eficiencia del PCR (Vincelli y Tisserat, 2008; Wilson, 1997), haciendo el diagnóstico a partir del tejido del hospedero muy difícil y por lo tanto la obtención de resultados correctos imposible.

Los métodos de identificación de los agentes causales de las enfermedades con métodos tradicionales requieren tiempo y personal con experiencia (Ma y Michailides, 2007; McCartney et al., 2003). La identificación molecular basada en la PCR con el uso de iniciadores (“*primers*”) específicos puede acortar el tiempo para la identificación de patógenos (Borman et al., 2008; Ma y Michailides, 2007; McCartney et al., 2003; Taylor et al., 2002).

Las técnicas de diagnóstico basadas en el estudio del material genético como la PCR convencional y de alta fidelidad (“High Fidelity PCR”) actualmente son utilizadas en Fitopatología y han demostrado ser de gran utilidad en estudios de patógenos en cultivos destinados a la actividad agrícola y hortícola (Borman et al., 2008; Ma y Michailides, 2007; McCartney et al., 2003; Taylor et al., 2002; Vincelli y Tisserat, 2008). Estas técnicas por su sensibilidad permiten detectar bajos niveles de material genético, incluso desde una simple espora; permitiendo identificar al patógeno a partir del tejido del hospedero en infecciones latentes (Vincelli and Tisserat, 2008).

La PCR de alta fidelidad demuestra ser más sensible y eficiente que la PCR tradicional. Esta técnica permite amplificar secuencias de diferente tamaño y evitar la interferencia de material genómico de otros organismos mediante el uso de cebadores específicos en una concentración alta (100X). Además, es de gran utilidad para estudios relacionados con mecanismos de resistencia, variación de poblaciones y la exposición de los cultivos a los distintos inóculos en forma confiable (Harmon et al., 2003; Hilgenboecker et al., 2008; Jeyaprakash et al. 2004; McCartney et al., 2003; Njambere et al., 2010; Pareja et al., 2008). La utilización de las técnicas basadas en la PCR es eficiente en la identificación oportuna de patógenos.

En esta investigación se implementarán protocolos para la identificación de bacterias y oomicetos, utilizando PCR de alta fidelidad y se comparará con la PCR convencional. Estos protocolos serán de gran importancia para evitar la introducción y diseminación de

enfermedades exóticas a la Isla, así como para establecer protocolos que puedan apoyar la detección oportuna y la disponibilidad de un sistema fitosanitario de inspección y de la implementación de medidas cuarentenarias efectivas.

Con el propósito de detectar e identificar patógenos utilizando la PCR convencional y la de alta fidelidad los objetivos de esta investigación fueron:

- 1- Comparar la eficiencia y sensibilidad de las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y de alta fidelidad para la identificación de bacterias y oomicetos a partir de tejido del hospedero.
- 2- Implementar la PCR de alta fidelidad para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* el agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos.
- 3- Desarrollar protocolos de PCR de Alta Fidelidad para la identificación de *Ralstonia solanacearum* a partir de tejido del tallo de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de *Pythium* spp. a partir de tejido de la raíz del cilantrillo (*Coriandrum sativum*) y arveja (*Pisum sativum*).

## **DISEÑO DE LA TESIS**

Esta investigación será presentada en cuatro capítulos. Un capítulo introductorio y tres capítulos que cubren la investigación realizada con tres diferentes patosistemas: *Ralstonia solanacearum* afectando tomate, *Candidatus Liberibacter asiaticus* en cítricos y *Pythium* spp. en arveja y cilantrillo. Cada capítulo, se basa en un estudio comparativo de las técnicas de PCR convencional y de alta fidelidad aplicadas a la identificación de los tres patógenos estudiados.

El primer capítulo está relacionado con la revisión de literatura. En ella se describen los aspectos relacionados con la importancia del diagnóstico oportuno de organismos fitopatógenos, los métodos convencionales de diagnóstico y una descripción de las técnicas de PCR convencional y de alta fidelidad.

Cada uno de los capítulos posteriores profundiza en la descripción del patógeno, la metodología utilizada para su identificación y caracterización, los resultados obtenidos con las

técnicas de PCR convencional y de alta fidelidad y su interpretación, incluyendo aspectos específicos de cada patógeno según sea necesario detallar sus particularidades intrínsecas

## **INTRODUCCIÓN**

### **Diagnóstico e Identificación de enfermedades**

El diagnóstico de los patógenos en los cultivos es de gran importancia para la prevención y manejo de epidemias. Sin el establecimiento y aplicación de métodos de diagnóstico eficientes se generan múltiples limitaciones al desarrollo y mejoramiento de las actividades agrícolas como la generación de variedades resistentes, la prevención de las enfermedades e implementación de estrategias de manejo integrado. En la actualidad debido a la diversidad de patógenos que pueden infectar un cultivo y a la variabilidad en el tipo y grado de severidad que estos producen, el diagnóstico de patógenos aún presenta dificultades (Kolombet et al., 2006).

El diagnóstico e identificación de patógenos se realiza con métodos convencionales y moleculares (Kolombet et al., 2006). Los métodos convencionales desarrollados para el diagnóstico de enfermedades comprenden la observación de los signos y síntomas, seguida de la identificación en el laboratorio mediante el aislamiento del microorganismo patogénico a partir del tejido afectado en medios de cultivo selectivos y la identificación morfológica del organismo causal con el uso de microscopía de luz. Los métodos serológicos para la identificación de patógenos incluyen tiras serológicas específicas (Inmunostrips) y la técnica conocida como ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o “enzyme linked immunosorbent assay”).

El mecanismo de acción de las pruebas de la tira serológica Inmunostrip y ELISA se basa en la conjugación de un marcador enzimático con ligando que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario, produciendo un señal detectable que puede implicar una reacción de cambio en color o fluorescencia, la cual varía de acuerdo a la cantidad de antígeno presente. Mediante este mecanismo, es posible detectar y cuantificar la concentración de células de un organismo en cada mililitro (ml) de la suspensión que lo contiene mediante densidad óptica (Machmud and Suryadi, 2008). La tira serológica o Inmunostrip permite realizar un diagnóstico rápido del patógeno conlleva de 3 a 5 minutos en expresar el resultado por lo que es de gran utilidad en

condiciones de campo. La técnica ELISA es una de las más efectivas para detectar anticuerpos asociados con la infección de patógenos de plantas, debido a su rapidez y bajo costo además, no requiere de un equipo sofisticado y es aplicable bajo condiciones de campo (Agrios, 2005).

La técnica de ELISA ha demostrada ser efectiva para la identificación de patógenos como bacterias, por ejemplo *Clavibacter* spp. (Molina et al., 1993) y *Ralstonia solanacearum* (Pradhanang et al., 2000), oomicetos como *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp., y hongos como *Fusarium* spp, así como potyvirus (*Bean yellow mosaic virus*) (Koenig, 1981) y nepovirus (*Tobacco ring spot virus*) (Ling et al., 1991).

Para hacer más eficiente la técnica ELISA se han desarrollado nuevas tecnologías que implican variantes de esta técnica, entre las cuales están: ELISA indirecto, muy utilizado en la identificación de antígenos virales; ELISA de microplaca; PCR ELISA sensible para detectar secuencia virales; Das Elisa (doblé sándwich Elisa); y Tris (ELISA) (triple sándwich) también usados en un amplio rango de patógenos (Machmud and Suryadi, 2008)

Estos métodos, a pesar de haber sido aplicados durante varias décadas por su bajo costo, requieren de conocimientos de taxonomía de los oomicetos y hongos así como de pruebas bioquímicas para bacterias, además de pruebas de patogenicidad y rango de hospederos. Estos métodos presentan deficiencias generadas por varios factores: como la presencia de síntomas similares producidos por diferentes patógenos, condiciones fisiológicas que producen variabilidad en los patógenos y la similitud morfológica e incluso genómica entre patógenos. Estas deficiencias han permitido concluir que estos métodos no son lo suficientemente sensibles para identificación de especies y han incentivado al desarrollo de métodos alternativos con mayor eficiencia, sensibilidad y especificidad en la identificación y diagnóstico de patógenos (Álvarez, 2004; Duncan and Torrance, 1992; Kolombet et al., 2006; Ward et al., 2004).

En la última década se han desarrollado métodos basados en el uso de anticuerpos específicos para la identificación de patógenos, microscopía electrónica o con inmunofluorescencia y tecnologías moleculares basadas en la PCR. Estas técnicas han revolucionado las técnicas tradicionales de diagnóstico para patógenos como bacterias, fitoplasmas, oomicetos, hongos y virus (Álvarez, 2004; Duncan y Torrance, 1992; Kolombet et al., 2006; Ward et al., 2004).

Las técnicas moleculares basadas en la PCR poseen ciertas limitaciones: 1) requieren de interpretación crítica de los resultados de laboratorio debida a la obtención de falsos negativos y

positivos debido al uso de iniciadores sin una adecuada especificidad para la secuencia blanco del patógeno en cuestión y que puede generar una reacción cruzada al identificar también otras especies o cepas; 2) de una cantidad apropiada de muestras, 1 o 2 ul de la muestra para obtener resultados óptimos. La cantidad de muestra es de importancia para realizar un adecuado diagnóstico del patógeno; 3) Alta sensibilidad de la técnica de PCR a los residuos producidos como consecuencia de la amplificación exponencial de la secuencia blanco. Por esta razón se debe utilizar un control positivo con ADN templado de la cepa que se conoce (positivo) y un control negativo constituido por el buffer de extracción; 4) Inhibición de la PCR por componentes orgánicos o inorgánicos presentes en el tejido del hospedero, componentes de células microbianas y otros elementos; 5) También es necesario el uso de controles para tener la seguridad de que los falsos negativos no son producto de una reacción errada en el tubo. (Vincelli and Tisserat, 2008).

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

Desde el ingenio de su creador, Kary Mullis en 1983; la PCR constituye la técnica utilizada en todos los campos de la investigación científica, al trabajar eficientemente con el material genético de todos los organismos vivos: plantas, animales, bacterias, oomicetos, hongos y virus. La PCR es considerada como la técnica molecular fundamental en diferentes áreas de investigación, como son: medicina, biología evolutiva y de la conservación, zoología, ciencias ambientales, ecología y botánica (Arnheim et al., 1990), y en la agricultura, en donde es utilizada en la identificación de patógenos como bacterias, oomicetos, hongos, virus, fitoplasmas y nemátodos que infectan cultivos y plantas en general.

La PCR permite la síntesis y amplificación rápida de millones de copias de secuencias específicas de ADN para la identificación y caracterización del material genético de interés (Álvarez, 2004; Barnes, 1994; Duncan and Torrance, 1992; Harmon et al., 2003; Ward et al., 2004). La técnica de PCR consiste en una fase de desnaturalización en donde se expone al ADN a altas temperaturas (i.e. 94°C) logrando la separación de las dos cadenas de ADN. Luego se reduce la temperatura a 40 o 65°C lo cual permite que los iniciadores o cebadores (*primers*) específicos se acoplen a las cadenas separadas, uno en cada extremo de la región amplificada; estos iniciadores son los que proporcionan a la reacción su especificidad. Se produce la síntesis

de la nueva cadena de ADN que se extiende desde los iniciadores usando la ADN polimerasa termoestable (polimerasa *Taq*) y desoxiribonucleótidos de trifosfato (dNTPs). Después del primer ciclo de PCR el número de secuencias se duplica y en los siguientes ciclos se continúa con una amplificación exponencial de las secuencias. Los ciclos de PCR se repiten varias veces más de 30, dependiendo del protocolo a utilizar y dependiendo del organismo en estudio (Arnheim et al., 1990; Ward et al., 2004). El proceso completo toma pocas horas y genera millones de copias de la secuencia deseada que pueden ser verificadas en un gel de agarosa, mediante electroforesis o detección por ensayos colorimétricos (Ward et al., 2004).

En fitopatología, inicialmente la PCR fue utilizada para la identificación de bacterias crecidas en medio de agar nutritivo y paulatinamente fue desarrollándose y especializándose permitiendo la identificación directa a partir de tejido vegetal infectado (Kolombet et al., 2006). La técnica discrimina entre el material genético del microorganismo y del huésped para así amplificar secuencias específicas de microorganismos mediante el uso de iniciadores específicos, secuencias de ADN ribosomal o fragmentos ITS y por homología con otras secuencias (Ward et al., 2004).

La técnica de PCR ha evolucionado considerablemente con la creación de variantes optimizadas como: *Nested PCR*: implica dos ciclos consecutivos de PCR, en el segundo ciclo se utiliza iniciadores que permiten reconocer la región amplificada en los productos en el primer ciclo de PCR. El PCR de inmunocaptura (IC-PCR) el cual utiliza anticuerpos colocados sobre una placa o sobre un tubo de microcentrífuga usado para la captura de patógenos los cuales son detectados con PCR. Su sensibilidad y especificidad permite reducir problemas suscitados por la presencia de inhibidores en la muestra. Multiplex PCR utilizada para identificar varios patógenos simultáneamente, utilizando varios iniciadores específicos en la misma reacción la cual optimiza el tiempo y reduce el costo. Transcriptasa en reverso-PCR o “Reverse Transcriptase-PCR” que permite utilizar copias de ADN que se generan a partir de RNA (Álvarez, 2004).

Numerosas investigaciones han empleado la PCR y sus variantes para la identificación de patógenos de plantas como en el caso de patógenos de cereales (Apendice 1.1). Entre estas investigaciones se destacan aquellas realizadas por Hogg et al. (2007 y 2010) y Chalupowicz *et al.* (2010) en las cuales se han obtenido resultados óptimos en cuanto a las mediciones de los

niveles de los transcritos de los genes seleccionados, analizados por PCR en tiempo real (Quantitative Real-Time o qRT-PCR).

La pudrición de la corona causada por *Fusarium* (FCR) en cultivos de trigo es una enfermedad persistente que produce graves pérdidas a nivel mundial y es causada por *Fusarium culmorum* y *F. pseudograminearum*. Recientemente se ha investigado la incidencia de esta enfermedad utilizando la técnica de qRT-PCR con iniciadores específicos para reconocer el gen de la trichodiene sintetasa (*tri5*) para ambas especies de *Fusarium* inoculadas en los cultivos experimentales (Hogg et al., 2007 y 2010). La técnica de qPCR demostró ser de gran eficiencia ya que logró identificar y cuantificar el ADN de las especies de *Fusarium* en los cultivos afectados y determinar la incidencia de FCR en los experimentos de campo.

También se ha estudiado la interacción existente entre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y las plantas de tomate *Solanum lycopersicum*, enfocándose en la expresión de la virulencia de la bacteria y los genes de defensa del hospedero en estadios tempranos de la infección (Chalupowicz et al., 2010). Los genes incluyen un plásmido de celulasa (*celA*), aserina proteasa (*pat-1*) y serina proteasa *chpC* y *ppaA* que residen en las islas de patogenicidad PAI *chp*/toma de la bacteria y su expresión fue evaluada utilizando qRT-PCR con cebadores específicos diseñados a partir del alelo ID y el programa Premier BioSoft International. Los resultados de esta investigación reportaron cambios transcripcionales en los genes de la planta confirmando la presencia de factores de virulencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* durante el período inicial de la infección así como también se reportó la transcripción de genes selectos del tomate que pueden estar asociados con la defensa.

Sin embargo, a pesar de la eficiencia de la PCR, se han reportado dos limitaciones de la técnica: 1) la fidelidad del producto final; y 2) el tamaño del producto amplificado, limitado a 5 Kb. Estas limitantes de la PCR se han resuelto en gran parte con la incorporación de una innovadora técnica de High Fidelity PCR cuyo procedimiento permite la amplificación eficiente de fragmentos de ADN en presencia de grandes cantidades de ADN genómico (Barnes, 1994)

## **PCR de Alta Fidelidad**

El PCR de Alta Fidelidad ha demostrado ser una técnica específica y sensitiva al lograr una amplificación de secuencias de gran tamaño como 35 Kb mediante el uso de marcadores

moleculares específicos (Barnes, 1994; Persad, 2004). La incorporación de una Taq polimerasa con actividad exonucleasa 3' con capacidad de remover mutaciones que pudieran suscitarse en el proceso o sea una polimerasa *Hot Start High Fidelity* o *Fast Start high fidelity* modificadas, las cuales forman parte esencial de una reacción general ("*Master Mix*" específico) y garantizan la eficiencia de la amplificación del ADN con un incremento en la temperatura y el período de la fase de desnaturalización (Barnes, 1994). Particularmente el uso de la enzima con actividad exonucleasa 3' y del "*master mix*" que contiene una Taq polimerasa modificada, permiten la amplificación eficiente de secuencias de interés (blanco o "*target*") de ADN con variedad de tamaños. Además optimiza el proceso de PCR reduciendo su tiempo, especialmente durante la fase de extensión que tarda solamente 20 segundos y disminuyendo la necesidad de optimizarlo (Barnes, 1994).

En medicina esta técnica ha sido muy utilizada para la identificación de secuencias específicas del genoma humano o secuencias relacionadas con enfermedades o deficiencias. Ha hecho posible la identificación de secuencias blanco en el genoma humano mediante el uso de un "*master mix*" especial. Este "*master mix*" contiene iniciadores específicos de 1.1 kb a 4.8 kb permitiendo la amplificación de las secuencias blanco de diferentes longitudes sin requerir de ajustes individuales en la composición de los reactivos. También, ha logrado identificar eficientemente secuencias relacionadas con la susceptibilidad a enfermedades como por ejemplo polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), considerados como exitosos marcadores de ADN de poblaciones genéticas (Hori et al., 2003) o mutaciones de ADN mitocondrial asociados con la enfermedad de miopatía mitocondrial (Kollberg et al., 2005). Los SNPs han sido identificados mediante el PCR de alta fidelidad gracias al uso de, iniciadores (*primers*) Scorpion y una Taq polimerasa TaqMan con término de corrección de errores "*mismatches*" 3'; que solventan errores que pueden producirse durante el ciclo de amplificación (Hori et al., 2003). Las mutaciones del mtADN relacionadas con la mutación POLG1 que posee una afección en uno de los dominios exonucleasa de la polimerasa han sido identificadas en fibras musculares de pacientes con miopía mitocondrial y a deficiencias en la citocromo oxidasa (COX) de las fibras de músculo (Kollberg et al., 2005).

La PCR de Alta Fidelidad se ha utilizado también para analizar la abundancia de las poblaciones de ciertos insectos como *Lopolexis oregmae* utilizado como un control biológico clásico del *Toxoptera citrida*, un áfido de los cítricos importante para la transmisión del virus de

la tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza Virus* - CTV). En este estudio la técnica de PCR de alta fidelidad utilizó iniciadores como el ITS 2, logrando identificar de manera óptima a especímenes de *L. oregmae* y *Toxoptera citrida*. Durante esta investigación, para completar el análisis de las secuencias se realizó clonación y secuenciación de los fragmentos de material genético de interés, y posteriormente se realizó el análisis filogenético usando secuencias específicas y comparando diferentes poblaciones o especies (Hoy et al., 2007).

Actualmente, la técnica del PCR de Alta Fidelidad ha sido utilizada para la identificación de organismos fitopatógenos, y se ha convertido en una herramienta importante para el diagnóstico de enfermedades y afecciones producidas por oomicetos, hongos, bacterias y virus (Harmon et al., 2003).

La PCR de alta fidelidad ha sido utilizada para estudios realizados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, un importante patógeno de tomate que afecta al sistema vascular de la planta. Estas investigaciones se han enfocado en la detección y determinación del efecto de la enzima tomatinasa proveniente de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, la cual genera un alto grado de virulencia en las plantas de tomate debido a productos de detoxificación. Esta enzima ha sido reportada también en otros patógenos como: *Gibberella pulicaris*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, y *Streptomyces turgidiscabies* (Pareja et al., 2008).

Esta técnica ha logrado la identificación de secuencias de nucleótidos completas pertenecientes a bacterias como *Wolbachia* spp. (Hilgenboecker et al., 2008) y a plásmidos lineares que pueden degradar cepas de bacterias (Parschat et al., 2007). Tanto en la identificación de *Wolbachia* spp, bacteria intracelular de muchas especies de insectos, como en la identificación de los plásmidos bacterianos, los resultados fueron eficientes. Se logró identificar a *Wolbachia* spp. en las especies de insectos analizadas y se determinó la presencia de los plásmidos lineares en bacterias gran positivas como *Arthrobacter nitroguajacolicus*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces* spp., *Rhodococci*, *Mycobacteria*, *Planobispora rosea*, y los patógenos de plantas *Clavibacter michiganensis*, y *Terrabacter* sp (Hilgenboecker et al., 2008) Parschat et al., 2007).

En estudios con virus también se ha utilizado la técnica de PCR de Alta Fidelidad para la detección de genes virales involucrados en la mediación de la resistencia de la planta ante el ataque de estos patógenos. Se utilizó una técnica de RT-PCR que utiliza la transcriptasa reversa con iniciadores específicos y una enzima *Taq polymerase* de alta fidelidad denominada *Platinum*

*high fidelity polymerase* para identificar un *Benyvirus* BNYVV infectando las raíces de la variedad RZ1 de remolacha (*Beta vulgaris*). El virus genera un bloqueo en el alelo dominante del gen RZ1, favoreciendo la expresión del alelo recesivo rz1 el cual produce el defecto en el mecanismo de defensa (Acosta, 2009).

Se ha determinado que la técnica de PCR de Alta Fidelidad es mucho más sensitiva que la técnica convencional de PCR; particularmente en la identificación de patógenos (Hilgenboecker et al., 2008), ya que ha logrado resolver ciertas limitaciones de la PCR convencional causada por la interferencia del material genómico de otros organismos contaminantes. Por ejemplo los ácaros como contaminantes en los medios de cultivo, la ambigüedad de ciertos iniciadores lo cual perjudica la fidelidad de la técnica, el tamaño de la secuencia amplificada y la eficiencia de la enzima *Taq* polimerasa convencional.

La aplicación del PCR de Alta Fidelidad representa un importante avance en las técnicas de diagnóstico de enfermedades. Esta técnica puede utilizar nanotubos de carbón carboxilido (Carbon nanotubes - CNTs) lo cual tiene efectos excelentes porque al añadir una suspensión acuosa en estos CNTs podría aumentar la conductividad termal en el ciclo de PCR logrando un rápido equilibrio termal y una transferencia de calor con convección (Zhang et al., 2008).

## **Organismos fitopatógenos estudiados**

*Ralstonia solanacearum* es el agente causal de la marchitez bacteriana en el tomate. Es una bacteria Gram negativa habitante del suelo que afecta a un amplio rango de hospederos en ambientes tropicales y subtropicales en todo el mundo (Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006; Martin and French, 1997; Tans-Kersten et al., 2001). Esta bacteria produce incuantificables pérdidas económicas (Tans-Kersten et al., 2001). En Puerto Rico se reportó la presencia de *R. solanacearum* afectando tomate (Krausz and Thurston, 1975; Poussier et al., 2000 y 2001). La identificación de *R. solanacearum* se realizó por morfología, pruebas bioquímicas, utilización de una fuente de carbón, pruebas ELISA, BIOLOG® y pruebas de patogenicidad. Sin embargo las técnicas moleculares basadas en PCR han demostrado mayor eficiencia (Hernández, 2010; Poussier et al., 2000; Schaad et al., 2001; Tans-Kersten et al., 2001).

Las medidas de control para *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 en papa comprenden: el establecimiento de áreas de cuarentena para los lugares de producción de semillas, ésta medida

afecta la economía de las regiones en cuarentena (Martin and French, 1997); la aplicación de control biológico utilizando microorganismos como por ejemplo *Bacillus vallismortis* (Hernández, 2010; Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006) o *Bacillus subtilis* (Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006); la rotación de cultivos; la eficiente técnica de solarización, que consiste en la exposición al sol luego de ser cubierta de plásticos de polietileno mediante mecanización del área infectada; y la técnica más eficiente, el mejoramiento genético mediante ADN recombinante y marcadores moleculares (Hernández, 2010).

***Candidatus Liberibacter asiaticus*** es el agente causal del Enverdecimiento de los cítricos, Citrus Greening o Citrus Huanglongbing (HLB). Es una proteobacteria Gram negativa, fastidiosa, no cultivable y limitada al floema de la planta. El HLB se ha extendido progresivamente en todo el mundo desde en año 1951 cuando fue reportada por primera vez en Asia. En Puerto Rico, se reportó la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por primera vez en el año 2009 (Estévez de Jensen et al., 2009). La identificación del patógeno se realiza mediante la observación de los síntomas característicos de la enfermedad, la prueba de yodo (González et al., 2008), microscopia electrónica, utilización de sustancias fluorescentes específicas, ELISA, pruebas de patogenicidad (El-Tarabily et al., 2011) y PCR utilizando iniciadores para la región 16S del ADN ribosomal (Das y Singh, 2007; Deng et al., 2008; Jagoueix et al., 1994 y 1996; Karunasagar et al., 2004; Manjunath et al., 2008).

La identificación y el manejo de la enfermedad es difícil, sin embargo se realiza control del vector, el psílido *Diaphorina citri* (Pluke et al., 2005). El control biológico del psílido varía según su distribución geográfica, sus depredadores incluyen mariquitas (Coleoptera: Coccinellidae); avispas de las flores (Diptera: Syrphidae); crisopas (Neuroptera: Chrysopidae, Hemerobiidae); y arañas (Aranae). El mejor agente de control biológico del *D. citri* es el parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hall, 2008; McFarland y Hoy, 2001).

***Pythium spp.*** Es el agente causal de pudrición de raíces y semillas y damping-off en muchas plantas de importancia económica (Agrios, 2005; All – Shtayeh, 1986). Las especies del género son generalistas por lo afectan un amplio rango de hospederos y alcanza una distribución cosmopolita (All – Shtayeh, 1986; Van Der Plaats-Niterink, 1981). La identificación de las especies de *Pythium* sea ha realizado eficientemente mediante morfología, microscopia, serología utilizando pruebas ELISA específicas, pruebas de patogenicidad y con mayor

eficiencia y exactitud mediante PCR amplificando la región del espaciador intergénico ITS (Kageyama et al., 1997).

Para prevenir la enfermedad se deben mejorar las medidas fitosanitarias en invernaderos; mejorar el drenaje y prevenir la irrigación especialmente en periodos de alta lluvia; desinfectar las bandejas de siembra, equipos, mesas de trabajo y superficies de contacto con las semillas y plantas trasplantadas; evitar el exceso de agua y nutrientes; mantener un balance de las aplicaciones del nitrógeno en las mismas cantidades que el potasio; realizar aplicaciones foliares de nutrientes; y control químico con: fungicidas sistémicos como fosetil AL, ácido fosfórico, entre otros (Koike et al., 2007; Elliott y Harmon, 2011). En cultivos en el campo se puede aplicar la rotación de cultivos y mantener buenas condiciones de drenaje (Koike et al., 2007). También se pueden aplicar estrategias de control biológico en el caso de las cucurbitáceas se aplica un tratamiento con la bacteria *Pseudomonas putida* (Pal y McSpadden, 2006) o el micoparásito *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams 2001 (Shinya et al., 2008). El control de *Pythium* a nivel de invernadero se realiza a través de suelo esterilizado y pasteurizado por vapor o calor seco (Agrios, 2005).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R., Bryan, B., Smith, J. and Rush, C. 2009. Breakdown of Host Resistance by Independent Evolutionary Lineages of *Beet necrotic yellow vein virus* Involves a Parallel C/U Mutation in Its p25 Gene. *Phytopathology* 100 (2):127-133.
- Agrios, G. 2005. Diseases caused by Oomycetes. Chapter eleven: Plant Diseases caused by fungi. *Plant Pathology* 5ta. Ed. Academic Press. New York . pp: 409-415.
- Álvarez, A. M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2004. 42:339–66.
- All – Shtayeh, M. S. 1986. The Genus *Pythium*. In the West Bank and Gaza Strip. The Research and Documentation Centre, An: Najah National University, Nablus pp: 2-4.
- Arnheim, N., White, T. and Rainey, W. 1990. The virtually unlimited uses of PCR in evolutionary biology, zoology, botany, animal behavior, conservation biology, environmental science, and ecology. In: *Application of PCR: Organismal and Population Biology. BioScience* 4:174-182. Bailey, A. M., Mitchell, D. J., Manjunath, K. L., Nolasco, G. and Niblett, C. L. 2002.
- Barnes, W. M. 1994. PCR amplification of up 35 kb ADN with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2216-2220.
- Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J. and Johnson, E. M. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 Suppl. 1, 17–112
- Chalupowicz, L., Chen Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Sessa, G., Barash, I. and Sasson, M. 2010. Sequential Expression of Bacterial Virulence and Plant Defense Genes During Infection of Tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 100 (3): 253-261.
- Das, A. K., Rao, C. N. and Shyam Singh. 2007. Presence of citrus greening (Huanglongbing) disease and its psyllid vector in the North-Eastern region of India confirmed by PCR technique. *Curr. Sci.* 92 (12): 1759-1763.
- Deng, X., Chen, J. and Li, H. 2008. Sequestering from host and characterization of sequence of ribosomal RNA operon *rrn* from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Molecular and Cellular Probes* 22: 338–340.

- Duncan, J. M. and Torrance, L. (eds), 1992. Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens,- Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh: 235 .
- Dyer, R.B., Kendra, D. F., Brown, D. W. 2006. Real-time PCR assay to quantify *Fusarium graminearum* wild-type and recombinant mutant DNA in plant material. Journal of Microbiological Methods 67: 534–542.
- El-Tarabily, K. A., Abouzeid, M. A., Hardy, G. E. ST. J and Sivasithamparam, K. 2011. *Pythium sulcatum* and *P. ultimum* as causal agents of cavity spot disease of carrots in Egypt. Canadian Journal of Plant Science: 607-614.
- Estévez de Jensen, C., Vitoreli, A. and Roman, F., 2010. Citrus Greening in commercial orchards in Puerto Rico. Phytopathology. 100 S34.
- Estévez de Jensen, C., Roman, F., Abreu, E. Alvarado, A. y Ortiz, O. 2009. Presencia del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico. Resumen Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas. p. 5
- González, P. C., Etxeberria, Ed., Achor, D, Dawson, W., Spann, T., Yates, J. D. and Albrigo, D. 2008. Uso de la reacción almidón – yodo para la selección de hojas sospechosas con hlb: distribución anatómica de niveles anormalmente altos de almidón en arboles de naranja valencia positivos al HLB. Horticultural Sciences Department , University of Florida, IFAS, Citrus Research and Education Center, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, Florida 33850.
- Hall, D. G. 2008. Biological control of *Diaphorina citri*. I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter spp*) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) pp. 1-7. Hermosillo, Sonora. México.
- Harmon, P. F., Dunkle, L. D. and Latin, R. 2003. A Rapid PCR-Based Method for the Detection of *Magnaporthe oryzae* from Infected Perennial Ryegrass. Plant disease 87 (9): 1072-1076.
- Hernández, J. J. 2010. Análisis de la diversidad genética de *Ralstonia solanacaerum* y su relación con la virulencia en Plátano, Amenaza en Venezuela. Producción Agropecuaria/Biotecnología-Fitoprotección 3 (1): 19-29.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? a statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett 281: 215–220.

- Hogg, A. C., Johnston, R. H. and Dyer, A. T. 2007 Applying Real-Time Quantitative PCR to *Fusarium* Crown Rot of Wheat. *Plant diseases* 91(8): 1021-1028.
- Hogg, A. C., Johnston, R. H., Johnston, J. A., Klouser, L., Kephart, K. D. and Dyer, A. T. 2010. Monitoring *Fusarium* Crown Rot Populations in Spring Wheat Residues Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 100 (1): 49-57.
- Hori, K., Shin, W. S, Hemmi, C., Toyoko-oaka, T., and Makino, T. 2003. High Fidelity SNP Genotyping Using Sequence-Specific Primer Elongation and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4: 477-484.
- Hoy, M. A., Jeyaprakash, A., and Nguyen, R. 2001. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological control* 22:278-287.
- Hoy, M, Jeyaprakash, A., Clarke-Harris, D. and Rhodes, L. 2007. Molecular and field analyses of the fortuitous establishment of *Lipolexis oregmae* (Hymenoptera: Aphidiidae) in Jamaica as a natural enemy of the brown citrus aphid. *Biocontrol Science and Technology* 17(5): 473-482.
- Irish, B. Goenaga, R. and Ploetz, R. 2006. *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka of *Musa* spp., Found in Puerto Rico and Identified by Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 90:684.
- Irish, B. M. and Goenaga. R. 2007. First report of *Phytoptora palmivora*, Causal Agent of Black Pod, on Cacao in Puerto Rico. *Plant Disease* 91 (8): 1051.
- Jagoueix, S.; Bove, J. M and Garnier, M. 1994. The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus. Is a Member of the a Subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (3): 379-386.
- Jagoueix, S., Bove, J. M. and Garnier, M. 1996. Techniques for the Specific Detection of the Two Huanglongbing Greening) *Liberobacter* Species: ADN/ADN Hybridization and ADN Amplification by PCR. *Mol. Cell. Probes* 10: 43-50.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M. A. 2004. Multiple displacement amplification in combination with *high-fidelity PCR* improves detection of bacteria from single females or eggs of *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae). *Journal of invertebrate pathology* 86 (3): 111-116.

- Kageyama, K., Ohyama, A. and Hyakumachi, M. Detection of *Pythium ultimum* Using Polymerase Chain Reaction with Species-Specific Primers. *Plant Disease* 81(10): 1155-1160.
- Karunasagar, D., Balarama- Krishna, M. V., Maruthi- Mohan, P. and Arunachalam, J. 2004. Rapid detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) disease using PCR. *Current Science* 87 (9): 1183-1185.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 55: 53-62.
- Kolombet, L. V., Kolesova, D. A. and Chmyr, P. G. 2006. Diagnostics of phytopathogen infection in agricultural plants as a necessary condition for optimizing current fungicide application technologies. *Journal of Agricultural Technology* 2(1): 99-110.
- Kollberg, G., Jansson, M., Perez-Bercoff, A., Melberg, A., Lindberg, C., Holme, E., Reza Moslemi, A. and Oldfors, A. 2005. Low frequency of mtDNA point mutations in patients with PEO associated with POLG1 mutations. *European Journal of Human Genetics* 13: 463–469.
- Koike, S. T., Gladders, P. and Paulus, A. O. 2007. *Pisum sativum*- Fungal diseases caused by *Pythium* spp. *Vegetal Disease A color Handbook* Academic Press. pp.282
- Krausz, J. P. and Thurston, D. 1975. Breakdown of Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Tomato. *Phytopathology* 65: 1272-1274.
- Lwin, M. and Ranamukhaarachchi, S. L. 2006. Development of Biological Control of *Ralstonia solanacearum* Through Antagonistic Microbial Populations. *Int. J. Agri. Biol.* 8(5): 657-659.
- Ma, Z. and Michailides, T. J. 2007. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 26: 145–161.
- Machmud, M. and Suryadi, Y. 2008. Detection and identification of *Ralstonia solanacearum* strains using the indirect ELISA technique. *Indonesian journal of Agriculture* 1 (1): 13-21.
- Manjunath, K. L, Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S. and Lee, R. F. 2008. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and Its Importance in the Management of Citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98 ( 4): 387-396.

- Martin, C. and French, E. R., 1985. Bacterial wilt of potato *Ralstonia solanacearum*. Take technical information. Centro Internacional de la papa. Bulletin No 13 Sec. 2 -97.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A. and Ward, E. 2003 Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Management Science Special Issue: Crop protection science at the Institute of Arable Crops Research 59 (2): 129–142.
- McFarland. C. D. and Hoy, M. A., 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus Aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. *Florida Entomologist* 84(2): 227-233.
- Molina, A., Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *Federation of European Biochemical Societies* 316 (2): 119-122.
- Massomo, S.M.S.; Nielsen H.; Mabagala R.B.; Mansfeld-Giese K.; Hockenhull J.; Mortensen C.N. 2003. *European Journal of Plant Pathology* 109(8): 775-789.
- Njambere, E., Attanayake, Rained Chen, W. 2010. Chapter 4: Applications of molecular markers and DNA sequences in identifying fungal pathogens of cool season grain legumes. In: *Molecular Fungal Identification* edit by Gherbawy, Y. and Voigt, K. Springer Heidelberg London New York pp 79-92.
- Pal, K. K. and McSpadden, B. G. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* 1-25.
- Parschat, K., Overhage, J., Strittmatter, J., Henne, A., Gottschalk, G. and Fetzner, S. 2007. Complete Nucleotide Sequence of the 113-Kilobase Linear Catabolic Plasmid pAL1 of *Arthrobacter nitroguajacolicus* Ru'61a and Transcriptional Analysis of Genes Involved in Quinaldine Degradation. *Journal of Bacteriology* 89 (10): 3855–3867.
- Pareja, Y., Roncero, I. and Ruiz, C. 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants. *MPMI* 21 ( 6): 728–736.
- Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. C. and Fox, R. T. V. 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology* 49: 414-422.

- Persad, A. B., Jeyaprakash, A., and Hoy, M. A. 2004. High-fidelity PCR assay discriminates between immature *Lipolexis oregmae* and *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae) within their aphid hosts. *Florida Entomologist* 87(1): 18-24.
- Poussier, S. Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. and Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679–1692
- Poussier, S. and Luisetti, J. 2001. Specific Detection of Biovars of *Ralstonia solanacearum* in Plant Tissues by Nested-PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology* 106 (3): 255-265.
- Romero, G., Estévez de Jensen, C., Palmateer, A. 2011. Detection of citrus greening with Hi-fidelity PCR. *Phytopathology* 101:S278.
- Rossmann, A.Y., R. Goenaga, and L. Keith. 2007. First Report of *Dolabra nepheliae* on Rambutan and Litchi in Hawaii and Puerto Rico. *Plant Disease*. 91(12): 1685.
- Schadd, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition . APS PRESS. pp. 151-166.
- Shinya R., Watanabe, A., Aiuchi, D., Tani, M., Kuramochi, K., Kushida, A. and Koike, M. 2008. Potential of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains as biological control agents for soybean cyst nematode: Is protoplast fusion an effective tool for development of plant-parasitic nematode control agents?. *Japanese Journal of Nematology* 38 (1):9-18.
- Taylor R.K., Tyson, J.L., Fullerton, A.R. and Evas, N.C. 2002. Detección molecular de exóticas fitopatógenos: un estudio de caso Protección Fitosanitaria de Nueva Zelanda 55:53-57.
- Tans-Kersten, J., Huayu Huang, Allen, C., 2001. *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. *Journal of Bacteriology* 183 (12): 3597–3605.
- Triplett, L. R., Zhao, Y. and Sundin, G. W. 2006. Genetic Differences between Blight-Causing *Erwinia* Species with Differing Host Specificities, Identified by Suppression Subtractive Hybridization. *Applied and environmental microbiology*: 7359–7364.

- Van Der Plaats-Niterink, N. J. 1981. Monograph of genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 1-242.
- Vincelli, P. and Tisserat, N. A. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. Plant Dis. 92 (5):660-669.
- Wang, W., Tang, J. H and Wang, Y. C. 2008. Molecular Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. Journal of Phytopathology (156): 431–437 .
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaue, B. A. and McCartney, H. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. Annual. Applied. Biology. 145:1-16.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Applied and Environmental Microbiology 63 (10): 3741–3751
- Zhang, Z., Zhang, J., Yuchao, Wang, Y. and Zheng, X. 2005. Molecular *detection of Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected *plant* tissues and soil. FEMS Microbiol Lett 249 (1): 39-47.
- Zhang, Z., Shen, C., Wang, M., Han, H. and Cao, X. 2008. Aqueous suspension of carbon nanotubes enhance the specificity of long PCR. BioTechniques 44: 537-545.

## APÉNDICES

### Apéndice 1.1

#### Patógenos identificados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes

Patógenos identificados mediante PCR y sus variantes	Descripción	Referencias bibliográficas
<i>Fusarium graminearum</i>	(Schweinitz) Petch	Dyer et al., 2006
<i>Fusarium poae</i>	(Peck) Wollenw	Kolombet et al., 2006
<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>	(Fron) Deighton	Kolombet et al., 2006
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	(Sacc.) Arx & D.L. Olivier, (1952)	Kolombet et al., 2006
<i>Magnaporthe oryzae</i>	(T.T. Hebert) M.E. Barr	Harmon et al., R. 2003
<i>Microdochium nivale</i>	(Schaffnit) E. Müll	Kolombet et al., 2006
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	E.P. Van der Hoeven	Kolombet et al., 2006
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> .	Manns	Schaad et al., 2001
<i>A. tumefaciens</i>	Smith and Townsend Conn	Yacomi, et al., 2008
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Palleroni and Bradbury	Yacomi, et al., 2008
<i>Burkholderia cepaciae</i>	Palleroni and Holmes	Yacomi, et al., 2008
<i>Spiroplasma citri</i>	Saglio et al.	Yacomi, et al., 2008,
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	(Smith) Davis et al.	Chalupowicz <i>et al.</i> , 2010
<i>Xantomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	Hasse, 1915	Hartung et al., 1993
<i>Xantomonas. campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>	(Pammel) Dowson	Manulis et al., 1994
<i>Erwinia</i> sp.	Winslow et al 1920	Triplett, et al. 2006
<i>Xylella fastidiosa</i>	Wells et al., 1987	Rodrigues, et al., 2003
<i>Xanthomonas</i> sp.	Dowson 1939	Massomo et al. 2003
<i>Pantoea agglomerans</i>	(Ewing and Fife 1972) Gavini et al. 1989	Delétoile et al., 2009

## CAPÍTULO 2

### IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Ralstonia solanacearum*, AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA DEL TOMATE

#### RESUMEN

En el año 2010 se detectó la marchitez bacteriana del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en una finca comercial de Coamo afectando a 3,000 plantas. En huertos de los municipios de Aguada y Lares se presentaron síntomas semejantes a los encontrados en la finca de Coamo, que incluyó desintegración del tejido vascular, necrosamiento de las yemas y marchitez de la planta. La identificación preliminar se realizó utilizando tiras serológicas específicas para *Ralstonia solanacearum*. La bacteria se aisló en medio de agar nutritivo (AN) y Cloruro de Trifenil Tetrazolio (CTTZ). Se realizó la identificación de la bacteria por características culturales, morfológicas, serología y mediante PCR con los cebadores específicos 759 y 760. El biovar se identificó con pruebas bioquímicas. Los aislados 1287 de Aguada y 1290 de Lares presentaron un fragmento de 280 bp del gen 16S del ADN ribosomal. Los resultados de la secuenciación mostraron un 100% de homología con *Ralstonia solanacearum*. Los aislados se identificaron como biovar 1 por su producción de ácido láctico a partir de los carbohidratos: dextrosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, manitol, sorbitol, dulcitol y por la obtención de nitrito a partir de nitrato. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plántulas de tomate con la inoculación de los aislados 1287 y 1290 ( $10^{-8}$  UFC/ml). Los síntomas característicos de la enfermedad se observaron luego de 7 días de la inoculación. La prueba serológica DAS ELISA y, comparativamente las técnicas de PCR convencional y de alta fidelidad con los cebadores 759 y 760, comprobaron que los aislados obtenidos del tomate con síntomas de marchitez fueron identificados como *Ralstonia solanacearum*. Esta enfermedad representa un peligro para la producción del tomate en la Isla, su identificación es indispensable para evitar su propagación a otras especies de solanáceas.

**Palabras clave:** marchitez bacteriana, *Ralstonia solanacearum*, tomate, PCR

## **IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Ralstonia solanacearum*, THE CAUSAL AGENT OF BACTERIAL WILT IN TOMATO**

### **ABSTRACT**

In 2010 bacterial wilt was detected in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) at a commercial farm in Coamo affecting 3,000 plants. In orchards located in the municipalities of Aguada and Lares similar symptoms were found, including breakdown of vascular tissue, necrosis of the buds and wilting of the plant. Preliminary identification was performed with ImmunoStrip® for *Ralstonia solanacearum*. The bacterium was isolated on nutrient agar (NA) and triphenyl tetrazolium chloride (CTTZ). The identification of the bacteria was based on cultural and morphological characteristics, serology and PCR with specific primers 759 and 760. The biovar was identified with biochemical tests. Isolates 1287 from Aguada and 1290 from Lares presented a fragment of 280 bp from 16S ribosomal DNA. The sequencing results showed 100% homology with *Ralstonia solanacearum*. Isolates were identified as biovar 1 by its production of lactic acid from carbohydrates: dextrose, trehalose, maltose, cellobiose, mannitol, sorbitol, dulcitol and obtaining nitrite from nitrate. Pathogenicity tests were carried out on tomato seedlings, and after inoculation with isolates 1287 and 1290 at a concentration  $10^{-8}$  CFU/ml, similar symptoms of the disease were observed. The DAS ELISA serological test and comparatively standard PCR techniques and high-fidelity PCR with primers 759 and 760, found that the isolates obtained from tomato wilt symptoms were identified as *Ralstonia solanacearum*. This disease poses a threat to tomato production in the island, its early identification is essential to prevent its spread to other solanaceae species.

**Key word:** bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, tomato, PCR

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate es la hortaliza de mayor importancia económica en Puerto Rico con una producción anual en el año fiscal 2010 de 40000 Kg con un ingreso de \$14 millones. Las áreas de mayor producción se encuentran en la Costa Sur: Guánica, Santa Isabel y Yauco. La marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) es causada por una bacteria Gram negativa habitante del suelo, *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Tans-Kersten et al., 2001). Anteriormente, la bacteria era conocida como *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (Vasse et al., 2009), *Burkholderia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al., 1992) o *Bacterium solanacearum* (Smith) Chester (EPPO, 2003).

*Ralstonia solanacearum* posee un amplio rango de hospederos, afectando 200 familias de plantas incluyendo cultivos importantes como papas, tomate, maní, tabaco, bananas y plátanos, así como otras especies nativas (Martin y French, 1997; Poussier et al., 2000). *Ralstonia solanacearum* produce la marchitez bacteriana (“bacterial wilt”) es una enfermedad devastadora en ambientes tropicales y subtropicales en Asia, África, América Central y Sudamérica (Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006; Martin y French, 1997). Las pérdidas producidas por esta enfermedad son enormes y no han podido ser cuantificadas por su largo e indocumentado impacto en la agricultura y por el abandono de los cultivos susceptibles a esta pudrición en muchas partes del mundo (González et al., 2009; Martins et al., 2005; Poussier et al., 1999; Tans-Kersten et al., 2001).

*Ralstonia solanacearum* difiere en su rango de hospederos, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas. Su complejidad genética ha llevado a clasificarla en cinco biovares y razas (Gómez et al., 2005; González et al., 2009; Ji et al., 2006). La raza 1 (biovares 1, 2 ó 4) ocurre en América tropical y afecta un gran número de plantas incluyendo la batata, el tomate y solanáceas en general. La raza 2 (biovares 1 ó 3) ocurre principalmente en el trópico en zonas de Sudamérica afectando al plátano y a la heliconia, y la raza 3 (biovar 2) afecta la papa, el tomate y el geranio, ocurre en las latitudes altas de los trópicos y subtrópicos, y zonas templadas. Esta raza 3 es considerada específica a la batata. La raza 4 afecta el jengibre y la raza 5 es específica de la mora (Gómez et al., 2005; González et al., 2009; Hernández, 2010; Ji et al., 2006; OEPP/EPPO, 2004; Williamson, 2002).

La bacteria ingresa a través de heridas creadas por la emergencia lateral de las raíces (Tans-Kersten et al., 2001), agua de riego, esorrentía, insectos, canales de drenaje y podas, entre

otras (Hernández, 2010). Se mueve sistemáticamente a través del xilema a todos los órganos de la planta produciendo pudrición, retraso en el crecimiento y amarillamiento del follaje. Cuando la pudrición se desarrolla rápido la planta se pudre completamente. El tallo de las plantas infectadas muestra rayas necrosadas de color marrón y un exudado lechoso (Martin y French, 1997; Schaad et al., 2001). La necrosis puede generalizarse y producir la muerte de la planta (Hernández, 2010; Tans-Kersten et al., 2001). A pesar de que la bacteria puede infectar la planta, ésta se puede presentar asintomática, debido a la virulencia de la cepa, las condiciones ambientales y los genes de avirulencia *Avr* que intervienen en la reacción de susceptibilidad del hospedero (Hernández, 2010).

La identificación de la bacteria se realiza utilizando medios de cultivo semiselectivos, pruebas bioquímicas como lo es la utilización de celobiosa, maltosa, lactosa, oxidación de los alcoholes hexosa, dulcitol, manitol y sorbitol, acumulación de Poly-B-hydroxybutyrate (PHB), reducción de nitrato, y gas proveniente del nitrato. Además se utilizan pruebas serológicas y de patogenicidad (Poussier et al., 2000; Schaad et al., 2001; Tans-Kersten et al., 2001). Recientemente se utiliza PCR para su diagnóstico mediante la amplificación de la secuencia 16S de rRNA de *R. solanacearum* (González et al., 2009; Martins et al., 2005). La técnica de PCR de Alta Fidelidad ha demostrado ser más eficiente y sensible que el PCR convencional. En ciertas investigaciones la técnica de PCR de Alta Fidelidad demostró ser más sensible que la técnica de PCR convencional en seis ordenes de magnitud amplificando el ADN de la bacteria simbionte *Wolbachia* en presencia del ADN del artrópodo hospedero, *Tetranychus urticae* (Jeyaprakash y Hoy, 2000). La PCR de Alta Fidelidad también ha demostrado su eficiencia comparada con la técnica de PCR convencional en la detección del agente causal del Enverdecimiento de los Cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus* en presencia del ADN de la planta hospedera, del psílido vector *Diaphorina citri* y del parasitoide del psílido (Hoy et al., 2001). La ventaja de la PCR de Alta Fidelidad evita la interferencia con material genético contaminante en la muestra analizada con el uso de iniciadores específicos concentrados (Jeyaprakash y Hoy, 2000; Hilgenboecker et al., 2008; McCartney et al., 2003; Njambere et al., 2010; Pareja et al., 2008).

La marchitez bacteriana constituye una de las principales limitaciones en la producción del tomate en los trópicos y subtrópicos, convirtiéndolo en el cultivo más estudiado en cuanto a la infección por *R. solanacearum* (González et al., 2009; Martins, et al., 2005; Poussier et al., 1999). Las pérdidas económicas causadas por *R. solanacearum* en el cultivo del tomate han sido

cuantiosas en algunos países como Taiwan, las cuales estas fluctúan entre 15 a 26%. En la India se produjo de un 10 a 100% de mortalidad en tomate y hasta 91% de pérdidas. En Uganda hasta el año 1998 el 98% de las granjas visitadas estaban infectadas con la bacteria. En Australia se ha reportado de un cinco hasta el 70% de pérdidas. En Estados Unidos, en Carolina del Sur se estiman pérdidas anuales del 15% de los campos afectados. (Elphinstone, 2005). En Puerto Rico se ha reportado a *R. solanacearum* afectando al tomate (Krausz y Thurston, 1975; Poussier et al., 1999). Recientemente se reporta también en heliconia (Norman et al., 2009) La importancia, agresividad e impacto económico de las enfermedades causadas por *R. solanaceraum* en todo el mundo, hace indispensable contar con técnicas de detección precisas para evitar su diseminación. Las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad han demostrado ser eficientes en la identificación de microorganismos fitopatógenos permitiendo superar las limitaciones de los procedimientos convencionales de identificación que requieren del asilado de patógeno en medio de cultivo para su posterior caracterización morfológica, pruebas bioquímicas y serológicas. La ventaja de las técnicas moleculares es que evitan errores que pueden generarse con las técnicas convencionales de identificación ocasionando situaciones peligrosas en el caso de agentes selectos (Vickers et al., 1996; Vincelli y Tisserat, 2008; Wilson, 1997). Además, las técnicas moleculares permiten acortar el tiempo requerido para la identificación exacta del patógeno mediante el uso de iniciadores generales y específicos, disminuyendo el tiempo y la inversión de personal con experiencia que se requieren en los procedimientos convencionales (Borman et al., 2008; McCartney et al., 2003).

Los objetivos de esta investigación fueron los siguientes:

- 1.- Identificar y caracterizar al agente causal de la marchitez del tomate mediante caracterización morfológica, serológica y molecular utilizando PCR convencional comparativamente con la PCR de alta fidelidad.
2. Desarrollar un protocolo de PCR de Alta Fidelidad para identificar a *R. solanacearum* directamente a partir de tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicon*).

3. Comparar la eficiencia y sensibilidad entre la PCR convencional y la de Alta Fidelidad en la identificación de *R. solanacearum* a partir del tejido vegetal de plantas de tomate.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de las muestras y sintomatología**

Las muestras de tomate y de suelo fueron obtenidas de fincas de productores localizadas en los municipios de Coamo, Aguada y Lares, Puerto Rico. Las muestras del municipio de Aguada fueron colectadas en Bo. Cerro Gordo, Sector Guzmán, con coordenadas geográficas: Latitud N 18°20'5.04", Longitud W 67° 8'41.35", ubicada a 139.59 metros sobre el nivel del mar. Estas plantas provienen de semillas de la compañía Harris Seed®, USA, fueron ingresadas a la Clínica de Diagnóstico de la Universidad de Puerto Rico en Juana Díaz con el número de muestra 1287. Las muestras del municipio de Lares provienen de un huerto de hidropónicos de tomate ubicado en la carretera 129 Km 9.6 cuyas coordenadas geográficas son: Latitud N 18°17'15.71", Longitud W 66°53'24.00", ubicada a 454.46 metros sobre el nivel del mar. Las muestras fueron ingresadas con número 1290. Las muestras del municipio de Coamo fueron recolectadas en una finca de tomate ubicada Box HC1 7109. Sus coordenadas geográficas son: Latitud N 18° 04'47.86", Longitud W 66° 21'28.61", con una elevación de 126.1872 metros sobre el nivel del mar. Se describieron y anotaron los síntomas observados en todas las muestras recolectadas.

### **Aislado de *Ralstonia solanacearum***

El tallo del tomate con pudrición bacteriana se cortó en secciones de 1 cm, el tejido se desinfectó colocando 1 minuto en alcohol etílico y 2 minutos en agua destilada estéril, el tejido se dejó reposar por 20 minutos en agua destilada estéril para obtener una suspensión de bacteria. Con un asa de platino se obtuvo una gota de la suspensión bacteriana, se transfirió a medio de cultivo de agar nutritivo (AN) [15 g/L (Difco)] (Schaad et al., 2001) (Apéndice 2.1). Los platos petri se incubaron a 28°C por 48 horas y luego se aislaron colonias bacterianas -y se transfirieron a nuevo medio de AN (Apéndice 2.1) (Schaad et al., 2001) y medio semi-selectivo para *R. solanacearum* compuesto por caseína hidrolizada, peptona, glucosa, agar y una solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TZC) al 1% (Schaad et al., 2001) (Apéndice 2.2).

Las colonias fueron purificadas de acuerdo al siguiente procedimiento: Se tomó una colonia aislada crecida en NA y TZC, se colocó en caldo nutritivo y se agitó hasta obtener una suspensión homogénea. Se sembró una porción de la suspensión bacteriana en NA y TZC. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento cada 24 horas, 2 veces adicionales (Schaad et al., 2001)

## **Identificación Morfológica y Bioquímica**

### **Tinción de Gram**

A partir de colonias puras se efectuó la tinción Gram (Schaad et al., 2001). Se utilizó un asa de platino desinfectada previamente para tomar una porción de cada aislado bacteriano y se depositó la muestra sobre una laminilla o portaobjetos. Se flameó la laminilla o portaobjetos para fijar la muestra. Se colocó sobre la muestra el colorante cristal violeta al 1% por un minuto a temperatura ambiente, luego se enjuagó con agua destilada estéril. Se colocó una gota de lugol, compuesto por yodo y yoduro de potasio (KI), durante 3 minutos, se enjuagó con gotas de decolorante alcohol-acetona. Se lavó la muestra con agua destilada estéril para retirar el exceso de decolorante y se fijó exponiéndola al mechero. Se realizó la tinción de contraste utilizando safranina durante 1 minuto, se enjuagó con agua y se fijó. Finalmente se observó la muestra al microscopio para observar la coloración y forma de las colonias. Las bacterias Gram negativas adquieren una coloración rojiza mientras que aquellas catalogadas como Gram positivas conservan la coloración azul (Schaad et al., 2001).

### **Prueba de KOH y de Oxidasa**

Para la prueba de KOH se seleccionaron colonias puras pertenecientes al grupo de las Gram-negativas. En una laminilla o portaobjetos se colocó una gota del KOH al 3% y luego se suspendió una colonia pura de 24 horas de crecimiento. Las colonias que formaron un hilo mucoso luego de levantarlas con un mondadientes fueron consideradas Gram negativas (Marenda et al., 1998). Posteriormente se realizó la prueba de oxidasa con las colonias Gram negativas (Schaad et al., 2001). Se seleccionaron colonias de 24 h de crecimiento, y se colocó una gota de la suspensión bacteriana en un papel filtro con una solución acuosa de dicloro de tetrametil paradifineldiamina al 1% (Dhital et al., 2001). Las colonias que se tornaron púrpuras en 1 min fueron consideradas oxidasa positivas y fueron catalogadas como miembros del género *Ralstonia*

## **Crecimiento a 40°C**

El crecimiento se determinó por la ausencia o presencia de colonias bacterianas en el medio TZC al incubarlas a 40°C durante 24 horas. Las colonias que no tuvieron crecimiento óptimo en medio TZC a 40°C fueron consideradas como miembros de los géneros: *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xhantomonas*, *Xylophilus*, *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Streptomyces* (Schaad et al., 2001).

## **Identificación mediante Pruebas de Serología**

### **Tira serológica (ImmunoStrip®)**

Para realizar el diagnóstico preliminar de la bacteria se utilizó una tira serológica específica para *R. solanacearum* (BID-Rs ImmunoStrip® Test, Agdia, Inc., Indiana, USA). Esta prueba se realizó en muestras de plantas sintomáticas de tomate (1287 y 1290). Se tomó una porción de 0.5 mm del tallo y se colocó en una bolsa de malla conteniendo 1 ml de solución salina de fosfato. Se maceró hasta que el tejido vegetal estuvo completamente triturado y homogéneo. Se colocó la tira serológica en contacto directo con la suspensión del buffer y el tejido vegetal macerado siguiendo las instrucciones del fabricante. Ésta se dejó reposar durante algunos minutos hasta observar la presencia de una banda de color violeta que indica la reacción positiva la cual se determina por la presencia de dos líneas mientras que el negativo presenta una sola línea (Champoiseau, 2008; Ji et al., 2006).

### **ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

Se utilizó un PathoScreen® ELISA específico para *R. solanacearum* (PathoScreen®Kit, Agdia, Indiana, USA; Numero de catálogo: PSP 33900), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Para el procesamiento de las muestras provenientes de plantas infectadas se colocó el tejido (aprox. 1cm de tejido) en bolsas plásticas conteniendo con 1 ml de buffer GEB (General Extraction Buffer) y se maceró el tejido. En el caso de colonias puras, a partir de colonias individuales de un cultivo puro, se removió una porción de la colonia con el asa de una aguja y se colocó en un tubo conteniendo agua destilada estéril hasta lograr una dilución de  $10^8$  CFU/ml según recomendado por fabricante.

De la suspensión del buffer con la colonia, o del tejido macerado se colocaron 100 µl de cada una de las muestras en cada fosa de la placa ELISA, previamente sensibilizada con el antisuero para el patógeno), se incluyó el control positivo (Agdia, Indiana, USA; Número de catálogo: PSP 33900) y el control negativo compuesto por el buffer general de extracción, GEB. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, luego se realizó el lavado con solución salina de fosfato con Tween 20 (buffer PBST = Phosphate Buffered Saline with Tween 20 o PBST-20X) 1 X por 8 veces consecutivas, y se eliminó todo el residuo del buffer de las fosas evitando que quedaran residuos de agua y burbujas.

Luego se colocaron 100 µl del conjugado enzimático de peroxidasa en cada uno de las fosas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de ELISA se lavó y secó adecuadamente. Finalmente se colocaron 100 µl de la solución del sustrato TMB, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad hasta observar la reacción de color. Luego se realizó una lectura de la absorbancia con un lector de ELISA (Modelo ELX808, 24 V, 48 Watts, Biotek) para cada muestra y en base a una comparación con ambos controles (positivo y negativo).

## **Identificación Molecular**

### **Extracción y amplificación del ADN**

#### **Colonias Puras de *R. solanacearum***

La extracción del ADN se realizó a partir de colonias puras de *R. solanacearum* de 24 a 36 horas de crecimiento, las cuales se suspendieron en 100 µl de buffer PBS y se homogenizaron en un vórtex. Posteriormente la suspensión se colocó en un Baño María a 96°C por 5 minutos para la fragmentación y lisis de las membranas celulares. Esta suspensión se centrifugó a 12,000 rpm por dos minutos y se obtuvo el sobrenadante. Para realizar el PCR convencional y de Alta Fidelidad se utilizó directamente una dilución de 1ml de agua molecular y una porción de la colonia pura seleccionada. Se homogenizó con un vórtex a 12,000 rpm. Las muestras fueron almacenadas a -20°C (VWR Scientific, VWR Company, USA).

#### **Tejido Vegetal**

Las muestras obtenidas del tejido vegetal se colocaron en un tubo de colección de 2 ml con esferas de vidrio (Eppendorf AG Hamburg, Germany) y 100 µl de buffer de extracción (RED- Extract buffer, REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich Saint Louis,

Misouri). Se homogenizó el tejido en un agitador (1247W CELL DIS - BioSpec Mini Bead Beater) por 5 a 10 minutos. Se incubó la mezcla en Baño María a 95°C por 10 minutos. Se colocaron 100 µl del buffer de dilución (REDE Dilution buffer). Se realizó una dilución utilizando 180 µl de agua molecular y 20 µl del producto de extracción. Finalmente se almacenó el producto de la extracción así como la dilución a -20°C.

### **Determinación de la densidad óptica del ADN**

Para determinar la concentración del ADN, se midió la densidad óptica de cada una de las muestras analizadas utilizando un lector de absorbancia (Eppendorf® BioPhotometer plus, Eppendorf Hamburg, Germany). Se realizaron diluciones para obtener una concentración uniforme de 20 nm en todas las muestras. A partir de estas diluciones se realizó la amplificación del ADN de *R. solanacearum* mediante la técnica de PCR convencional y de alta fidelidad así como la comparación entre ambas técnicas.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación del ADN de *R. solanacearum* se realizó mediante PCR convencional. cuya reacción consistió de 12,5 µl de la mezcla maestra (*master mix*) traducir Go Green Tag (Promega. Madison, WI), 2.50 µl del iniciador 759f (5'- GTCGCCGTCAACTCACTTTCC -3'), 2.50 µl del iniciador 760r (5'-GTCGCCGTGTCAGCAATGCGGAATCG -3'), y 2.50 µl de agua molecular para PCR. Se utilizó un termociclador modelo T 3000 (Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). El volumen total de reacción fue de 25 µl, conteniendo: 20 µl de mezcla del master mix Go Green Tag y 5 µl del ADN de cada una de las muestras. Se incluyó como control positivo al aislado 993 procedente del municipio de Coamo. La identificación del aislado 993 fue confirmada por el laboratorio de APHIS PPQ, en Beltsville, USA. El control negativo consistió en agua molecular libre de nucleasas. El PCR consistió de una temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min seguida de treinta ciclos de: 94°C por 1 min (desnaturalización), 55°C por 1min 30 sec (hibridación), 72°C 1 min (extensión). Finalmente, se mantuvo la reacción a 72°C por 10 min y a 4°C por tiempo indefinido (Fegan et al., 1998; Poussier y Luisetti, 2011).

Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) con 4 µl de 0.5% de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, Missouri). Se realizó

una electroforesis a 100 V, 400 amperios por 35 min, utilizando el buffer amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó una cámara visualizadora de rayos ultravioleta y el programa Quantity One, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con un marcador molecular de 2000 bp (Easy Ladder1 BIO-BIO-33046 - Bioline, USA Inc.).

### **PCR de alta fidelidad (Hi-Fi PCR)**

Para el PCR de alta fidelidad (Hi-Fi PCR) se utilizaron tres buffers: “Buffer Mix, Enzyme Mix y Template Mix” que fueron preparados de la siguiente manera:

**Buffer Mix:** Se añadió 1.75 µl de dNTP, 8 µl del iniciador 759f (5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC -3'), 8 µl del iniciador 760r (5'-GTCGCCGTCAAGCAATGCGGAATCG -3') y 12 µl de ddH<sub>2</sub>O.

**Enzyme Mix:** Se añadió 1 µl de Taq y 0.2 µl de Accuzyme (Accuzyme, Cat. No. BIO-21051, BIO-21052, Bioline USA Inc).

**Template Mix:** Se añadió 5 µl de PCR buffer (Acuzyme), 1 µl de Enzyme Mix, 12.25 µl de ddH<sub>2</sub>O.

La reacción final consistió de 29.75 µl de Buffer Mix, 18.25 µl de Template Mix y 2 µl de ADN, para un total de 50 µl.

Los ciclos y los tiempos de amplificación para el PCR de Alta fidelidad fueron los siguientes: temperatura inicial 94°C, desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 10 ciclos de: 94° C 10 secs. (desnaturalización), 56° C 30 secs., 68° C 1min; 25 ciclos de 94°C 10 secs. (desnaturalización), 56°C 30 secs., 68° C 1 minuto (hibridación) y finalmente a 4°C por tiempo indefinido (Hoy et al., 2001; Jeyaprakash y Hoy, 2000).

### **Identificación del Biovar de *R. solanacearum***

Se preparó un medio base para las pruebas de los carbohidratos (Apéndice 2.3) hasta obtener una solución homogénea. Se ajustó el pH de 7.0 a 7.1 (color verde oliváceo del medio de cultivo) añadiendo solución de hidróxido de sodio al 40%. El medio se colocó en tubos de ensayo con capacidad para 20 ml y se esterilizó en un autoclave a 121°C por 20 o 30 min, se

enfrió a 55 o 60°C (Schaad et al., 2001). Se preparó una solución acuosa al 10% de cada una de las fuentes de carbohidrato: dextrosa, trehalosa, maltosa, cellobiosa, manitol, sorbitol y dulcitol. Se esterilizó el dulcitol a 110°C por 20 min. Los demás carbohidratos se esterilizaron por filtrado. La solución de carbohidrato tuvo una concentración final del 1% y fue añadida en cantidad suficiente en el medio base caliente (1 ml del 10% de la solución acuosa en 90 ml del medio base). Después de mezclar bien se colocaron 3 ml del medio basal con los carbohidratos dentro de los tubos esterilizados y se esperó que solidifiquen (Schaad et al., 2001).

El inóculo se preparó transfiriendo las colonias bacterianas de 24 a 48 horas crecidas en medio de cultivo TZC. Se utilizaron tres a cinco ml de agua estéril para obtener una concentración de  $10^8$  CFU/ml de la siguiente manera:

- Se añadieron 20  $\mu$ l de la suspensión de bacterias en la superficie del medio de cultivo en cada uno de los tubos.
- Se incubó el inóculo a 28 y 32 °C.
- Se examinaron los tubos a los 3, 7, 14 y 28 días después de la inoculación. Un cambio en el pH, indicado por un cambio de color a verde oliváceo desde el extremo del medio hacia abajo indicó una reacción positiva.

Con los azúcares hexosa y dextrosa se produjo un cambio de color a amarillo (pH ácido <6) indicando oxidación de carbohidratos que ocurre a partir del tercer al quinto día, otros biovars pueden tomar hasta 28 días en oxidar disacáridos. Los tubos inoculados se compararon con un control no inoculado para comparar los cambios de color.

### **Conservación de las cepas**

Para la conservación de las colonias individuales de *R. solanacearum*, las colonias puras se multiplicaron en AN y agar levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC) (Apéndice 2.5), luego de 48 horas se transfirieron a tubos conteniendo agar suave (Zapata, comm. pers.) se sellaron con parafina y se almacenaron 10 tubos por cada cepa a 4° C.

### **Purificación del producto de PCR para la secuenciación**

La purificación del producto del PCR se realizó utilizando el Kit de purificación de ADN (QIAquick PCR Purification Kit Protocol de QIAGEN, Qiagen, California). Se añadieron 5

volúmenes del buffer PB por cada volumen del producto de PCR y luego de homogenizar con un vórtex, se colocó la mezcla en un tubo QIAquick (spin column) y se centrifugó por 60 segundos a 13,000 rpm, se descartó el filtrado y se conservó el tubo colector y el filtro. Se añadieron 750 µl del buffer PE en la columna QIAquick y se centrifugó por 60 segundos a 13,000 rpm. Se descartó el filtrado y se conservó la columna y el tubo colector. Luego se centrifugó la columna por 1 min adicional. Se colocó el filtro de la columna QIAquick en un nuevo tubo de 1.5 ml, se añadieron 30 µl de buffer EB en el centro de la columna, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm, posteriormente se almacenó el filtrado que constituye el ADN purificado.

### **Análisis de la región 16 S del ADN ribosomal**

La secuenciación del fragmento de ADN se realizó en MacroGen, Inc en Rockville, USA. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.1.3). Las secuencias obtenidas fueron editadas en el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3. Posteriormente se compararon con otras especies depositadas en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (para la sigla en inglés NCBI, GenBank) con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Pruebas de patogenicidad para *Ralstonia* spp.**

#### **Ensayo de patogenicidad y preparación del inóculo**

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron semillas de tomate variedad “*Beefsteak*” (Laurel Seeds Company, San Juan, Puerto Rico) germinadas en substrato comercial (PROMIX®). Estas fueron trasplantadas a tiestos de 907 gr de capacidad luego de 21 días. Las plantas se mantuvieron en un vivero durante el mes de mayo a una temperatura que fluctuó entre 23 a 31°C durante el mes de junio del 2011 (NOAA, 2012). El primer ensayo se inoculó con el aislado 9 proveniente de la muestra 1287 (12 de mayo de 2011). En el segundo ensayo se inocularon tres aislados puros, el 9 y 6 provenientes de la muestra 1287 y el aislado 2 proveniente del exudado bacteriano de la muestra 1290 (20 de junio de 2011). Los aislados fueron crecidos en medio de cultivo YDC por 24 horas. Se preparó una suspensión de la bacteria en agua destilada estéril y se midió la concentración en el lector de absorbancia equivalente a 1

$\times 10^8$  CFU/ml<sup>-1</sup> (Gómez et al., 2005) obtenida mediante diluciones seriales. Para esto se colocó 1 ml de agua destilada estéril en la placa petri que contenía el aislado seleccionado, se homogenizó utilizando un agitador o un aza de platino. La suspensión obtenida se colocó en 9 ml de agua estéril y correspondió a la dilución  $10^0$  o dilución matriz a partir de la cual se realizaron las diluciones seriadas tomando 1 ml de la dilución precedente colocándolo en 9 ml de agua estéril, hasta obtener la dilución  $10^8$ .

Se sembraron las diferentes diluciones bacterianas en AN, se observó el crecimiento a las 24 horas y se efectuó el conteo de colonias (Somasegaram y Hoben, 1994). La inoculación se realizó utilizando una jeringa estéril de 1 ml, las plantas de 21 días se inocularon en la base del tallo con 500  $\mu$ l de la suspensión bacteriana (Gómez et al., 2005). Se utilizaron 20 repeticiones por unidad experimental. Las plantas testigo se inocularon con 500  $\mu$ l agua destilada estéril.

La evaluación se realizó luego de la aparición de síntomas tales como flacidez de las hojas y marchites. Se realizó la evaluación a los 7 días después de la inoculación. Se utilizó una escala visual para determinar la severidad de 1 a 4, siendo 1= sana, sin síntomas visuales, vigorosas con tejido verde, 2 = una hoja inferior marchita, necrosis en el tallo y lesiones necróticas de color café, 3 = amarillamiento y marchites de hojas, hojas inferiores amarillas, exudado y constricción o estrangulamiento del tallo y 4 = planta muerta, presencia de exudado bacteriano (Ateka et al., 2001; Gómez et al., 2005). Luego de 7 días se re-aisló de tejido de las plantas sintomáticas seleccionando tres porciones por cada planta. La primera muestra se tomó de la porción en la zona de inoculación, la segunda porción aproximadamente a 2.54 cm más arriba del punto de inoculación y la tercera porción aproximadamente 2.54 cm más arriba de la segunda porción.

Se realizó una prueba ELISA utilizando un PathoScreen para *R. solanacearum* con la tercera porción. Se realizaron pruebas de PCR convencional y de Alta Fidelidad con la primera y segunda sección de tejido vegetal infectado siguiendo los protocolos descritos anteriormente. Para la identificación molecular se utilizó ADN extraído utilizando el kit DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) con una concentración de 20 ng/ml. Se compararon los resultados obtenidos de la identificación de *R. solanacearum* utilizando PCR convencional y de Alta Fidelidad en base a la presencia de bandas de ADN de 280 bp. Se utilizó un control negativo de agua molecular. Se determinaron las muestras positivas y negativas con las dos técnicas de PCR.

## **Determinación del número de células viables en un cultivo**

Se realizaron diluciones seriadas basadas en la cantidad total de células bacterianas viables con aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. Las diluciones seriadas se realizaron a partir de la solución base  $10^0$ . Esta dilución corresponde al cultivo puro de la bacteria, el cual se obtuvo al diluir totalmente el cultivo bacteriano con 1 ml de agua estéril (Somasegaram y Hoben, 1994). Las diluciones subsiguientes fueron desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ . Se transfirió 1 ml de cada una de las diluciones a AN y con un asa de platino se esparció la dilución en forma homogénea. Se obtuvieron un total de 9 placas petri de las diluciones:  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ . Se observó el crecimiento bacteriano a las 12, 24 y 48 horas y se realizó un conteo del número de colonias presentes en cada plato. Para obtener el número de células viables se multiplicó el número de colonias crecidas en cada dilución por el factor de dilución ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) (Somasegaram y Hoben, 1994).

## **Análisis estadístico**

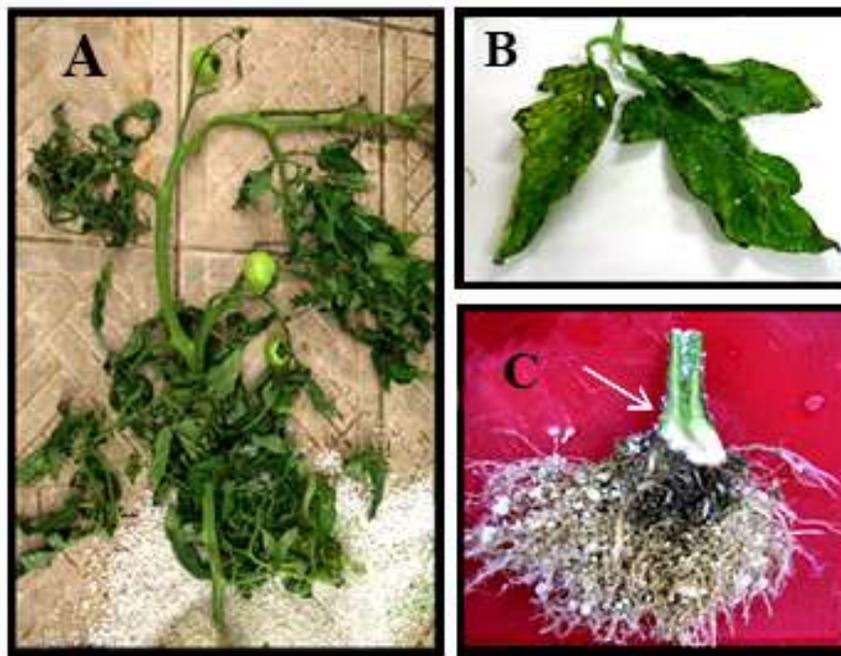
Los datos provenientes de las pruebas de patogenicidad se analizaron estadísticamente por medio del programa Infostat versión estudiantil (InfoStat, 2005). La evaluación del experimento se realizó en base a un método de muestreo aleatorio simple. Se realizó un ANOVA para analizar los rangos que se asignan a todos los datos. Se analizaron los rangos de los datos y una prueba de DMS para identificar diferencias entre los controles y las plantas inoculadas con los 3 aislados de *R. solanacearum*.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

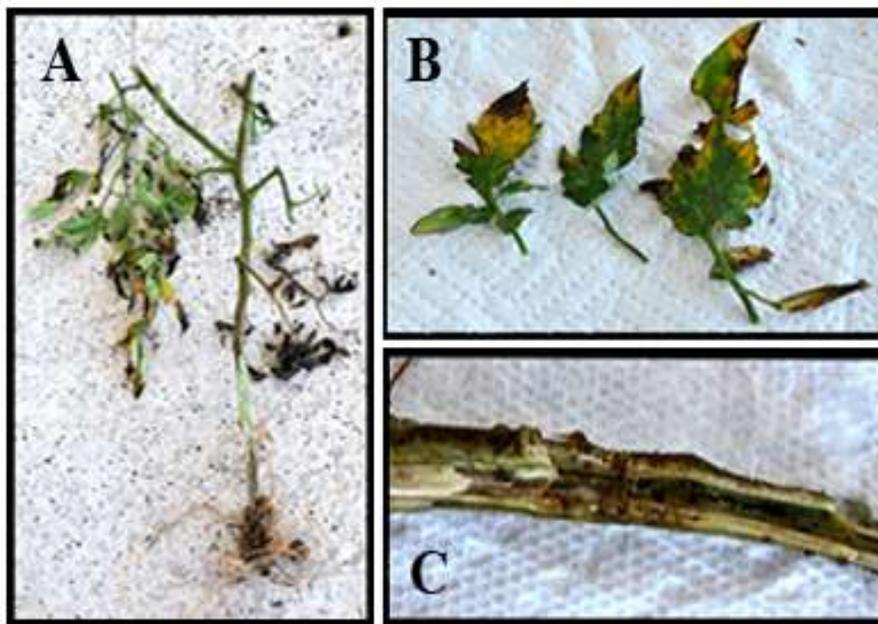
### **Obtención de las muestras y sintomatología**

Las plantas de tomate presentaron síntomas de marchitez severa (Figuras 2.1A, B y 2.2A, B), zonas necróticas y lesiones marrón en el tallo, pudrición en la base del tallo, necrosis en los haces vasculares en el área próxima a la lesión acompañada de exudado bacteriano de color crema y muerte de la planta (Figuras 2.1C y 2.2C). Estos síntomas fueron semejantes a los reportados para *R. solanacearum*, los cuales incluyen retraso en el crecimiento, reducción en la firmeza de las hojas jóvenes, amarillamiento en un solo lado de la hoja o en una rama, marchitez

en uno o ambos lados de los folíolos. En condiciones favorables al patógeno la planta puede marchitarse rápidamente presentando un amarillamiento general del tejido foliar y eventualmente su muerte (Bulletin OEPP/EPPO, 2003; Champoiseau, 2009; USDA CSRESS, 2005; Williamson, 2002). De las muestras de tomate con síntomas descritos previamente procedentes de los municipios de Aguada y Lares se seleccionaron dos aislados bacterianos identificados como 1290 y 1287. Estos se identificaron preliminarmente como *R. solanacearum* por su crecimiento en medio semi-selectivo TZC y reacción positiva en una tira serológica específica para la bacteria.



**Figura 2.1** Síntomas observados en tomate proveniente del municipio de Aguada en la muestra identificada como 1287. A) Marchitez general de la planta; B) Pérdida de firmeza de las hojas; C) Pudrición y necrosis del sistema vascular con presencia de exudado.



**Figura 2.2. Síntomas observados en tomate proveniente del municipio de Lares en la muestra identificada como 1290. A) Marchitez severa; B) Clorosis, necrosis en el borde de la hoja y pérdida de firmeza en las hojas; C) Pudrición del sistema vascular.**

### **Características morfológicas y culturales**

Se seleccionaron catorce aislados bacterianos puros obtenidos de la base del tallo de las muestras de tomate 1287 y 1290. Las colonias se desarrollaron en AN después de 48 horas de incubación a 28°C. Las colonias fueron lisas, brillantes de coloración crema y consistencia mucoide, forma circular y borde regular, acorde con lo descrito por Shaad et al. (2001). Con el tiempo las colonias bacterianas adquirieron una coloración marrón. En TZC las colonias presentaron consistencia mucoide, forma circular, coloración blanquecina con pigmentación difusa en una gama de rosado a rojizo. Los 14 aislados que presentaron características morfológicas típicas de *Ralstonia* mostraron poco crecimiento a 40°C luego de ser incubados por 24 horas (Tabla 2.1). Según Schadd, et al. (2001) las colonias de *R. solanacearum* en medio de cultivo TZC, son de consistencia mucoide, de blancas o rosadas e incluso se pueden ser rojizas y poco o ningún crecimiento a 40°C (Apéndice 2.4).

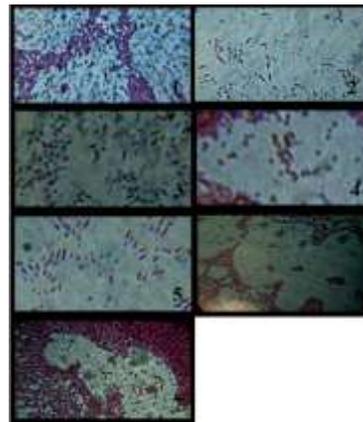
### Prueba del KOH 3%, Tinción Gram y Oxidasa

Para la prueba de KOH 3% se utilizaron los catorce aislados que presentaron características morfológicas correspondientes al género *Ralstonia*. Nueve de estos presentaron reacción mucoide, y formaron un hilo al levantarlas con un mondadientes considerando positiva la reacción y Gram negativa la bacteria. De los nueve aislados cuatro corresponden al aislado 1287, tres al aislado 1290 y dos aisladas del exudado bacteriano de la muestra 1290 (Tabla 2.1). Ocho de los catorce aislados presentaron una coloración purpura luego de colocar una gota de solución acuosa 1% de metil-f-fenilendiamina en la colonia, considerándose una reacción positiva para la prueba de oxidasa. Los cultivos 6 y 9 del aislado 1287 y el cultivo 2 del aislado 1290 fueron oxidasa positivas (Figura 2.3) y anteriormente resultaron Gram negativos con la prueba de KOH al 3%.

De las 14 colonias de los aislados que presentaron características morfológicas de *Ralstonia*, siete fueron Gram negativas así como con la prueba del KOH al 3% y Oxidasa. De los siete cultivos tres corresponden al aislado 1290, tres al aislado 1287 y una al exudado bacteriano de la muestra 1290 (Tabla 2.1 y Figura 2.4).



**Figura 2.3. Reacción negativa para la prueba de oxidasa con el aislado 1287: 1, 2, 3 y 4 y con el aislado 1290: 5 y 6.**



**Figura 2.4. Tinción de Gram. Reacción negativa obtenida en el aislado 1287:1, 2 y 3; y en el aislado 1290: 4, 5, 6 y 7.**

Los resultados obtenidos de las pruebas de KOH 3%, Oxidasa y Tinción de Gram concuerdan con lo descrito para *R. solanacearum* identificándola como un bacilo Gram negativo, (Schaad et al. 2001) (Apéndice 2.4).

**Tabla 2.1: Características de los aislados obtenidos en plantas de tomate con síntomas de marchitez bacteriana, pertenecientes al género *Ralstonia***

Asilado	Muestra	Crecimiento a 40 °C	KOH 3% (Gram +)	Oxidasa	Gram +
1.1	1287	Si	+	-	+
2.1	1287	Si	+	-	+
2.2	1287	Si	+	-	+
2.3	1287	Si	+	-	+
6.1	1287	No	-	+	-
6.2	1287	No	-	+	-
9.1	1287	No	-	+	-
9.2	1287	No	-	+	-
1.3	1290	No	-	-	+
2.8	1290	No	-	+	-
3.1	1290	No	-	-	+
1.2	exudado bacteriano 1290	Si	+	-	+
2.1	exudado bacteriano 1290	No	-	-	-
2.2	exudado bacteriano 1290	No	-	+	-

### Pruebas de serología

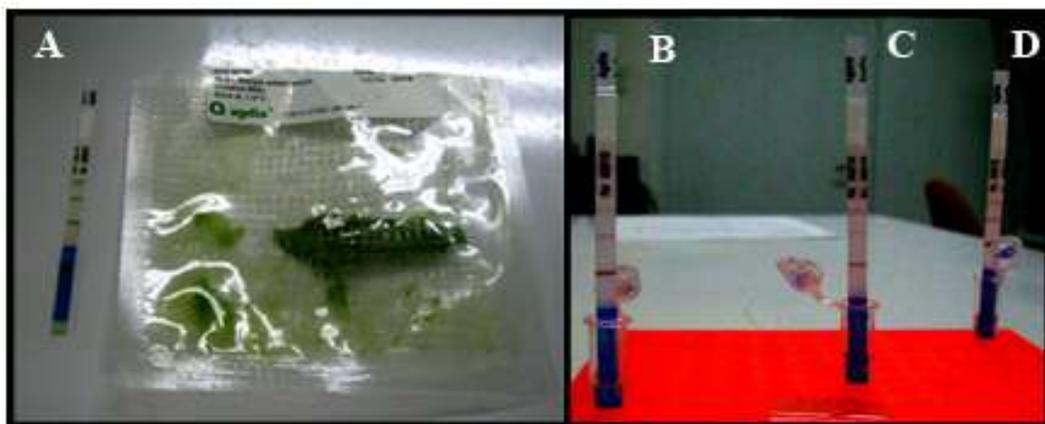
Se realizó una prueba con una tira serológica específica para *R. solanacearum* en la muestra 1290 luego de realizar la identificación visual de los síntomas. Se determinó la presencia de *R. solanacearum* en la muestra al obtener la doble línea que indica un resultado positivo (Figura 2.5). También se realizó esta prueba a siete cultivos bacterianos correspondientes a los aislados 1287, 1290 y al exudado bacteriano proveniente de la muestra 1290. Estos cultivos resultaron positivos en las pruebas de KOH 3%, tinción diferencial de Gram, prueba de Oxidasa y crecimiento a 40°C. Se obtuvieron resultados positivos directamente desde el tejido vegetal de la muestra 1290 proveniente de Lares (Figura 2.5) y tres resultados positivos de las colonias bacterianas;

dos correspondientes al aislado 1287 y uno al aislado 1290 (Tabla 2.2, figuras 2.5). En la prueba DAS ELISA se obtuvieron seis reacciones positivas correspondientes al aislado 1287 y una al aislado del exudado bacteriano de la muestra 1290. El control positivo presentó una coloración azul en la placa de ELISA y una absorbancia de 0.758 nm. Las reacciones positivas para los aislados 9 (1287), 6 (1287) y 2 (1290) presentaron una coloración azul en la placa de ELISA y valores de absorbancia de 0.877, 0.604 y 0.529 respectivamente (Tablas 2.3 y 2.4).

**Tabla 2.2: Detección de *Ralstonia solanacearum* con la tira serológica específica (ImmunoStrip® Test, Agdia, Inc.).**

Aislados	Muestra	Tira serológica <sup>a</sup>
6.1	1287	-
6.2	1287	+
9.1	1287	-
9.2	1287	+
2.8	1290	-
2.1	exudado bacteriano 1290	+
2.2	exudado bacteriano 1290	-

a + = Reacción positiva, - Reacción negativa



**Figura 2.5. Tira serológica (ImmunoStrip Test, Agdia, Inc.) indicando la presencia de *R. solanacearum*. A) muestra 1290. B) aislado 9 de la muestra 1287. C) aislado 6 de la muestra 1287. D) aislado 2 de la muestra 1290.**

**Tabla 2.3: Prueba serológica DAS ELISA específica para *Ralstonia solanacearum*.**

<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>DAS ELISA específico<sup>a</sup></b>
2	1287	-
6	1287	+
7	1287	-
8	1287	-
9	1287	+
10	1287	-
A1	exudado bacteriano 1290	-
A1	exudado bacteriano 1290	-
2	exudado bacteriano 1290	+
2	exudado bacteriano 1290	-
B	exudado bacteriano 1290	-
B	exudado bacteriano 1290	-
1	1290	+
2	1290	+
3	1290	-
4	1290	-
5	1290	+
6	1290	-

a + = Reacción positiva, - Reacción negativa

**Tabla 2.4. Prueba ELISA para la identificación de *Ralstonia solanacearum* en colonias bacterianas**

<b>Colonias bacterianas</b>	<b>Absorbancia (nm)</b>
<b>Controles</b>	
Positive	0.758
Negative	0.081
<b>Colonias bacterianas</b>	
9 <sup>a</sup>	0.877
6 <sup>a</sup>	0.604
2 <sup>b</sup>	0.529

<sup>a</sup>Muestra proveniente del municipio de Aguada

<sup>b</sup>Muestra proveniente del municipio de Lares

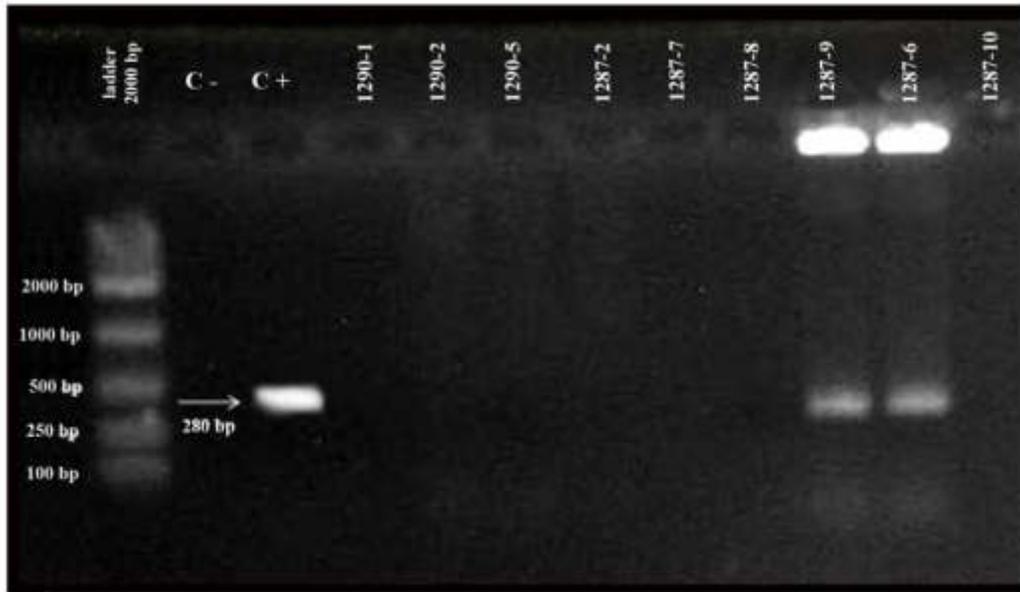
La tira serológica permitió la rápida identificación de *R. solanacearum* a partir de cultivos bacterianos puros y de plantas sintomáticas correspondientes a las muestras 1287 proveniente de Aguada y 1290 de Lares. Esta prueba se basa en la habilidad de anticuerpos específicos para detectar la presencia de *R. solanacearum*, causando una reacción positiva que se manifiesta con la presencia de dos bandas sobre la tira serológica. La tira serológica se utilizó en condiciones de campo para una detección temprana de la enfermedad. Esta prueba es recomendada por el USDA-APHIS-PPQ-CPHST (Champoiseau, 2008; Ji et al., 2006).

En la presente investigación, se logró detectar e identificar a *R. solanacearum* a partir de tejido vegetal sintomático y de colonias bacterianas de las muestras provenientes de Aguada y Lares. Los resultados positivos mostraron una reacción de color claramente visible tornándose de color azul y confirmado con los valores obtenidos de densidad óptica (Tablas 2.3 y 2.4). La prueba fue repetida para descartar falsos positivos.

A pesar de que los métodos serológicos han sido ampliamente utilizados por ser fáciles y rápidos presentan algunas limitaciones en cuanto a la especificidad, sensibilidad o ambas, especialmente cuando existe una baja cantidad de colonias bacterianas (Champoiseau, 2008). DAS ELISA no discrimina entre las células vivas o muertas de un patógeno determinado por lo que las pruebas de patogenicidad confirman la viabilidad de los aislados obtenidos (Banymandhub–Munbodh, 1997). Aun así, las técnicas serológicas constituyen una herramienta eficiente para el diagnóstico de patógenos, principalmente cuando no están disponibles los recursos para el diagnóstico utilizando pruebas moleculares (Banymandhub – Munbodh, 1997).

### **Identificación molecular**

Se realizó la identificación molecular de los tres aislados que presentaron características correspondientes al género *Ralstonia* de acuerdo a sus características morfológicas, culturales y que fueron positivas en pruebas serológicas para *R. solanacearum*. En los aislados provenientes de las muestras 1287 (Aguada) y 1290 (Lares) se obtuvo una banda de ADN de 280 bp, producto de la amplificación con los cebadores específicos 759f (sentido) y 760r (anti sentido) correspondiente a lo reportado para *R. solanacearum* (Fegan et al., 1998; Poussier y Luisetti, 2011) (Figura 2.6).



**Figura 2.6. Producto de PCR observado en gel de agarosa para *R. solanacearum* utilizando los cebadores 759f y 760r. Marcador molecular de 2000 bp, control positivo (C+) aislado 993 (Coamo), control negativo (agua molecular), aislados bacterianos 1290-1, 1290-2, 1290-5, 1287-2, 1287-7, 1287-8, 1287-9, 1287-6 y 1287-10 (Aguada). La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 280 bp.**

En esta investigación, la técnica de PCR convencional amplificó una banda de 280 bp en los aislados 9 y 6 de la muestra 1287 y en el aislado 2 de la muestra 1290, demostrando sensibilidad en la amplificación de la secuencia 16S rRNA de *R. solanacearum*. El uso de cebadores específicos para la amplificación de la secuencia 16S rRNA del genoma de la bacteria como los cebadores 759f y 760r logró amplificar una secuencia de 280 pares de bases, el peso molecular de la banda reportado para *R. solanacearum* (Fegan et al., 1998; Poussier and Luisetti, 2011). Los ensayos con PCR han sido exitosamente utilizados para detectar a la bacteria permitiendo la detección de poco material genómico como  $10^2$  CFU/ml a partir de hojas, raíces, tallos y sépalos de plantas de tomate, así como también a partir del suelo (Coutinho, 2005; Martins et al., 2005).

La variabilidad genómica de *R. solanacearum* hace que técnicas como PCR en tiempo real incluso puedan dar falsos positivos bajo ciertas condiciones en las cuales pueden producirse

homologías específicas de la sonda de detección utilizada en la amplificación del producto. Por esta razón es recomendable utilizar al menos dos métodos de diagnóstico independientes para confirmar la presencia e *R. solanacearum* (González et al., 2009; Ji et al., 2008).

### **Secuenciación del gen 16S**

El análisis de la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal de los tres aislados identificados como *R. solanacearum* y su comparación con secuencias depositadas en el Gen Bank, a través del BLAST, presenta un porcentaje de homología entre 98 y el 100% con la secuencia de *R. solanacearum* CFBP2957 (cromosoma), disponible en ésta base de datos. El número de bases no homólogas que se encontraron fue bajo entre 0 y 2%. Los resultados obtenidos de la secuenciación confirmaron la presencia de *R. solanacearum* en los tres aislados: 9 y 6 provenientes de la muestra 1287, y 2 proveniente de la muestra 1290 (Tabla 2.5). La identificación del aislado 993 (Coamo) fue confirmada por el laboratorio de APHIS PPQ, en Beltsville, USA. Los aislados bacterianos provenientes de plantas de tomate con síntomas de marchitez, fueron identificados como *R. solanacearum* mediante la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal. El análisis con BLAST mostró una homología del 100% con el cromosoma de *R. solanacearum*.

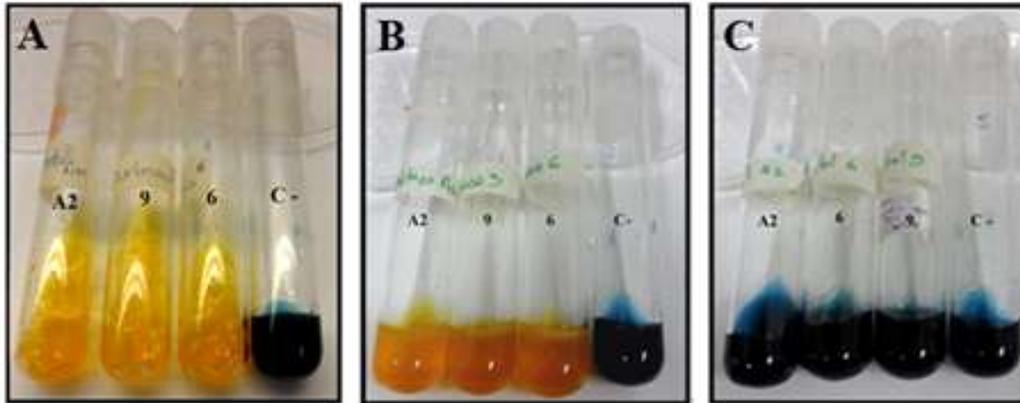
**Tabla 2.5. Identificación molecular de aislados de *Ralstonia solanacearum* de tomate, utilizando la secuenciación de la región ITS del rADN y el programa BLAST**

<b>Aislado</b>	<b>Identificación en BLAST</b>	<b>% Homología</b>	<b>% Cobertura</b>	<b>Número de bases Idénticas</b>	<b>Número de bases diferentes</b>
1287 -9 RS 759	<i>Ralstonia solanacearum</i>	100%	93%	239/239	0/239
1287-9 RS760	<i>Ralstonia solanacearum</i>	98%	89%	228/233	2/233
1287-6 RS 759	<i>Ralstonia solanacearum</i>	99%	93%	239/240	1/240
1287-6 RS 760	<i>Ralstonia solanacearum</i>	99%	86%	223/224	0/224
1290-2 RS 759	<i>Ralstonia solanacearum</i>	100%	92%	236/236	0/236
1290-2 RS 760	<i>Ralstonia solanacearum</i>	98%	90%	230/233	2/233

Los métodos de secuenciación de los genes del rRNA han tenido un considerable progreso durante la última década. Estas técnicas han hecho posible determinar la secuencia de millones de pares de bases por año constituyéndose en un procedimiento preciso para la identificación de microorganismos (Harmsen and Karch, 2004). La porción del ADN comúnmente utilizada para fines taxonómicos de bacterias es la región 16S rRNA, esta región también ha sido designada región 16 rADN o gen 16S. El gen 16S rRNA se puede comparar como otras bacterias o también con arqueobacterias y con el gen 18S de eucariotas. Este es un gen altamente conservado en la historia evolutiva al ser un componente crítico de la función celular. Las mutaciones en estos genes afectan estructuras y no funciones esenciales como la del rADN. Sin embargo la tasa de cambio evolutivo en el gen 16S rRNA es todavía desconocido, este gen determina distancias evolutivas y relaciones entre organismos (Clarridge III, 2004). El GenBank es la mayor base de datos de nucleótidos en el mundo con más de 20 millones de secuencias de las cuales 90,000 corresponden a la secuencia 16S rRNA (Clarridge III, 2004).

### **Identificación de biovares**

Se realizó la determinación de biovares de los tres aislados bacterianos identificados molecularmente como *R. solanacearum*: 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares). Los tres aislados fueron positivos para la prueba de producción de ácido láctico a partir de dextrosa y trehalosa mostrando una coloración amarilla intensa en el medio específico para la prueba de azúcares después de 48 horas. Los tres aislados también presentaron crecimiento en un medio con contenido de nitrato (Tabla 2.6, Figura 2.7 A y B). No hubo producción de ácido para manitol, sorbitol, dulcitol, celobiosa y maltosa, ya que el medio de cultivo específico para la prueba de azúcares mantuvo su coloración azul. Los tres aislados no presentaron producción de gas nitrito a partir de nitrato (Tablas 2.6, Figura 2.7 C). Los resultados obtenidos determinan que los tres aislados: 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares) corresponden al biovar 1 de *R. solanacearum*.



**Figura 2.7. Prueba de producción de ácido láctico a partir de disacáridos y alcoholes con los aislados 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares) de *R. solanacearum*. A) Resultados positivos de la producción de ácido a partir de dextrosa: aislados 2, 9, 6 y control negativo. B) Resultados positivos de la producción de ácido a partir de trehalosa: aislados 2, 9, 6 y control negativo. C) Resultados negativos de la producción de ácido a partir de sorbitol: aislados 2, 9, 6 y control negativo.**

*Ralstonia solanacearum* no se presenta con una unidad biológica con uniformidad en el rango de hospederos sino que constituye un complejo de variantes que han sido descritas como grupos, razas, biovares, biotipos, subrazas y cepas. Esta complejidad es motivo de confusión y polémica en la literatura (EPPO, 2003). Actualmente, se reconocen cinco razas y 5 biovares diferentes. Las razas se han establecido dependiendo el hospedero que afectan, siendo la raza 1 patógeno del tomate, la papa, tabaco, bananas diploides y otras solanáceas. Los biovares se distinguen por la habilidad de producir ácido láctico a partir de disacáridos y azúcares (EPPO, 2003). Las cepas clasificadas como biovar 1 producen ácido a partir de dextrosa y trehalosa, no oxidan los tres alcoholes hexosa (dulcitol, sorbitol y manitol), crecen en presencia de nitrato con ausencia de gas nitrito (Gómez et al., 2005; Schaad et al., 2001). Los métodos utilizados para la identificación de biovares requieren de mucho tiempo para su realización ya que los cultivos deben ser incubados por un periodo de dos a cuatro semanas. Actualmente se utiliza la técnica de RFLP-PCR que ha demostrado alta eficiencia en la identificación de biovares (Thammakijjawat et al., 2001). Los tres aislados identificados como *R.solanacearum* correspondieron a la raza 1, biovar 1.

Se reconocen cinco razas y 5 biovars diferentes. Las razas se han establecido dependiendo el hospedero que afectan, siendo la raza 1 patógeno del tomate, la papa, tabaco, bananas diploides y otras solanáceas. Los biovars se distinguen por la habilidad de producir ácido a partir de disacáridos y azúcares (EPPO, 2003). Las cepas clasificadas como biovar 1 producen ácido a partir de dextrosa y trehalosa, no oxidan los tres alcoholes hexosa (dulcitol, sorbitol y manitol), crecen en presencia de nitrato con ausencia de gas nitrito (Gómez, et al., 2005, Schaad et al., 2001).

Los métodos utilizados para la identificación de biovars requieren de mucho tiempo para su realización ya que los cultivos deben ser incubados por un periodo de dos a cuatro semanas. Actualmente se utiliza la técnica de RFLP-PCR que ha demostrado alta eficiencia en la identificación de biovars (Thammakijawat et al., 2001).

**Tabla 2. 6. Prueba de producción de ácido a partir de disacáridos y alcoholes y prueba de reducción de nitrito y producción de gas nitrito a partir de nitrato con los aislados 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares) de *R. solanacearum*.**

Azúcares	Tiempo	Aislados											
		9				6				2			
Repeticiones		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Celobiosa	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 2. 6. Prueba de producción de ácido a partir de disacáridos y alcoholes y prueba de reducción de nitrito y producción de gas nitrito a partir de nitrato con los aislados 9 y 6 (1287-Aguada) y 2 (1290-Lares) de *R. solanacearum* (continuación).**

Azúcares	Tiempo	Aislados											
		9				6				2			
Repeticiones		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Dextrosa	24 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	28 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	24 h	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3 días	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7 días	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14 días	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	28 días	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Pruebas de Patogenicidad con *Ralstonia solanacearum*

En investigaciones enfocadas a la identificación y caracterización de *R. solanacearum* las pruebas de patogenicidad se utilizan como confirmación complementaria para la identificación de la bacteria. Estos ensayos evalúan la virulencia de las cepas en plantas de tomate u otras plantas hospederas (Champoiseau, 2009).

### Sintomatología

En las pruebas de patogenicidad se inocularon plantas de tomate con tres aislados de *R. solanacearum* provenientes de las muestras 1287 y 1290. Las plantas inoculadas presentaron diferencias significativas comparadas con el control, presentando síntomas de la enfermedad conocida como la marchitez bacteriana después de 7 días de la inoculación en los dos ensayos realizados.

Los síntomas se manifestaron desde el nivel de severidad 1: planta sanas, vigorosas sin síntomas hasta el nivel de severidad 4: plantas muertas con exudado bacteriano color crema (Gómez et al., 2005) (Tabla 2.7; Figuras 2.8 y 2.9). Estos síntomas concuerdan con los síntomas observados en las muestras 1287 y 1290, mencionados anteriormente.

**Tabla 2.7. Promedios de la severidad en plantas de tomate inoculadas con *R. solanacearum***

Tratamiento	No de plantas	Media
<b>Primer Ensayo</b>		
Control	4	1 A
1287 ( <i>R. solanacearum</i> )	16	2.6 B
<b>DMS %</b>		0.78

**Tabla 2.7. Promedios de la severidad en plantas de tomate inoculadas con *R. solanacearum***

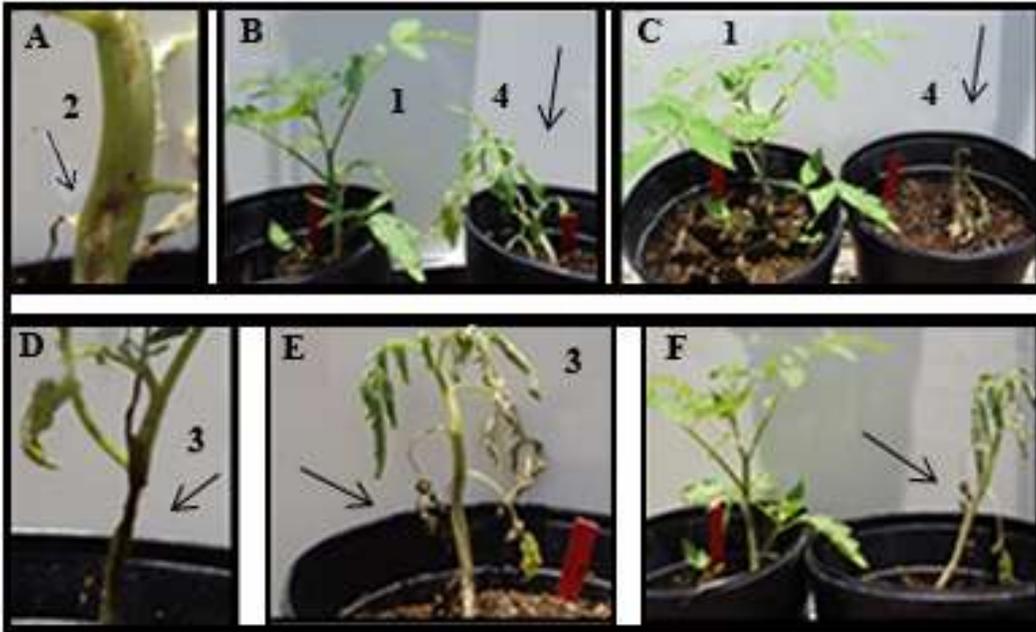
Tratamiento	No de plantas	Media
<b>Segundo Ensayo</b>		
control	4	1 A
1290 ( <i>R. solanacearum</i> )	8	1.63 AB
1287 ( <i>R. solanacearum</i> )	8	2.63 B
<b>DMS %</b>		1.09

**Tabla 2.8. Porcentaje de las plantas de tomate inoculadas que presentan síntomas de marchitez bacteriana con severidad 1, 2, 3 y 4.**

Severidad	% Severidad
1	16
2	47
3	25
4	12
<b>Total</b>	100

El 16 % de las plantas inoculadas tuvieron un nivel de severidad 1, el más bajo en la escala establecida. Estas plantas se mostraron sanas y vigorosas sin síntomas de marchitez. El 47% de las plantas de tomate inoculadas en los dos ensayos de pruebas de patogenicidad tuvieron un nivel de severidad de 2 (50%), presentando hojas inferiores marchitas, necrosis en el tallo y lesiones necróticas de color café. El 25% de las plantas inoculadas tuvieron un nivel de severidad de 3 (75%), presentando hojas inferiores amarillas, amarillamiento y marchites de hojas, exudado y constricción o estrangulamiento del tallo. El 12 % presento un nivel 4 (100%),

el más alto en la escala de severidad, las plantas murieron y se observó presencia de exudado bacteriano (Tabla 2.8, figura 2.8).



**Figuras 2.8. Severidad observada en las pruebas de patogenicidad en el 1er y 2do ensayo utilizando la escala 1-4. A) Severidad 2: hoja inferior marchita, necrosis en el tallo y lesiones necróticas de color café; B) y C) Severidad 1: planta sana, vigorosas con tejido verde, sin síntomas visuales y severidad 4: planta muerta, presencia de exudado bacteriano. D); e) Severidad 3: estrangulamiento y constricción del tallo; E) y F) Severidad 3: amarillamiento y marchites de hojas, hojas inferiores amarillas, exudado y constricción o estrangulamiento del tallo.**

La bacteria puede dispersarse en el suelo y sobrevivir por un largo periodo de tiempo así como también puede establecerse óptimamente en el agua de drenaje. La entrada de la bacteria a la planta se produce a través de la raíz y el tallo a través de heridas o por medio de las estomas. La bacteria dentro de la planta circula por medio de los haces vasculares, proceso que se acelera con la alta temperatura, posteriormente invade el floema colonizando los haces vasculares. La

bacteria se adhiere a los haces vasculares e invade el lumen causando un bloqueo de los vasos y causando síntomas de marchitez (Champoiseau 2009; EPP, 2003; Vasse et al., 2000).

La mayor severidad de la enfermedad se produce en condiciones de temperatura que fluctúan entre de 24 a 35°C. La bacteria disminuye su virulencia cuando la temperatura excede los 35°C y debajo de los 12°C (Champoiseau, 2009). La temperatura óptima reportada para la raza 1 es 35°C. Sin embargo los requerimientos óptimos de temperatura para el desarrollo de la bacteria dependen de las distintas razas y biovares (EPP, 2003). Las condiciones ambientales de alta humedad del suelo y los períodos lluviosos favorecen la proliferación del patógeno (EPP, 2003).

En esta investigación los tres aislados identificados como *R. solanacearum* infectaron las plántulas de tomate inoculadas. Esto confirma que los aislados corresponden al agente causal de la enfermedad de la marchitez bacteriana detectada inicialmente en las plantas de tomate provenientes de los municipios de Aguada y Lares. Se confirmó también que los tres aislados bacterianos pertenecen a la raza 1.

En las pruebas de patogenicidad se observaron diferencias significativas (DSM  $\alpha = 5\%$ ) entre el control y las plantas inoculadas con *R. solanacearum*. Los aislados 1287 y 1290 mostraron su virulencia al infectar las plantas de tomate. El aislado 1290 fue menos virulento que el aislado 1287 y no mostró diferencias significativas con respecto al control a pesar de que logró infectar las plantas de tomate.

Siete días después de la inoculación, las plántulas de tomate manifestaron los síntomas característicos de la marchitez bacteriana (Ateka et al., 2001 y Gómez et al., 2005). Los aislados bacterianos evaluados afectaron el 75% de las plantas de tomate inoculadas, desarrollando eficientemente su ciclo de infección bajo las condiciones ambientales del estudio. Las condiciones favorables para el desarrollo de *R. solanacearum* son alta humedad relativa y temperatura del suelo de 25 °C (USDA, 2005). Cuando la temperatura disminuye y el ambiente es menos favorable para el patógeno se pueden desarrollar exceso de raíces a lo largo del tallo (Champoiseau, 2009).

### **Identificación serológica**

Se obtuvieron resultados positivos para la prueba de ELISA específica para *R. solanacearum* en el primer ensayo en cinco de las 16 plantas inoculadas. En el segundo ensayo

cuatro de las plantas inoculadas presentaron resultados positivos. En el primer ensayo el control positivo tuvo un valor de absorbancia de 0.438 y los controles negativos (plantas inoculadas con agua) un valor promedio de 0.054. En el segundo ensayo el control positivo obtuvo un valor de absorbancia de 0.433 y los controles negativos un valor promedio de 0.088 (Tabla 2.9). En el primer ensayo se obtuvieron densidades ópticas (DO) que fluctuaron entre 0.144 a 0.422 en cinco de las plantas inoculadas (Tabla 2.9). En el segundo ensayo se obtuvieron densidades ópticas (DO) que fluctuaron entre 0.153 a 0.393 en las tres de plantas inoculadas (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9. Prueba DAS ELISA para *R. solanacearum* en plantas de tomate.**

No de planta evaluada	Primer Ensayo		Segundo Ensayo	
	Reacción ELISA <sup>a</sup>	Absorbancia (nm)	Reacción ELISA <sup>a</sup>	Absorbancia (nm)
Positivo	+	0.438	+	0.433
1	-	0.056	-	0.07
2	-	0.051	-	0.076
3	-	0.056	-	0.118
<b>Plantas Inoculadas</b>				
1	-	-	+	0.153
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	+	0.393
6	+	0.422	-	-
7	+	0.144	-	-
8	-	-	+	0.297
9	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	0.295	-	-
13	-	-	-	-
14	+	0.227	-	-
15	+	0.27	-	-
16	-	-	+	0.238

**a+ Reacción positiva +, a- Reacción negativa**

Luego de 21 días de la inoculación en el primer ensayo, cinco de las 16 plantas inoculadas fueron positivas en la prueba DAS ELISA para *R. solanacearum*. En el segundo ensayo cuatro de las 16 plántulas inoculadas fueron positivas. La prueba DAS ELISA permitió identificar la presencia de *R. solanacearum* demostrado ser efectiva para la identificación de la bacteria en extractos vegetales infectados producto de la inoculación (Priou et al 1998).

En esta investigación, la prueba DAS ELISA no logró detectar a *R. solanacearum* un 69% y 75% de las veces o sea en 11 de las 16 plantas inoculadas en el primer ensayo y, a 12 de las 16 plantas inoculadas en el segundo ensayo. La técnica DAS ELISA a pesar de su eficiencia y sensibilidad produjo falsos negativos. Esto puede estar causado por varios factores que generan limitaciones relacionadas con el umbral de detección entre ellos: el volumen de la muestra o sustrato que se utilice para generar una reacción que pueda ser detectada por colorimetría o espectrofotometría; la calidad de la muestra o sustrato que se desea analizar, la cual depende del procedimiento de extracción que se realice. La reacción cruzada es otro de los factores que disminuye la eficiencia de la prueba. Se produce cuando moléculas análogas al sustrato pueden detectarse y enlazarse con anticuerpos específicos, creando una respuesta no específica. Para superar estas limitaciones se sugiere realizar la prueba ELISA varias veces utilizando la misma muestra o realizar un ensayo previo para estandarizar la prueba antes de utilizarla como prueba de diagnóstico de microorganismos (Limpton et al., 2000).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y de alta fidelidad**

Las concentraciones de ADN obtenidas de las dos secciones de cada plántula del experimento fue medida en nanogramos (ng/ml) (Tabla 2.10) y la concentración fue ajustada a 20 ng/ml en todas las muestras antes de realizar la amplificación del ADN.

Se identificó a *R. solanacearum* mediante PCR convencional y de alta fidelidad con la amplificación de bandas de ADN de 280 bp. En el primer ensayo se identificó a *R. solanacearum* mediante PCR convencional en las dos secciones del tallo de cinco de las 16 plantas inoculadas: Planta 6 secciones 6.1 y 6.2, planta 7 secciones 7.1 y 7.2, planta 12 secciones 12.1 y 12.2, planta 14 secciones 14.1 y 14.2 y planta 15 secciones 15.1 y 15.2. Mediante PCR de alta fidelidad se identificó a la bacteria en las dos secciones del tallo de dos de las 16 plantas inoculadas: Planta 6 secciones 6.1 y 6.2 y planta 7 secciones 7.1 y 7.2 (Tabla 2.10 y figura 2.9).

En el segundo ensayo se identificó a la bacteria mediante PCR convencional y de alta fidelidad en las dos secciones del tallo en cuatro de las 16 plantas inoculadas: Planta 1 secciones 1.1 y 1.2, planta 5 secciones 5.1 y 5.2, planta 8 secciones 8.1 y 8.2 y planta 16 secciones 16.1 y 16.2 (Tabla 2.11 y figura 2.10).

**Tabla 2.10. Concentración del ADN extraído de las plantas de tomate del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad**

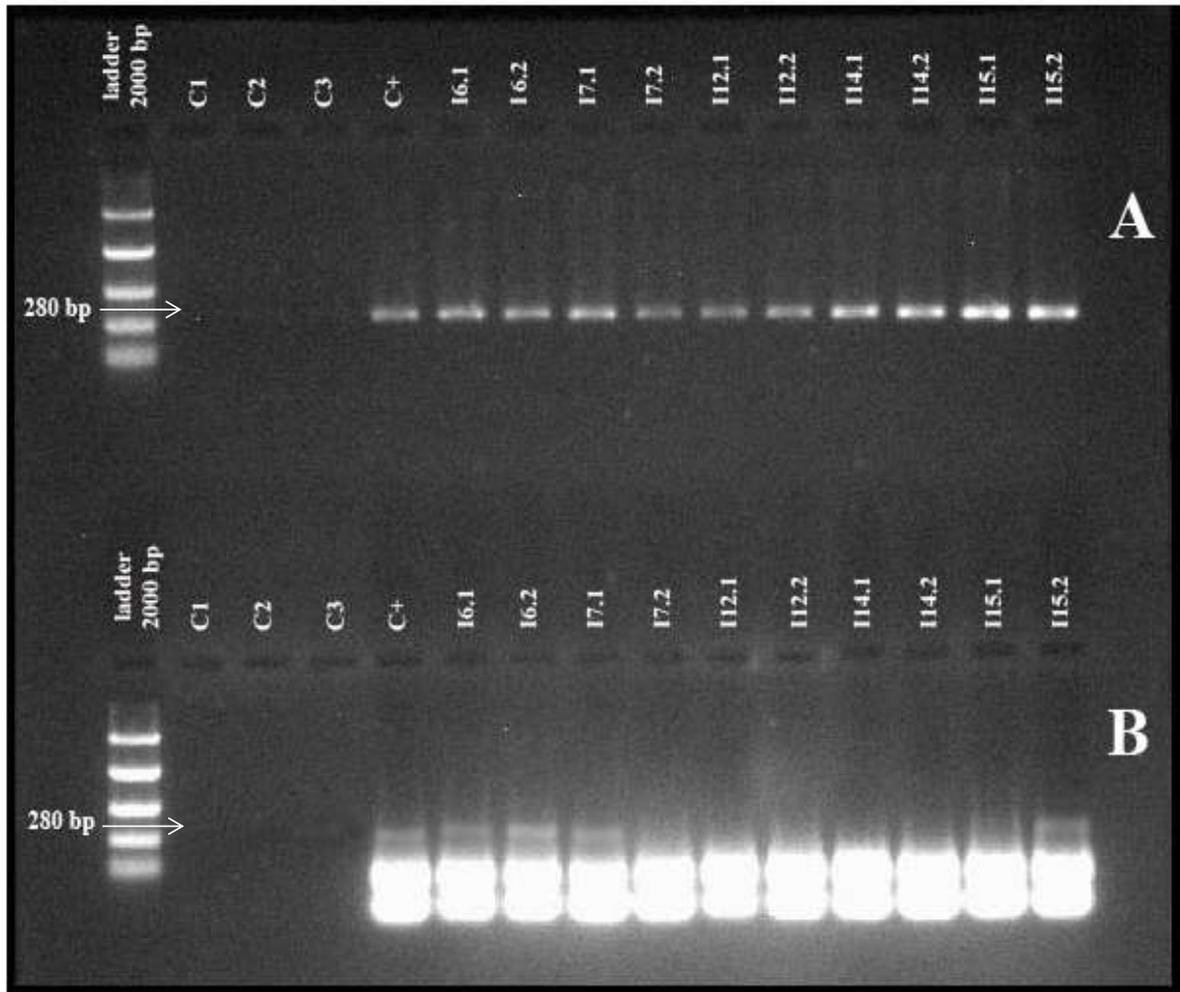
	Primer Ensayo		Segundo Ensayo	
	Secciones de la planta inoculada	Concentración de ADN en ng 1	Secciones de la planta inoculada	Concentración de ADN en ng 1
<b>Plantas control</b>	1	77	1	60
	2	71	2	58
	3	100	3	43
	4	30	4	30
	<b>Media</b>	70	<b>Media</b>	48
<b>Plantas inoculadas con <i>R. solanacearum</i></b>	6.1	191	1.1	240
	6.2	193	1.2	120
	7.1	574	5.1	243
	7.2	257	5.2	212
	12.1	137	8.1	109
	12.2	164	8.2	164
	14.1	203	16.1	53
	14.2	255	16.2	78
	15.1	65	15.1	111
	15.2	177	15.2	125
	<b>Media</b>	222	<b>Media</b>	146

<sup>1</sup> Concentración del ADN en nanogramos por mililitro (ng/ml) mediante densidad óptica

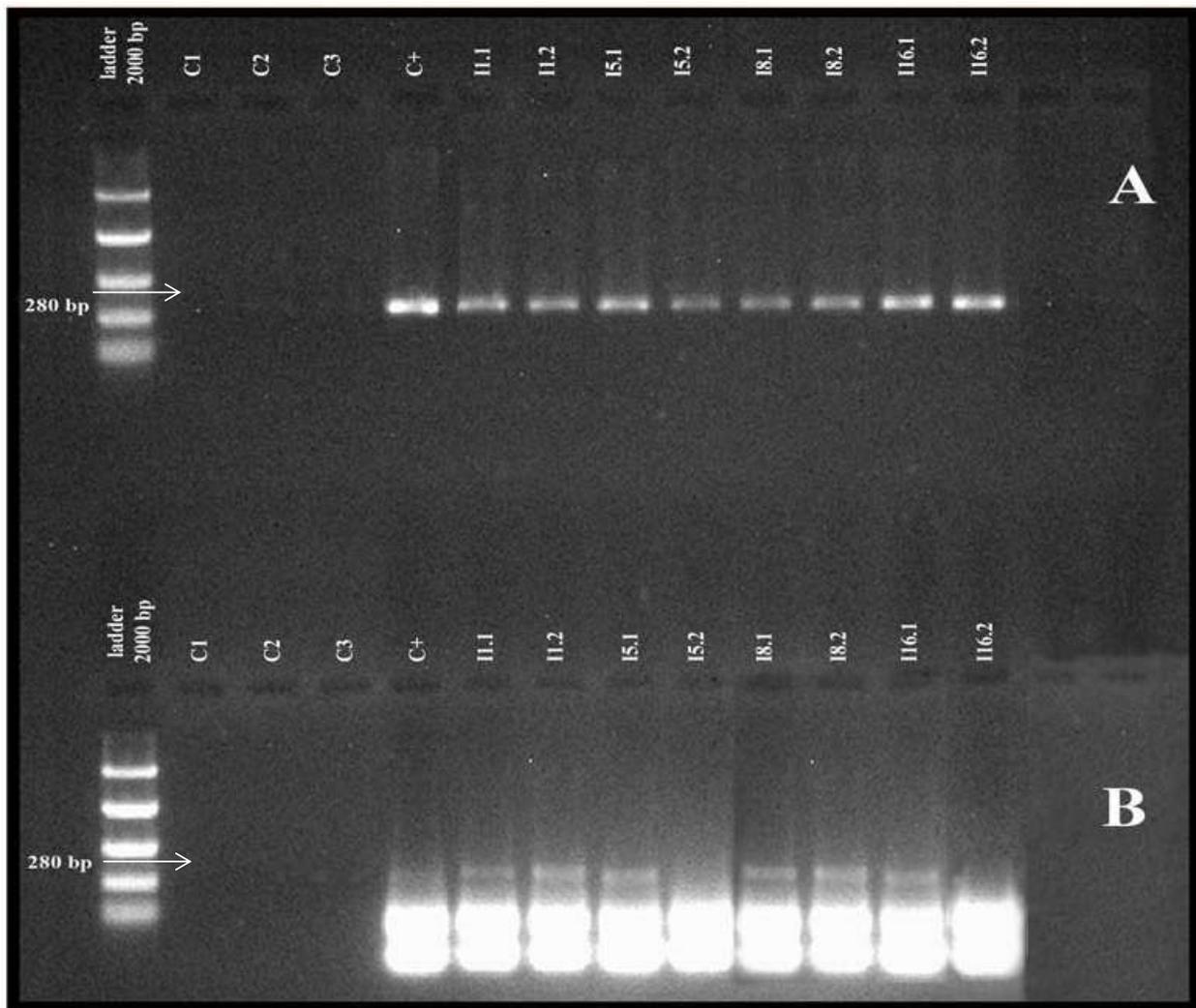
**Tabla 2.11: PCR convencional y de alta fidelidad para la identificación de *R. solanacearum* a partir del tejido vegetal de plantas de tomate**

No. de planta evaluada	PCR convencional <sup>a</sup>		PCR de Alta Fidelidad <sup>a</sup>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
<b>Controles</b>				
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
<b>Plantas Inoculadas</b>				
1	-	+	-	+
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	+	-	+
6	+	-	+	-
7	+	-	+	-
8	-	+	-	+
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	-	-	-
13	-	-	-	-
14	+	-	-	-
15	+	-	-	-
16	-	+	-	+

<sup>a</sup>+ = Reacción positiva, - Reacción negativa



**Figura 2.9.** Producto de PCR observado en gel de agarosa que comprueba la presencia de *R. solanacearum* en el tejido de plantas de tomate el primer ensayo de las pruebas de patogenicidad: escalera (ladder) controles C1, C2, C3, positivo y plantas inoculadas 6 (6.1 y 6.2), 7 (7.1 y 7.2), 12 (12.1 y 12.2), 14 (14.1 y 14.2) y 15 (15.1 y 15.2). A) PCR convencional B) PCR de alta fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 280 bp.



**Figura 2.10.** Productos de PCR en gel de agarosa que comprueba la presencia de *R. solanacearum* en el tejido de tomate en el segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad: escalera (ladder) controles C1, C2, C3, positivo y plantas inoculadas: 1 (1.1 y 1.2), 5 (5.1 y 5.2), 8 (8.1 y 8.2) y 16 (16.1 y 16.2). A) PCR convencional. B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 280 bp.

Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa PCR han logrado superar considerablemente las limitaciones que pueden presentar los métodos tradicionales para detección e identificación de microorganismos fitopatógenos como la caracterización morfológica, las pruebas bioquímicas y las pruebas serológicas como ELISA. La técnica de PCR ha demostrado alta sensibilidad y especificidad evitando obtención de falsos negativos que pueden ser causados por inhibidores de la ADN polimerasa en plantas (Elphinstone, 2005) y ha logrado detectar bajos niveles de material genético ( $10^2$  CFU/ml) de *R. solanacearum* a partir de material vegetal (Martins et al., 2005).

En esta investigación la técnica de PCR convencional permitió identificar a *R. solanacearum* directamente del tejido vegetal sintomático en 9 (18 secciones, 2 por cada plántula) de las 32 plantas inoculadas en ambos ensayos durante las pruebas de patogenicidad, es decir cinco plántulas (10 secciones) en el primer ensayo y 4 (8 secciones) en el segundo ensayo. Se amplificó un fragmento 280 pares de bases (pb), lo cual concuerda con lo reportado para la bacteria utilizando los iniciadores 759f y 760r. Se confirmó la presencia de *R. solanacearum*, raza 1 como agente causal de la marchitez bacteriana del tomate. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas que han utilizado la técnica de PCR convencional para identificar a *R. solanacearum* con los cebadores 759 y 760 (Fegan et al., 1998; Poussier y Luisetti, 2011).

La técnica de PCR de Alta Fidelidad PCR no fue tan eficiente como la PCR convencional en identificar a *R. solanacearum*. La PCR de Alta Fidelidad en el primer ensayo de patogenicidad detectó a la bacteria en 3 de las 16 (19%) plantas inoculadas. En la planta 6 las dos secciones, en la planta 7 la sección 1 y en la 15 la sección 2. En el segundo ensayo en 4 de las 16 plantas inoculadas. En la planta 1, las secciones 1 y 2, en la planta 5 la sección uno, en la 8 las dos secciones y en la 16 la sección uno. La PCR de Alta Fidelidad detectó a *R. solanacearum* en un menor número de muestras analizadas (secciones de las plantas inoculadas) en comparación con la PCR convencional.

En algunos casos el PCR de Alta Fidelidad ha demostrado ser más confiable que la técnica de PCR convencional debido a que incorpora dos enzimas ADN polimerasas una de las cuales realiza actividad de corrección de errores (“proof-reading”). Ha demostrado ser eficiente en detectar *Wolbachia* cuando se mezcla con el ADN del hospedero al igual que para detectar el ADN del *Candidatus liberibacter asiaticus* cuando se lo mezcla con ADN de plantas, psíldos o parasitoides (Hoy et al., 2001). La PCR de Alta Fidelidad con la enzima Taq polimerasa de alta

fidelidad ha sido utilizada eficientemente en la amplificación de los genes 23S y 16S para identificar a *R. solanacearum*, para la clasificación de biovares y razas, para la construcción de los clúster de genes *motAB-cheYAW* (Yao and Allen, 2006) y en la identificación de otras especies del género *Ralstonia* como *R. eutropha* (Budde et al., 2010, Wullings, 1998).

En esta investigación, la técnica de PCR de Alta Fidelidad no fue tan eficiente como la PCR convencional en la identificación de *R. solanacearum* directamente a partir de tejido vegetal infectado. Amplificó una secuencia de 280 bp utilizando los iniciadores 759 y 760 únicamente en 6 secciones del tejido vegetal de 3 de las 16 plantas inoculadas mientras que la PCR estandar identificó a *R. solanacearum* en 18 secciones del tejido vegetal de 9 de las 16 plantas inoculadas en ambos ensayos de patogenicidad. La PCR de Alta Fidelidad no identificó a la bacteria en la sección 2 de la planta 7 y la sección 1 de la planta 15 en el primer ensayo. La sección 2 de la planta 5 y la sección 2 en la planta 16. La técnica de PCR de Alta Fidelidad puede presentar interferencia con ciertos componentes del material genético.

A pesar de que la técnica de PCR de Alta Fidelidad ha demostrado ser 6 órdenes de magnitud más sensitiva que el PCR convencional en presencia del ADN genómico del hospedero, podría presentar falso negativos. En esta investigación el límite en la detección de *R. solanacearum* con la PCR de Alta Fidelidad puede ser consecuencia de una alta concentración de ADN del hospedero el cual interfiere con la reacción de amplificación. Esta limitación también podría deberse a que la enzima Taq polimerasa de alta fidelidad es muy sensible a la tasa de error. La actividad exonucleasa 3'-5' de la Taq polimerasa para reparación de errores puede ser afectada por varios factores como las secuencias genómicas ricas en guanina y citosina que tienen una elevada tasa de error, los parámetros de los ciclos y las condiciones de la reacción como el pH, Mg<sup>2</sup> y la concentración de dNTPs (Takara Bio USA). En el caso de los tres aislados *Ralstonia solanacearum* estudiados en la presente investigación su secuencia genómica posee un contenido mayor de guanina y citosina en comparación con el contenido de adenina y timina. En el aislado 9 (1287) el contenido de guanina es de 29.34% y de citosina de 28.51% comparados con el contenido de adenina y timina de 21.07%. En el aislado 6 (1287) el contenido de guanina es de 30.52% y de citosina del 28.51% comparados con el contenido de adenina de 20.88% y de timina de 20.08%. En el aislado A2 (1290) el contenido de guanina es de 29.10% y de citosina es de 28.28% comparados con el contenido de adenina de 20.49% y de timina de 22.13%.

La escasa cantidad de ADN presente en la muestra en un factor determinante en la técnica de PCR de Alta Fidelidad (Kobsch et al., 2001; Hoy et al., 2001), puede intervenir con la actividad exonucleasa 3'-5' de la enzima polimerasa y podría no ser suficiente para que los cebadores altamente concentrado (100x) amplifiquen la secuencia.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de PCR convencional fue eficiente en detectar a *R.solanacearum* a partir de material infectado, y que no es necesario implementar la técnica de PCR de alta Fidelidad como un método de diagnóstico rutinario. Esto permitirá realizar su diagnóstico más eficiente reduciendo el tiempo que conlleva el proceso de identificación previo al análisis molecular. Además, reducirá el costo de los materiales utilizados en procedimientos como aislamiento, purificación y manutención de las colonias bacterianas para su eventual identificación morfológica, serológica y molecular. La técnica de PCR convencional requiere una inversión económica menor en comparación a la técnica de PCR de Alta Fidelidad la cual es costosa. La PCR convencional reduce la inversión de tiempo a la mitad en comparación a la técnica de PCR de Alta Fidelidad.

Ambos tipos de han permitido superar las limitaciones de los métodos tradicionales de identificación basados en la morfología y serología. Las técnicas moleculares son altamente sensibles y específicas en la detección e identificación de patógenos, amplifican el material genómico mediante el uso de cebadores generales y específicos (Borman et al., 2008; McCartney et al., 2003).

En esta investigación, la prueba serológica DAS ELISA específica para *R. solanacearum* demostró ser una prueba útil para la detección de la bacteria. Detectó a *R. solanacearum* en 9 de las 32 plantas inoculadas en los dos ensayos de patogenicidad. Científicos como Machmud y Yadi Suryadi (2008) han identificado a *R. solanacearum* a partir de suelo y de tejido vegetal de papa mediante la técnica DAS ELISA. Además, demostraron que la DAS ELISA es más efectiva que las técnicas de ELISA Directo y NCM ELISA (Nitrocellulose Membrane-ELISA) también utilizadas para la identificación de la bacteria. La técnica DAS ELISA es eficiente para el diagnóstico de *R.solanacearum* y otros microorganismos fitopatógenos (Banymandhub-Munbodh, 1997; Machmud y Yadi Suryadi, 2008)

En conclusión, utilizamos varias técnicas en las cuales se incluyó morfología, diferentes medios de cultivo selectivos, pruebas bioquímicas, serológicas y pruebas moleculares para identificar a *R. solanacearum*, raza 1, biovar 1 como el agente causal de la marchitez bacteriana

en huertos de tomate en Puerto Rico. Las muestras procedían de los municipios de Coamo, Lares y Aguada. Sin embargo, el método apropiado para la identificación de *R. solanacearum* va a depender de las facilidades con las que cuenta el laboratorio.

## CONCLUSIONES

- La identificación morfológica y las características culturales determinaron que los aislados bacterianos 1287 de Aguada y 1290 de Lares, Puerto Rico corresponden a *R. solanacearum*.
- *Ralstonia solanacearum* fue identificada como biovar 1 por su habilidad por producir ácido láctico a partir de los azúcares trealosa y dextrosa y por la reducción de nitrito a partir de nitrato.
- En las pruebas de patogenicidad *R. solanacearum* produjo infección en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* Mill) 7 días después de la inoculación. Los niveles de severidad fluctuaron desde 1 con plantas sanas, vigorosas, sin síntomas alcanzando hasta 4 con presencia de exudado bacteriano y la muerte de la planta.
- La prueba DAS ELISA específica para *R. solanacearum*, la PCR convencional y de Alta Fidelidad, identificaron la bacteria a partir de los aislados 1287 (Aguada) y 1290 (Lares) y del tejido vegetal de plantas de tomate inoculadas
- La PCR convencional y de alta Fidelidad mediante los iniciadores 759f y 760r amplificaron una región de 280 bp correspondiente a *R. solanacearum*.
- La PCR de Alta Fidelidad identificó a *R. solanacearum* en un menor número de muestras en comparación a la PCR convencional, por lo tanto es menos eficiente y más costosa.
- Mediante la secuenciación de la región 16S del rRNA se determinó que *R. solanacearum*, biovar 1, proveniente de las muestras 1287 (Aguada) y 1290 (Lares) fue el agente causal de la marchitez bacteriana del tomate.

## RECOMENDACIONES

- Realizar una prospección de la marchitez bacteriana presentes en otros potenciales hospederos de *R. solanacearum* en Puerto Rico como por ejemplo: la batata, el pimiento, el jengibre, la heliconia y el banano.
- El PCR convencional debe ser utilizado para el diagnóstico de *R. solanacearum* directamente a partir del tejido vegetal.
- Utilizar por lo menos dos métodos de diagnóstico para la identificación de *R. solanacearum* debido a su variabilidad y complejidad genética
- Desarrollar protocolos de PCR convencional y de Alta Fidelidad para la identificación de *R. solanacearum* en potenciales focos de infección en agua y suelo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ateka, E.M., A. W. Mwang'ombe and J.W. Kimenju. 2001. Studies on the interaction between *Ralstonia solanacearum* (Smith) and *Meloidogyne* spp in potato. African Crop Science Journal 9: 527-535.
- Banymandhub – Munbodh, K. 1997. Studies on Bacterial Wilt caused by *Ralstonia solanacearum* Syn. *Burkholderia solanacearum* Syn. *Pseudomonas solanacearum* on *Anthurium andreaum* : An Overview. Agricultural Research and Extension Unit: 195-201.
- Biosca, E. G., Caruso, P., Bertolini, E., Álvarez, B., Palomo, J.L., Gorris, M.T. and Lopez, M. M. 2005. Improved Detection of *Ralstonia solanacearum* in Culturable and VBNC State from Water Samples at Low Temperature. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Edit by: Allen,C., Prior, P. and Hayward, A. C. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. pp. 501-508.
- Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J. and Johnson, E. M. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61 (1): i7–i12
- Budde, C. F., Mahan, A. E., Lu, J., Rha, C., and Sinskey, A. J. Roles of Multiple Acetoacetyl Coenzyme A Reductases in Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. Journal of Bacteriology 192 (20): 5319–5328.
- Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews 17 (4): 840–862.
- Champoiseau, P. G. 2008. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. USDA-NRI project: *R. solanacearum* race 3 biovar 2: detection, exclusion and analysis of a Select Agent Educational modules: 1-17.  
[http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/Trainingmodules/RalstoniaR3b2\\_Sptms\\_Module.html](http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/Trainingmodules/RalstoniaR3b2_Sptms_Module.html)  
Blackwell Publishing, Ltd.
- Coutinho, T. A. 2005. Introduction and Prospectus on the Survival of *R. solanacearum*. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Edited by: Allen,C., Prior, P. and Hayward, A. C. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. pp. 29 -37.

- Dhital, S. P., Thaveechai, N and Shrestha, S. K. 2001. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* Strains of Potato Wilt Disease from Nepal and Thailand. Nepal Agric. Res. J. 4 & 5: 42-47.
- Elphinstone, J. G. 2005. The current Bacterial Wilt Situation: A Global Overview. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Edit by: Allen, C., Prior, P. and Hayward, A. C. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. pp. 9-28.
- European Plant Protection Organization EPPO. 2003. Data Sheets on Quarantine Pests *Ralstonia solanacearum*.  
[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Ralstonia\\_solanacearum/PSDMSO\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Ralstonia_solanacearum/PSDMSO_ds.pdf)
- European and Mediterranean Plant Protection Organization Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP/EPPO) *Bulletin*. 2004. *Ralstonia solanacearum* Diagnostic protocols for regulated pests. Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. 34:173 –178.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I. and Hayward, A. C. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Edited by P. Prior, C. Allen & J.Elphinstone. Paris: INRA Editions. pp. 19-33
- Gómez, E. A., Álvarez, E. y Llano, G. 2005. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* Raza 2, Agente causal del moko del plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 28 (1):1-8.
- González, I., Arias, Y. and Peteira, B. 2009. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia solanacearum*-plantas hospedantes. *Rev. Protección Veg.* 24 (2): 69-80.
- Harmsen, D. and Karch, H. 2004. 16S rDNA for Diagnosing Pathogens: a Living Tree. *ASM News* 70 (1):19-24.
- Hernández, J. J. 2010. Análisis de la diversidad genética de *Ralstonia solanacearum* y su relación con la virulencia en Plátano, Amenaza en Venezuela. *Producción Agropecuaria/Biotecnología-Fitoprotección* 3 (1): 19-29.

- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215–220.
- Hoy, M. A., Jeyaprakash, A., and Nguyen, R. 2001. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological Control* 22:278-287.
- InfoStat (2005). *InfoStat versión 2005*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9:393-405.
- Ji, P., Allen, C., Sanchez-Perez, A., Yao, J., Elphinstone, J. G., Jones, J. B., and Momol, M. T. 2006. New Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains Associated with Vegetable and Ornamental Crops in Florida. *Plant Disease* 91( 2): 195-203.
- Krausz, J. P. and Thurston, D. 1975. Breakdown of Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Tomato. *Phytopathology* 65: 1272-1274.
- Kobsch, S., Weinmann, S., Steinert, K. and Löffert, D. 2001. Optimized high-fidelity PCR with an efficient 3' → 5' exonuclease hot start. *Qiagen News* 4: 16-17.  
[http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0401/1018052\\_qnews42001\\_p15.pdf](http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0401/1018052_qnews42001_p15.pdf)
- Limptom, C. R., Dautlick, J. X., Grothaus, G. D., Hunst, P. L., Magin, K. M., Mihaliak, C. A., Rubio, F. M. and Stave, J. W. 2000. *Food and Agricultural Immunology* 12: 153- 164.
- López, M. M. and Biosca, E. G. 2005. Potato Bacterial Wilt Management: New Prospects for an Old Problem. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. Edit by: Allen, C., Prior, P. and Hayward, A. C. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. pp. 205-224
- Lwin, M. and Ranamukhaarachchi, S. L. 2006. Development of Biological Control of *Ralstonia solanacearum* Through Antagonistic Microbial Populations. *International Journal of Agriculture and Biology: Int. J. Agri. Biol.* 8(5): 657-659.
- López, M.M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M. and Bertolini, E. 2009. Are Molecular Tools solving The Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Virus? *Curr Issues Mol. Biol.* 11:13-46.

- Machmud, M. and Suryadi, Y. 2008. Detection and identification of *Ralstonia solanacearum* strains using the indirect ELISA technique. Indonesian journal of Agriculture 1 (1): 13-21.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C. and Arlat, M. 1998. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. Molecular Microbiology 27(2), 437–453.
- Martin, C. and French, E. R., 1985. Bacterial wilt of potato *Ralstonia solanacearum*. Take technical information . Centro Internacional de la papa. Bulletin No 13 Sec. 2 -97.
- Martins, O. M., Nabizadeh-Ardekani, F. and Rudolph, K. 2005. Seeds from Infected Tomato Plants Appear to be Free from Contamination by *Ralstonia solanacearum* When Tested by PCR or Microbiological Assays. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Edit by: Allen,C., Prior, P. and Hayward, A. C. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. pp. 95-101.
- McCartney, H. A, Foster, S. J., Fraaije, B. A. and Ward, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Manag. Sci 59:129-142.
- Njambere, E., Attanayake, R.,and Chen, W. 2010. Applications of molecular markers and ADN sequences in identifying fungal pathogens of cool season grain legumes. In: Gherbawy, Y. and Voigt, K., editors. Current Advances in Molecular Fungal Identification. Berlin: Springer: 79-92.
- National Weather Service Forecast Office, San Juan- Puerto Rico, 2012.  
<http://www.nws.noaa.gov/climate/index.php?wfo=sju>
- Norman, D. J., Zapata, M., Gabriel, D. W., Duan, Y. P., Yuen, J. M. F., Mangravita-Novo, A. and Donahoo, R. S.. 2009. Genetic Diversity and Host Range Variation of *Ralstonia solanacearum* Strains Entering North America. Phytopathology 99 (9):1070-1077.
- Pareja, Y., Roncero, I and Ruiz, C. 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants. MPMI 21 ( 6): 728–736.
- Poussier, S., Vandewalle, P. and Luisetti, J. 1999. Genetic Diversity of African and Worldwide Strains of *Ralstonia solanacearum* as Determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hrp* Gene Region. Applied and Environmental Microbiology 65 (5):2184–2194.

- Poussier, S. Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. and Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679–1692.
- Poussier, S. and Luisetti, J. 2011. Specific Detection of Biovars of *Ralstonia solanacearum* in Plant Tissues by Nested-PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology* 106 (3): 255-265.
- Priou, S., Gutarra, L., Fernández, H. and Aley, P. 1998. Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Latently Infected Potato Tubers and Soil by Postenrichment ELISA. CIP program report, Lima-Peru: 111-122.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition . APS PRESS. pp. 151-166.
- Somasegaram, P. and Hoben, H. J. 1994. Determining the Number of Viable Cells in a Culture by Planting Methods (Key steps 2, 5, 6 and 7). In *Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Edit. Robert C. Garber. New York Inc. pp. 52-57.
- TaKaRa Bio USA  
<http://www.scientifix.com.au/pdf/catalogues/TaKaRa%20Successful%20PCR%20Guide%203rd%20ed.pdf>
- Tans-Kersten, J., Huayu Huang, Allen, C., 2001. *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. *Journal of Bacteriology* 183 (12): 3597–3605.
- Thammakijawat<sup>1</sup>, P., Thaveechai<sup>1</sup>, N., Kositratana<sup>1</sup>, W., Chunwongse, J., Frederick, R. D. and Schaad, N. W. 2001. Genetic Analysis of *Ralstonia solanacearum* Strains from Different Hosts in Thailand Using PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 35: 397 – 408.
- USDA CSRESS. Integrate Pest Management in cooperation with National Plant Diagnosis Network, APHIS and ARS. National Pest Alert *Ralstonia Solanaciarium* Race 3 biovar 2. [http://www.csrees.usda.gov/nea/pest/pdfs/ralstonia\\_alert.pdf](http://www.csrees.usda.gov/nea/pest/pdfs/ralstonia_alert.pdf)
- Vasse, J., Genin, J., Frey, P., Boucher, C. and Brito, B. 2000. The hrpB and hrpG Regulatory Genes of *Ralstonia solanacearum* Are Required for Different Stages of the Tomato Root Infection Process. *MPMI* 13 (3): 259 – 26.

- Vickers, J. E., Graham, G. C. AND Henry, R. J. 1996. A protocol for the efficient screening of putatively transformed plants for *bar*, the selectable marker gene, using the polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology Reporter* 14 (4): 363-368.
- Vincelli, P. and Tisserat, N. A. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied Plant Pathology. *Plant Dis.* 92 (5):660-669.
- Yao, J. and Allen, C. 2006. Chemotaxis Is Required for Virulence and Competitive Fitness of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 188(10):3697-3708.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*: 3741–3751.
- Williamson, L. 2002. *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2 Strains Isolated from Geranium Are Pathogenic on Potato. *Plant Disease* 86 (9):987-991.
- Wullings, B. A., Van Beuningen, A. R., Janse, J. D. and Akkermans, A. D. L. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, Which Causes Brown Rot of Potato, by Fluorescent In Situ Hybridization with 23S rRNA-Targeted Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11): 4546–4554.

## APÉNDICES

### RECETA PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Las recetas de los medios de cultivo contienen las cantidades de cada uno de los ingredientes específicas para 1 L de agua destilada.

#### *Ralstonia solanacearum*

##### Apéndice 2.1

###### Medio de cultivo Agar Nutritivo (NA) (Schaad et al., 2001)

23 gr de Agar Nutritivo  
1 Litro de agua destilada

##### Apéndice 2.2

###### Medio selectivo con tetrazolium CPG Y TZC (Schaad et al., 2001)

Ácido casoamínico (Caseína hidrolizada)	1.0 g
Peptona	10.0 gr
Glucosa	5.0 gr
Agar	17.0 gr

Añadir los ingredientes en 1 litro (L) de agua destilada y mezclar mediante un agitador. Autoclavar la solución por 35 minutos. Enfriar el medio hasta aproximadamente 55 °C y añadir 5 ml de la solución stock 1% compuesta por 2, 3, 5 cloruro de trifeniltetrazolio (trifeniltetrazolium chloride). La solución stock debe ser filtrada o esterilizada por 5 minutos a 121 °C y almacenado a 4 °C.

### Apéndice 2.3

#### Media de cultivo base para la diferenciación de *Ralstonia solanacearum* basado en la diferenciación de carbono

##### Acumulación de Poli-B-hydroxybutyrato (PHB) (Schaad et al., 2001)

##### Medio Mineral

	per L
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
KCL	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Difco Bacto peptona	1.0 g
Agar	3.0 g
Bromothymol blue	80.0 mg

Se ajusta el pH a 7.0 o 7.1 añadiendo gota a gota una solución de hidróxido de sodio al 40%, se puede obtener una coloración verde en el medio. Se debe calentar el medio de cultivo hasta que hierva el agar, se dispensa en botellas o tubos y se esteriliza por autoclave a 121° C por 20 o 30 minutos y posteriormente se enfriar a 55 o 60° C.

### Apéndice 2.4

#### Medio de cultivo Agar suave (Soft Agar) (Schaad et al., 2001)

Glicerol	100 ml
Agua destilada	400 ml
Bacto agar	5gr

El medio de cultivo se coloca en tubos de vidrio, se colocan las bacterias crecidas en medio YDC por un máximo de 48 horas. Se toma la muestra de bacterias con hisopos de algodón y se lo inserta en el agar suave. Se almacena los tubos a 4 °C, se deben realizar por lo menos dos tubos de cada colonia conservada.

## Apéndice 2.5

### Medio de cultivo YDC (glucosa yeast extract calcium carbonate agar) (Schaad et al., 2001)

Para medio litro (500 ml):

Extracto de levadura	5 gr
Dextrosa	10 gr
Carbonato de Calcio (CaCo <sub>3</sub> )	5 gr
Bacto Agar	7.5 gr
Agua destilada	500 ml

Añadir los ingredientes en 1 litro (L) de agua destilada y mezclar mediante un agitador. Esterilizar la solución por 35 minutos. Enfriar el medio hasta aproximadamente 55 °C. Colocar el medio en placas petri y almacenar a 4 °C.

## CAPÍTULO 3

### IDENTIFICACIÓN DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* AGENTE CAUSAL DEL ENVERDECIMIENTO DE LOS CÍTRICOS (CITRUS GREENING) CON PCR CONVENCIONAL Y DE ALTA FIDELIDAD

#### RESUMEN

La enfermedad conocida como el “Enverdecimiento de los Cítricos” o “Huanglongbing” (enfermedad del Dragón Amarillo), se reportó en Puerto Rico por primera vez en el año 2009. Esta enfermedad es producida por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) y transmitida por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama. La identificación oportuna en huertos es fundamental para establecer medidas preventivas para evitar su diseminación y propagación. En Puerto Rico la enfermedad ha sido detectada en huertos localizados en Adjuntas, Castañer, Ciales, Corozal, Isabela, Juana Díaz, Sabana Grande y San Sebastián. Se utilizaron plantas asintomáticas y sintomáticas provenientes de nueve huertos. Las muestras se seleccionaron en base a los síntomas visibles: amarillamiento de las hojas de un solo brote o rama, moteado asimétrico en las hojas y frutos pequeños, endurecidos y de sabor amargo. Se realizó una comparación entre el método tradicional de identificación de la bacteria: PCR convencional con el de Alta Fidelidad. La extracción del DNA se realizó con Qiagen DNeasy Plant Mini Kit. En el PCR convencional y de Alta Fidelidad se utilizaron los cebadores OI1 y OI12. Los resultados fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con el PCR de Alta fidelidad se amplificó una banda de 1160 bp mientras que con el PCR convencional se obtuvieron falsos negativos en algunas de las muestras. De un total de 138 muestras 44 amplificaron una banda de 1160 bp de la región 16S rDNA con PCR convencional y de Alta Fidelidad. De las 44 muestras, únicamente 12 fueron positivas para CLA con PCR de Alta Fidelidad y no con el PCR convencional. Esta investigación confirmó la eficiencia y sensibilidad de la técnica de PCR Alta Fidelidad para la identificación del Enverdecimiento de los Cítricos en comparación a la técnica de PCR convencional.

**Palabras clave:** Enverdecimiento de los cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, PCR convencional, PCR de Alta Fidelidad

## **IDENTIFICATION OF *Candidatus Liberibacter asiaticus* CAUSAL AGENT OF CITRUS GREENING WITH STANDARD AND HIGH FIDELITY PCR**

### **ABSTRACT**

Citrus greening or "Huanglongbing" (Yellow Dragon) was reported in Puerto Rico for the first time in 2009. The disease is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) and it is transmitted by the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. In Puerto Rico the disease has been detected in orchards located in Adjuntas, Castañer, Ciales, Corozal, Isabela, Juana Diaz, Sabana Grande and San Sebastián. Early diagnosis of the presence of the disease in orchards and identification on nurseries are essential to establish preventive measures to prevent its spread and dispersal from nurseries. A comparison between the traditional polymerase chain reaction (PCR) and High-Fidelity PCR was conducted in asymptomatic and symptomatic citrus plants for citrus greening. Symptomatic samples were selected based on visible symptoms: yellowing and deformation, and leaf with asymmetric mottling, the small and hard fruits with bitter taste. DNA extraction was performed with the Qiagen DNeasy Plant Mini Kit. Primers OI1 and OI2 was used in Standard and High-Fidelity PCR. Products were visualized on an agarose gel 1%. High Fidelity PCR amplified a band of 1160 bp (base pairs) of the 16S rDNA region while the Standard PCR showed false negative results in some samples. Of a total of 138 samples 44 samples amplified a band of 1160 bp (base pairs) was visualized with Standard and Hi-Fidelity PCR. 12 of these 44 samples are positives for CLA only with High Fidelity PCR whereas the Standard PCR. This test confirms efficiency and sensitivity of High Fidelity PCR for the identification of citrus greening in comparison to Standard PCR.

**Key words:** Citrus Greening, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Standard PCR, High Fidelity PCR.

## INTRODUCCIÓN

*Candidatus Liberibacter* es una alpha-proteobacteria Gram negativa, no cultivable, limitada al floema que produce la enfermedad conocida como el enverdecimiento de los cítricos (EC), Citrus greening o Citrus Huanglongbing (HLB) (Deng et al., 2008a y 2008b; Garnier et al., 2000; Manjunath et al., 2008). El género *Candidatus Liberibacter* posee tres especies reconocidas como: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus*, *Ca. L. americanus*. (Coletta-Filho et al., 2004; Deng et al., 2008a y 2008b). La clasificación taxonómica del género se ha definido en base a las secuencias del gen 16SrRNA. Este gen forma parte del operón *rrn* que incluye también a los genes 23S rRNA, 5S rRNA y al espaciador intergénico ITS cuya secuencia aun no ha sido determinada en su totalidad (Deng et al., 2008b; Jagoueix et al., 1997).

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA), la cepa asiática, produce síntomas severos tanto en temperaturas frescas (22 a 24°C) como cálidas (27 a 32°C), ha sido encontrada en elevaciones bajas a 360 metros sobre el nivel del mar (Ramos, 2008). *Candidatus Liberibacter africanus*, la cepa africana, fue encontrada en Sudáfrica (Deng et al., 2009b); produce síntomas menos severos a temperatura frescas, ha sido encontrada en elevaciones altas a 900 metros sobre el nivel del mar (Deng et al., 2008a y 2008b; Ramos, 2008). *Candidatus Liberibacter americanus*, la cepa americana, fue caracterizada en el estado de Sao Paulo en Brasil (Deng et al., 2008b; Gottwald, 2010; Tomimura et al., 2009; Ramos, 2008).

El HLB es transmitida por los psílidos, *Diaphorina citri* Kuwayama vector de *Ca. L. americanus* y *Ca. L. asiaticus* y *Trioza erytreae* vector de *Ca. L. africanus* (Manjunath et al., 2008). *Diaphorina citri*, originario de Asia, posee una amplia distribución a nivel mundial, se caracteriza por un corto periodo de vida y una alta fecundidad. *Trioza erytreae*, originario de África, se ha adaptado a climas fríos, es sensible al calor y al clima seco. Las condiciones óptimas para su desarrollo se encuentran entre los 500 y 600 de altitud (Ramos, 2008).

Los vectores de *Candidatus Liberibacter* spp. adquieren la bacteria al alimentarse de la planta infectada. Esta bacteria se reproduce dentro del vector sin afectar los procesos fisiológicos y persiste sin transmitirse a las generaciones sucesivas. Los psílidos transmiten la enfermedad en las etapas de ninfa o de adulto, extrayendo con su aparato bucal, grandes cantidades de savia de las hojas y peciolas, provocando debilidad en la planta e introduciendo sustancias tóxicas que contienen CLA en los tejidos. Una vez que la bacteria circula por el floema de la planta afecta la

fisiología normal obstruyendo los vasos del floema e impidiendo la circulación de los nutrientes, provocando los síntomas característicos de la enfermedad (Ramos, 2008).

Los síntomas de la enfermedad pueden observarse, si la infección ocurre durante o tan pronto inicie la propagación. En los árboles infectados las hojas caen, la floración se produce fuera de estación y la muerte ocurre en casos extremos. Los síntomas de la enfermedad pueden clasificarse en dos etapas: los síntomas primarios se presentan como amarillamiento de las hojas a lo largo de la nervadura central y el desarrollo de moteado intervenal. Los síntomas secundarios se presentan como hojas pequeñas, verticales, y muestran una serie de patrones cloróticos que pueden confundirse con los producidos por deficiencias de zinc o hierro; deformación de los folíolos y presencia de islas de verde más intenso (Da Graca, 1991; Deng et al., 2008a y 2008b). Las frutas son pequeñas tienen un sabor amargo por la alta cantidad de ácido y la poca cantidad de azúcar, muchos caen prematuramente mientras que los que permanecen en el árbol cambian su coloración, las semillas son pequeñas asimétricas y permanecen verdes aun cuando maduraran (Da Graca, 1991; Deng et al., 2008a).

Los métodos de diagnóstico utilizados para la identificación de *Candidatus Liberibacter* incluyen: la identificación de los síntomas característicos del enverdecimiento de los cítricos, la prueba de yodo (González et al., 2008), microscopia electrónica, sustancias fluorescentes específicas para HLB, ELISA con anticuerpos monoclonales, PCR basado en la identificación de la secuencia 16S del DNA ribosomal con iniciadores específicos como OI1 y OI12 (Deng et al., 2008a y 2008b; Das y Singh, 2007; Estévez et al., 2009; Jagoueix et al., 1994 y 1996; Karunasagar et al., 2004; Manjunath et al., 2008). Sin embargo, la identificación y el manejo de la enfermedad son sumamente difíciles, debido a la naturaleza no específica de los síntomas, la latencia prolongada de los síntomas, la distribución irregular del patógeno en los árboles y la variación en la tolerancia de la bacteria en la planta hospedera y en el vector (Manjunath et al., 2008).

Esta enfermedad fue detectada por primera vez en Asia en el año 1951 (Bové, 2006), en el área de Chaoshan en la provincia de Guangdong en la República Popular de China (Coletta-Filho et al., 2004; Deng et al., 2008b). Por su agresividad se ha extendido en todo el mundo infectando los cultivos de los cítricos, produciendo cuantiosas pérdidas y destruyendo cientos de industrias citrícolas en todo el mundo (Bové, 2006). Actualmente se encuentra distribuida en Norte América, Asia, África, Península Arábiga y Brasil (Manjunath et al., 2008).

En el año 2005 fue reportada en Florida infectando los cultivos de cítricos y produciendo cuantiosas pérdidas (Bové, 2006). En el año 2009, se reportó la presencia de la enfermedad en Puerto Rico (Estévez, et. al, 2009), causada por la especie *Candidatus Liberibacter asiaticus* y transmitida por el psílido *Diaphorina citri*, reportado por primera vez en la Isla en el año 2001 (Pluke et al., 2005 y 2008). A través del diagnóstico molecular basado en la PCR utilizando los cebadores OI1 y OI12 ha sido posible identificar eficientemente a *Ca. L. asiaticus* (Deng et al., 2008a y 2008b) en hojas de árboles de naranja o china, *Citrus sinensis*, provenientes de la Estación Experimental de Isabela (Estévez et al., 2009).

En Puerto Rico, la producción de cítricos, principalmente de naranja “Valencia”, preferida por el mercado internacional, podría ser una oportunidad económica de exportación a otros países. Las principales áreas de producción de naranja se encuentran en los municipios de Adjuntas, Lares, Las Marías, San Sebastián, Utuado y Yauco (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2010, Rivera 2006). Hasta el año 2007 se reportaron 63,000 metros de huertos de naranja o china, 5,000 cuerdas de naranja criolla entre plantaciones de café; 80 cuerdas de mandarinas, 65 cuerdas de limas, 50 de toronjas y 50 de chironjas (cruce de toronja con naranja). El ingreso bruto anual para el año 2010 en los cultivos de naranja fue de 124.746 millares, limones con 143.48 millares y toronja con 119.58 millares (Oficina de Estadísticas Agrícolas, San Juan-Puerto Rico).

La agresividad del enverdecimiento de los cítricos, característica intrínseca de su agente causal, la epidemiología de la enfermedad y de su vector *D. citri* junto al impacto económico en la producción de cítricos requieren de una identificación precisa y oportuna (Bove, 2006; Deng et al., 2008b; Pluke et al., 2005 y 2008). El uso de técnicas moleculares como PCR convencional y de Alta Fidelidad han demostrado sensibilidad y exactitud en la detección de CLA. Estas técnicas permiten detectar bajos niveles de material genético logrando identificar al patógeno a partir de tejido vegetal del hospedero aunque este se encuentre en estado de latencia o dormancia y no manifieste síntomas (Vincelli y Tisserat, 2008). Además, han logrado un elevado umbral de detección permitiendo identificar a la bacteria aun cuando se encuentra mezclada con ADN de la planta hospedera, del vector *D. citri* y del parasitoide, *Tamarixia radiata* (Hoy et al., 2001).

El diagnóstico molecular del *Ca. L. asiaticus* ya sea directamente del tejido vegetal o desde su vector permite reducir el riesgo de la introducción accidental de la enfermedad, la determinación de cuarentenas para evitar la propagación del patógeno y el establecimiento de

viveros y huertos libres de enfermedad (Hoy et al., 2001). El diagnóstico molecular ha permitido también evaluar posibles agentes de control biológico lo cual podría ser una potencial alternativa para el manejo de la enfermedad (Hoy et al., 2001).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de las muestras**

Las muestras de cítricos se obtuvieron de huertos de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tan.), limón (*Citrus limón* L. Burm. F), y citrus de viveros localizados en Adjuntas, Corozal, Juana Díaz, Sabana Grande, San Sebastián. Las muestras de naranja Valencia (*Citrus sinensis* L. Obs.) de dos huertos comerciales localizados en Ciales, Castañer e Isabela Puerto Rico. Se obtuvieron cinco hojas de la parte media de árboles asintomáticos y con síntomas de enverdecimiento de los cítricos. Los árboles sintomáticos mostraron una reducción de tamaño y amarillamiento de las hojas. Las ramas seleccionadas contenían hojas de tamaño reducido, forma alargada, coloración amarillo pálido, patrones de moteado con áreas cloróticas distribuidos en forma asimétrica, engrosamiento y amarillamiento de la nervadura central. Los frutos fueron pequeños y endurecidos.

Las muestras seleccionadas se mantuvieron en una nevera con hielo y fueron procesadas inmediatamente luego de la recolección. Se definió la ubicación geográfica utilizando el sistema para georeferenciación GPS (Global Positioning System) y el hospedero de aquellas muestras de la cuales se pudo obtener la información de su procedencia.

### **Identificación Molecular**

#### **Extracción y amplificación del ADN**

Se cortó la nervadura central y el pecíolo de las hojas sintomáticas frescas en fragmentos de 5 mm de largo utilizando una navaja estéril (Deng et al., 2008b), se transfirió el tejido a un tubo de colección Sigma de 2 ml con tres esferas de cristal de 5 mm de diámetro por cada tubo (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) y se agitaron en un Bead beater (1247W CELL DIS - BioSpec Mini Bead Beater) por 5 minutos. Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción de ADN (DNeasy PLant Mini Kit de Qiagen, Qiagen, California, USA) siguiendo las

instrucciones del fabricante (Mini Protocol) (Qiagen group, 2006). En los tubos con las muestras trituradas se colocaron 400 µl del buffer AP1, 4 µl de RNasa, se mezcló en un vórtex: 12 A, 0.5 AMP, 60Hz (Fisher Scientific vortex Genia 2, Scientific Industries INC, Bohemia – NY, 11716 U.S. No Cat 12-812) por 20 segundos para homogenizar el material y se incubó en un Baño María a 65°C durante 1 hora, agitando los tubos cada 15 minutos.

Se añadieron 130 µl del buffer AP2, se homogenizó la mezcla invirtiéndola varias veces y se mantuvo en hielo por 5 minutos. Se centrifugó la solución por 5 minutos a 13,500 rpm, se transfirió la solución a una columna tubo con filtro púrpura, se realizó una nueva centrifugación por 2 minutos a 13,500 rpm utilizando una centrífuga (Eppendorf 5424 AG 22331 Hamburg, Germany), y se colocaron 200 µl del sobrenadante a un tubo con filtro transparente. Se añadieron 300 µl del buffer AP3 y se mezcló cuidadosamente con la pipeta sin tocar el filtro, se centrifugó por 2 minutos a 13,500 rpm, se descartó el sobrenadante y se mantuvo el tubo colector. Luego se añadieron 500 µl del buffer AW, se centrifugó por 2 minutos a 13,500 rpm, se descartó el sobrenadante y se mantuvo el tubo colector. Nuevamente se añadieron 500 µl del buffer AW, se centrifugó por 2 minutos a 13,500 rpm, y se descartó el sobrenadante y el tubo colector. Luego se transfirió el filtrado a un nuevo tubo eppendorf de 1 ml, se añadieron 60 µl el buffer AE, se mantuvo la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 minuto a 13,500 rpm. Se almacenó el filtrado que correspondió a la primera dilución del ADN. Se transfirió el filtro a un nuevo tubo de colección de 1 ml, se añadieron 60 µl de buffer AE, se mantuvo la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 minuto a 13,500 rpm y finalmente se almacenó el sobrenadante a -20°C. Esta constituyó la segunda dilución del ADN y fue utilizada para realizar PCR convencional y de alta fidelidad.

### **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Para la amplificación del ADN se utilizó PCR convencional, se utilizaron 12.5 µl de la mezcla maestra (*master mix*) Go Green Tag, (Promega. Madison, WI), 2.50 µl del iniciador A, 2.50 µl del iniciador B y 2.50 µl de agua molecular para PCR. Los iniciadores específicos utilizados fueron: OI1 (5'-GCGCGTATGC AATACGAGCG GCA-3') y OI12 (5'-ATGGGTTGCG AAGTCGCGAG GC-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) (Deng et al., 2008a). Los controles positivos se obtuvieron de dos muestras de Lima Tahití

positivas para la enfermedad provenientes de la localidad de Adjuntas (muestra 899) y Juana Díaz, respectivamente. El control negativo estuvo constituido por agua molecular para PCR.

Se utilizó un termociclador modelo T 3000 (Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). El volumen total de reacción fue de 25 µl, conteniendo: 20 µl de mezcla del master mix Go Green Tag y 5 µl del ADN de cada una de las muestras. Se incluyeron controles positivos (+) y negativos (-). Los ciclos y tiempos de amplificación utilizados fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C, 94°C por dos minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturalización), 55°C por 1 minuto 30 segundos (hibridación) y 72°C 1 minuto. Finalmente 72°C por 10 minutos de extensión y la pausa a 4°C por tiempo indefinido (Das et al., 2007; Jagoueix et al., 1996).

Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 0.5%, teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). Se realizó una electroforesis a 100 V, 400 amperios por 35 minutos, utilizando el amortiguador (*buffer*) Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó una cámara visualizadora de rayos ultravioleta y el programa Quantity One, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de peso de 100 a 1000 bp (Sigma, St. Louis, USA).

### **PCR de alta fidelidad (Hi-Fi PCR)**

Se utilizaron tres buffers: Buffer Mix, Enzyme Mix y Template Mix (marca y distribuidor) que fueron preparados de la siguiente manera:

**Buffer Mix:** Se añadió 1.75 µl de dNTP, 8 µl del cebador OI1 (5'-GCGCGTATGC AATACGAGCG GCA-3'), 8 µl del cebador OI12 (5'-ATGGGTTGCG AAGTCGCGAG GC-3'), y 12 µl de ddH<sub>2</sub>O.

**Enzyme Mix:** Se añadió 1 µl de Taq y 0.2 µl de Accuzyme (Accuzyme, Cat. No. BIO-21051, BIO-21052, Bioline USA Inc).

**Template Mix:** Se añadió 5 µl de PCR buffer (Acuzyme), 1 µl de Enzyme Mix, 12.25 µl de ddH<sub>2</sub>O.

La reacción final contuvo 29.75 µl de Buffer Mix, 18.25 µl de Template Mix, 2 µl de ADN, un total de 50 µl.

Los ciclos y los tiempos de amplificación para el PCR de Alta fidelidad fueron los siguientes: temperatura inicial 94°C, desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido de 10 ciclos de: 94°C 10 segundos (desnaturalización), 56° C 30 segundos, 68° C 1 minuto, 25 ciclos de 94°C a 10 segundos (desnaturalización), 56°C 30 segundos, 68°C 1 minuto (hibridación) y finalmente una pausa a 4°C (Hoy et al., 2001; Jeyaprakash y Hoy, 2000).

### **Análisis de la secuencia 16S del ADN ribosomal**

La secuenciación de la región 16S rRNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* se realizó en Macrogen, Inc en Rockville, USA. Para la secuenciación se utilizaron los iniciadores OI1 y OI2. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas con otras especies. Una vez alineadas, se compararon sus homologías con otras especies a través de la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (para la sigla en inglés NCBI, GenBank) utilizando para dicha comparación el programa BLAST (Basic Local Alignment Search (Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)).

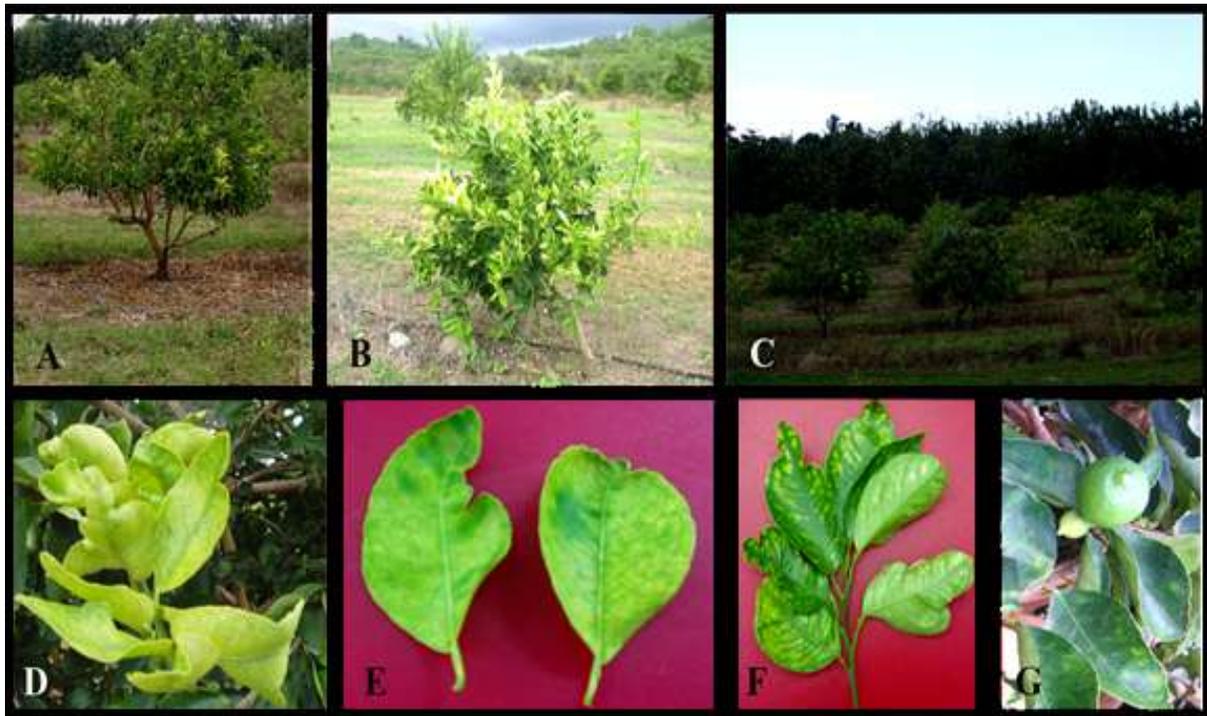
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Síntomas**

Se recolectaron muestras de cítricos con síntomas de clorosis y moteado distribuido en forma asimétrica, engrosamiento y amarillamiento de la nervadura central, alargamiento, deformaciones y reducción de tamaño de las hojas. Los frutos presentaron coloración amarillenta y deformaciones durante febrero 2010 a mayo 2011. Los árboles muestreados presentaron diversos síntomas de la enfermedad que incluyeron amarillamiento de hojas y defoliación (Figura 3.1).

Los síntomas observados fueron similares a los reportados como característicos para el Enverdecimiento de los Cítricos. Los síntomas primarios fueron: amarillamiento y patrones de moteado intervenal en las hojas. Los síntomas secundarios incluyeron hojas verticales, de tamaño reducido, patrones de clorosis similares a los producidos por la deficiencia de zinc. La variedad

en la severidad de los síntomas de la enfermedad puede deberse a diferencias en los cultivares entre los anteriores y los recientemente plantados así como la variabilidad en la virulencia de las cepas de *Ca. Liberibacter* (Deng et al., 2008b).



**Figura 3.1. Síntomas del Enverdecimiento de los cítricos en la Estación Experimental de Juana Díaz. A) Árbol de limón con síntomas de amarillamiento en las hojas, B) árbol de limón con síntomas de amarillamiento de las hojas, ramas y reducción del tamaño de la planta, C) Huerto de limón con síntomas del Enverdecimiento de los cítricos y D) Mosaico y clorosis en hojas de limón. E) Deformación del tejido foliar, patrón de mosaico y clorosis. G) Amarillamiento y reducción del tamaño del fruto.**

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR tradicional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
1	Isabela	N 18°27.930' W 065°03.946'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
2	Isabela	N 18°27.938' W 067°03.146'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
3	Isabela	N 18°27.944' W 065°03.138'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
4	Isabela	N 18°27.955' W 064°03.144'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
5	Isabela	N 18°28.016' W 067°02.979'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
6	Isabela	N 18°28.048' W 067°02.972'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
7	Isabela	N 18°28.054' W 067°02.985'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
8	Isabela	N 18°28.060' W 067°03.005'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
9	Isabela	N 18°28.071' W 067°03.014'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
343	Isabela	N 18°28.071' W 067°03.014'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	+
344	Isabela	N 18°30'02.79" W 67°01'27.65'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	+
345	Isabela	N 18°30'02.79" W 67°01'27.65'	Naranja "Valencia" <sup>2</sup>	+	+
346	Isabela	N 18°30'02.79" W 67°01'27.65'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	+
347	Isabela	N 18°30'02.79" W 67°01'27.65'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	+
350	Isabela	N 18°30'02.79" W 67°01'27.65'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
356	Isabela	N 18°30'02.79" W 67°01'27.65'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-

(1) *Citrus sinensis*

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
905	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Limón de cabro <sup>5</sup>	-	-
906	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Limón de cabro <sup>5</sup>	-	-
907	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Limón de cabro <sup>5</sup>	-	-
909	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Limón de cabro <sup>5</sup>	-	-
910	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
911	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
912	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
913	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
914	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Limón de Cabro <sup>3</sup>	+	+
915	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	+	+
916	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Carrizo <sup>3</sup>	+	+
955	Isabela	N 18° 28.071' W 067° 03.014'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	+
956	Isabela	N 18° 28.071' W 067° 03.014'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
957	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Thaiti <sup>3</sup>	-	-
958	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Limón del pais <sup>5</sup>	+	+
959	Adjuntas	N 18° 10 393' W 066° 47 825'	Mirto <sup>6</sup>	-	-
960	Adjuntas	N 18° 10 393' W 066° 47 825'	Mirto <sup>6</sup>	-	-

(1) *Citrus sinensis* (L.) Osb., (3) *Citrus latifolia* (Tan.), (5) *Citrus limon* (L.) Burm.f., (6) *Myrtus communis* L.

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
910	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
911	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
912	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
913	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	-	-
914	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Limón de Cabro <sup>3</sup>	+	+
915	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Cleopatra <sup>3</sup>	+	+
916	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78"	Thaiti-Carrizo <sup>3</sup>	+	+
955	Isabela	N 18° 28.071' W 067° 03.014'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	+
956	Isabela	N 18° 28.071' W 067° 03.014'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
957	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Thaiti <sup>3</sup>	-	-
958	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Limón del pais <sup>5</sup>	+	+
959	Adjuntas	N 18° 10 393' W 066° 47 825'	Mirto <sup>6</sup>	-	-
961	Adjuntas	N 18° 10 393' W 066° 47 825'	Mirto <sup>6</sup>	-	-
962	Adjuntas	N 18° 10 393' W 066° 47 825'	Mirto <sup>6</sup>	-	-
994	Juana Díaz	N 18° 03' 9.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>5</sup>	+	+
995	Juana Díaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>5</sup>	+	+

(1) *Citrus sinensis* (L.) Osb., (3) *Citrus latifolia* (Tan.), (5) *Citrus limon* (L.) Burm.f., (6) *Myrtus communis* L.

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
960	Adjuntas	N 18° 10 393' W 066° 47 825'	Mirto <sup>6</sup>	-	-
996	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>5</sup>	-	-
997	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>5</sup>	+	+
1053	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	-	-
1054	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	+	+
1055	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	+	+
1056	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	+	+
1057	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	+	+
1058	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	+	-
1059	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	-	-
1060	Corozal	N 18° 20'21.39" W066°19'37.78 "	Limón <sup>5</sup>	-	-
SS1AM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98 "	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS2AM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98 "	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS3AM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98 "	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS4AM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98 "	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS5AM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98 "	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-

(3) *Citrus latifolia* (Tan.), (5) *Citrus limon* (L.) Burm.f., (6) *Myrtus communis* L.

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
SS6AM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS7SM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS8SM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS9SM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SS10SM	San Sebastián	N 18° 20'34.04" W066°59'40.98"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG1A	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG2A	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG3A	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG4A	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG5A	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG6S	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG7S	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG8S	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG9S	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG10S	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
SG11B	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-

(3) *Citrus latifolia* (Tan.)

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
SG12B	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W 066° 57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
C3-10Y	Ciales	N 18° 17.603' W 066° 32.152'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
Ci1A	Ciales	N 18° 17.603' W 066° 32.152'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
Ci2A	Ciales	N 18° 17.594' W 066° 32.162'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
Ci3A	Ciales	N 18° 17.578' W 066° 32.168	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
Ci5A	Ciales	N 18° 17.635' W 066° 32.157'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
Ci6S	Ciales	N 18° 17.668' W 066° 32.162'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	+
Ci7S	Ciales	N 18° 17.669' W 066° 32.190'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	+
Ci8S	Ciales	N 18° 17.669' W 066° 32.190'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	+
Ci9S	Ciales	N 18° 17.584' W 066° 32.151'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	+
Ci10S	Ciales	N 18° 17.584' W 066° 32.143'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
IC2A	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17° 58'28.88" W 66° 17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC3A	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17° 58'28.88" W 66° 17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC4A	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17° 58'28.88" W 66° 17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC5A	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17° 58'28.88" W 66° 17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC6S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17° 58'28.88" W 66° 17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-

(1) *Citrus sinensis* (L.) Osb., (3) *Citrus latifolia* (Tan.)

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
1C7S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
1C1A	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
1C8S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
1C9S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
1C10S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
C2-1A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-2A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-3A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-5A	Ciales	N 18° 17.408' W 066° 20.482'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-6S	Ciales	N 18° 17.430' W 066° 20.473'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-7S	Ciales	N 18° 17.431' W 066° 20.468'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-8S	Ciales	N 18° 17.421' W 066° 20.469'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-9S	Ciales	N 18° 17.415' W 066° 20.471'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-10S	Ciales	N 18° 17.409' W 066° 20.456'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C3-1A	Ciales	N 18° 17.596' W 066° 21.768'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-4A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-

(1) *Citrus sinensis* (L.) Osb., (3) *Citrus latifolia* (Tan.),

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
C3-2A	Ciales	N 18° 17.593' W 066° 21.768'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C3-3 A	Ciales	N 18° 17.591' W 066° 21.768'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
C3-4A	Ciales	N 18° 17.586' W066° 21.770'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
IC7S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC1A	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC8S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC9S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
IC10S	Salinas, Hacienda Las carmen	N 17°58'28.88" W 66°17'30.61"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
C2-1A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-2A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-3A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-5A	Ciales	N 18° 17.408' W 066° 20.482'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-6S	Ciales	N 18° 17.430' W 066° 20.473'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-7S	Ciales	N 18° 17.431' W 066° 20.468'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-8S	Ciales	N 18° 17.421' W 066° 20.469'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-9S	Ciales	N 18° 17.415' W 066° 20.471'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-

(1) *Citrus sinensis* (L.) Osb., (3) *Citrus latifolia* (Tan.),

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
C2-10S	Ciales	N 18° 17.409' W 066° 20.456'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C3-1A	Ciales	N 18° 17.596' W 066° 21.768'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C2-4A	Ciales	N 18° 17.426' W 066° 20.486'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
C3-5A	Ciales	N 18° 17.603' W 066° 21.764'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
C3-6S	Ciales	N 18° 17.605' W 066° 21.762'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
C3-7S	Ciales	N 18° 17.606' W 066° 21.757'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
C3-8S	Ciales	N 18° 17.605' W 066° 21.762'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
C3-9S	Ciales	N 18° 17.583' W 066° 21.772	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	+	-
C3-10S	Ciales	N 18° 17.588' W 066° 21.770'	Naranja "Valencia" <sup>1</sup>	-	-
Vivero JE.	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	+
J. Diaz 2	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	+
J. Diaz-Lima	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	+
Sabana Grande	Sabana Grande	N 18° 05'01.99" W066°57'25.03"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	+
JDQ	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Limón <sup>5</sup>	-	-
JDR	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Limón <sup>5</sup>	+	+
J. Diaz-Limón	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Limón <sup>5</sup>	-	+

(1) *Citrus sinensis* (L.) Osb., (3) *Citrus latifolia* (Tan.), (5) *Citrus limon* (L.) Burm.f.

**Tabla 3.1. Muestras de cítricos utilizadas para determinar la eficiencia de PCR convencional y de alta fidelidad en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Identificación No/Letra	Localidad	Punto de GPS	Hospedero	PCR Convencional	PCR Alta Fidelidad
JD Control +	Juana Diaz	N 18° 03'09.00" W 066° 30' 16"	Limón <sup>5</sup>	-	+
ADQ	Adjuntas	N 18° 10' 531" W 066° 47' 909"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
ADR	Adjuntas	N 18° 10' 399" W 066° 47' 921"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	+	+
AD 1	Adjuntas	N 18° 10' 390" W 066° 47' 785"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	-
AD 2	Adjuntas	N 18° 10' 390" W 066° 47' 785"	Lima Tahiti <sup>3</sup>	-	+

(3) *Citrus latifolia* (Tan.), (5) *Citrus limon* (L.) Burm.f.

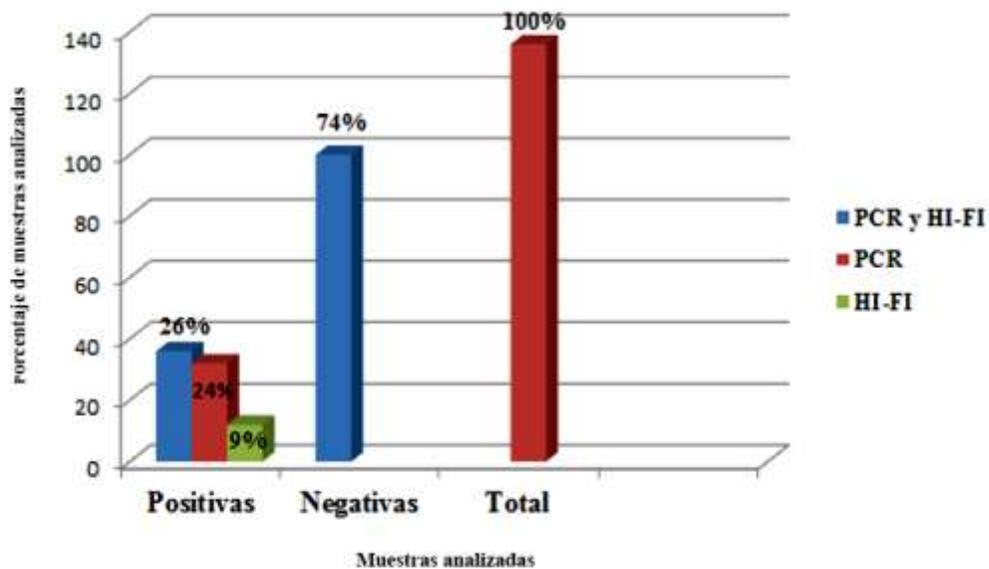
### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y del Alta Fidelidad**

Se analizaron un total de 138 muestras de cítricos provenientes de los municipios de Adjuntas, Ciales, Castañer, Corozal, Isabela, Juana Díaz, Sabana Grande, San Sebastián y Salinas, Puerto Rico (Tabla 1). Utilizando PCR convencional, 32 muestras (24%) fueron positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Estas fueron las muestras positivas de: Ciales (C3Y, C3-3A, C3-4A, C3-5A, C3-6S, C3-7S, C3-8S y C3-9S) (Figura 3.3); Isabela (343, 344, 345, 346 y 347) (Figura 3.4A), Juana Díaz (955, 958, 994, 995, 997 y JDR) (Figura 3.4A); Adjuntas (397, 889, 898 899 y ADR) (Figura 3.5A) y Corozal (914, 915 916, 1054, 1055, 1056, 1057 y 1058) (Figura 3.5A). Se obtuvo una banda de 1160 bp, utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Las muestras correspondientes a los municipios de Castañer, Sabana Grande, San Sebastián y Salinas fueron negativas.

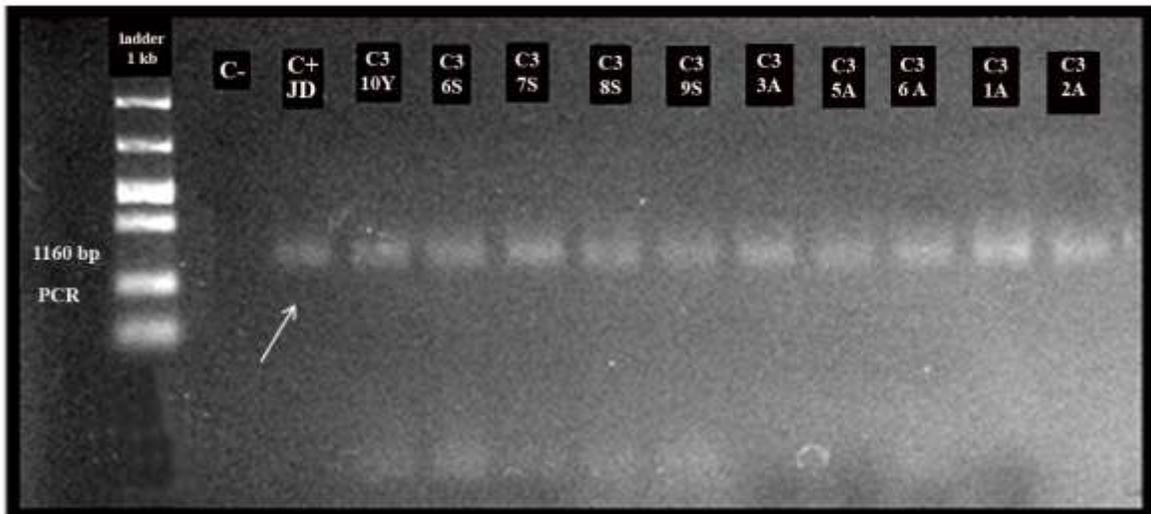
Mediante la técnica de PCR de Alta Fidelidad se logro identificar a *Ca. L. asiaticus* en 38 muestras (26% del total) (Figura 3.3) provenientes de las localidades de: Adjuntas (395, 397, ADR 889 897, 898, 899 y AD2) (Figura 3.5B), Ciales (Ci6S, Ci7S, Ci8S y Ci9S), Corozal (914, 915 916, 1054, 1055, 1056 y 1057) (Figura 3.5B), Isabela (343, 344, 345, 346, 347 y 955),

Juana Díaz (958, 994, 995, 997, Vivero, J. Díaz lima, J. Díaz limón, JD2 y JDR, JD control + y Sabana Grande (Figuras 3.4B y 3.5). Las muestras correspondientes a los municipios de Castañer, San Sebastián y Salinas fueron negativas.

Al comparar las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad en la detección de *Ca. L. asiaticus*, la técnica de PCR de Alta Fidelidad fue más sensible que PCR convencional. Esta técnica permitió identificar a la bacteria en 12 muestras (9% del total) (Figura 3.3) catalogadas como negativas con la PCR convencional: Adjuntas: ADR y AD2, Ciales: Ci6S, Ci7S, Ci8S y Ci9S, Juana Díaz: Vivero JE, J. Díaz lima, Díaz limón, JD2 y JD control positivo + y Sabana Grande (Figuras 3.4B, 3.5 y 3.6).



**Figura 3.2. Porcentaje de muestras positivas para *Ca. L. asiaticus* con las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad. Muestras Positivas incluyen: PCR convencional, y de Alta Fidelidad y PCR de Alta Fidelidad. Ejes Y: Porcentajes del total de muestras analizadas, muestras positivas y negativas para *Ca. L. asiaticus*.**



**Figura 3.3.** Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C - , control positivo C+, (Juana Díaz), muestras provenientes de Ciales: C3-10Y, C3-6S, C3-7S, C3-8S, C3-9S, C3-3<sup>a</sup>, C3-5A, C3-4A, C3-1A y C3-2A. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional en 1160 bp.

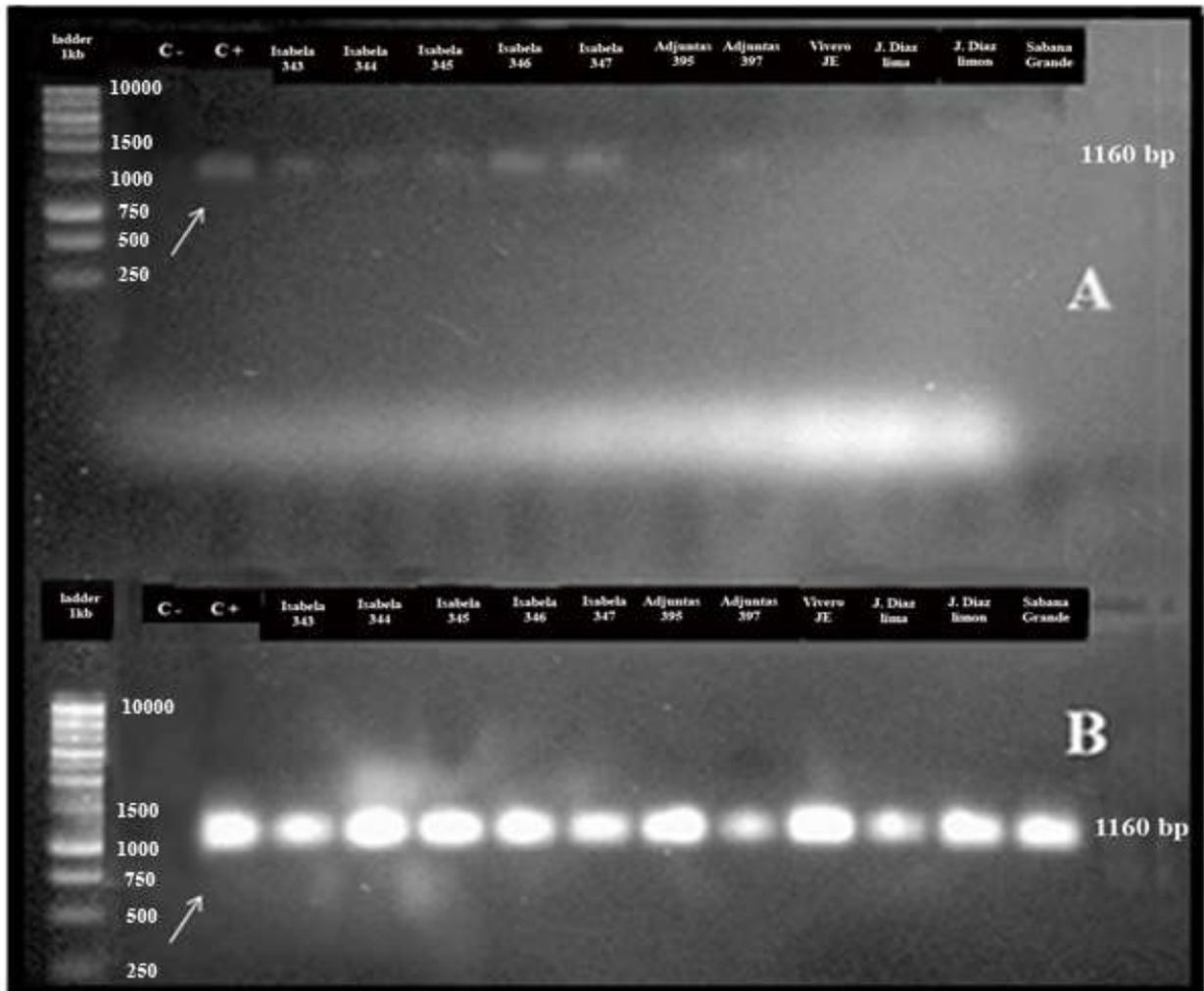


Figura 3.4. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C - , control positivo C+, (Juana Díaz), muestras provenientes de Isabela: 343, 344, 345, 346 y 347, Adjuntas: 395 y 397, Juana Díaz: Vivero JE, J. Díaz lima, J. Díaz limón y Sabana Grande. A) PCR convencional y B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 1160 bp.

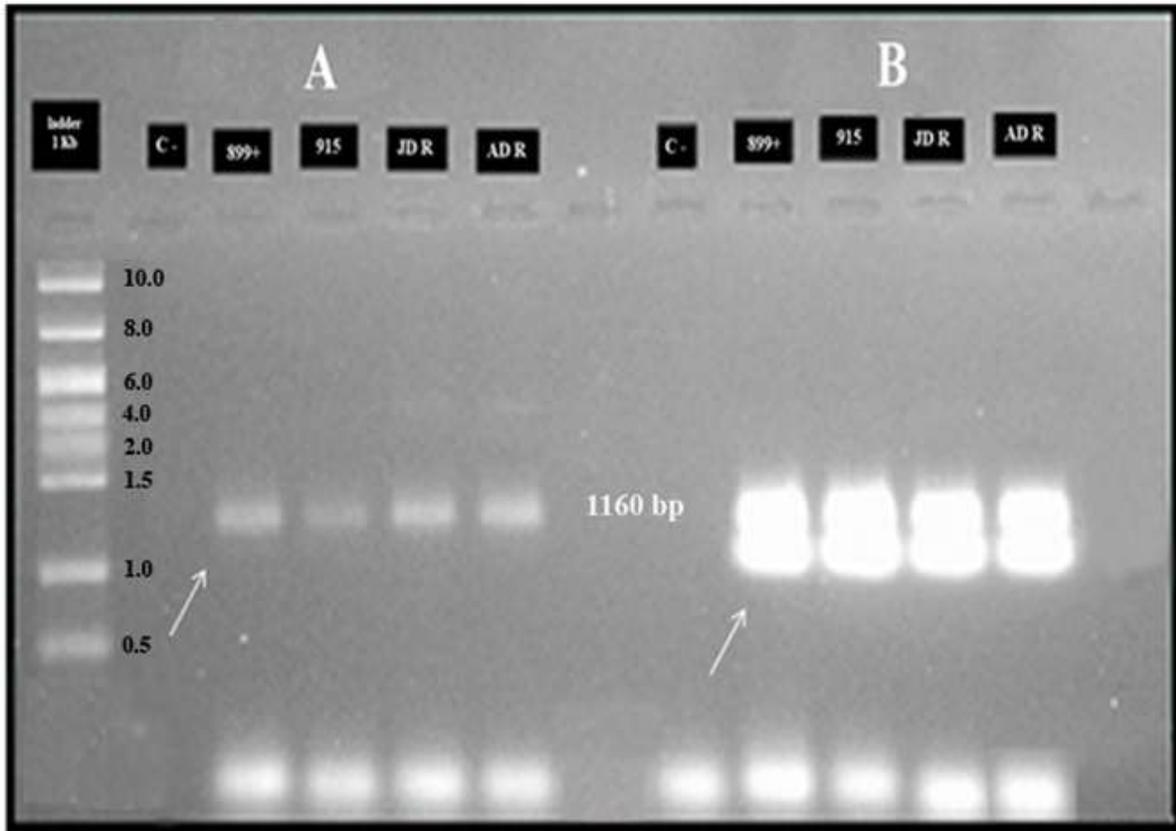


Figura 3.5. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C - , control positivo C+ muestra 899, (Adjuntas), muestras provenientes de Adjuntas ADR, Corozal: 915 y Juana Díaz: JD R. A) PCR convencional y B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 1160 bp.

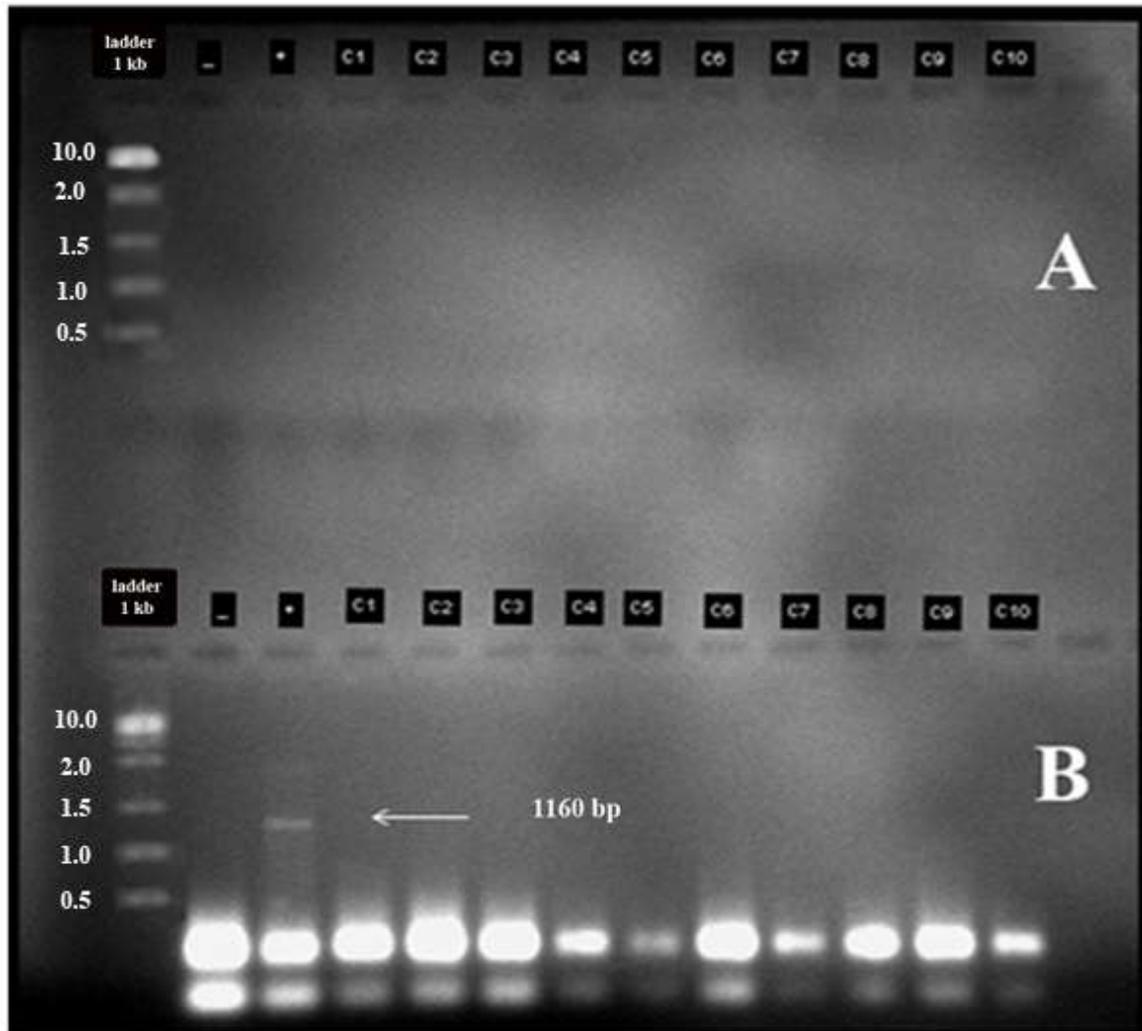


Figura 3.6. Gel de agarosa para la determinación de *Candidatus Liberibacter asiticus* utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Ladder (1kb bp), control negativo C -, control positivo C+, (Juana Díaz), muestras provenientes Ciales: C1, C3, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C8 y C10. A) PCR convencional y B) PCR de Alta Fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR de Alta Fidelidad de 1160 bp en el control positivo C+ (Juana Díaz).

En esta investigación la técnica de PCR convencional utilizando los iniciadores OI1 y OI2 identificó a *Candidatus Liberibacter asiaticus* en 32 de las muestras analizadas (24%) (Figura 1). Esta técnica también identificó a *Ca. L. asiaticus* a partir de tejido vegetal de plantas sintomáticas y asintomáticas en investigaciones previas (Deng, 2008a, Hung et al., 2004, Jagoueix et al., 1997 y Khairulmazmi et al., 2008). Con el uso de los iniciadores OI1 y OI2 diseñados a partir de la región 16S rRNA se logró amplificar un fragmento de DNA de 1160 pares de bases correspondiente al peso molecular reportado para la bacteria (Deng, 2008a y 2008b; Estévez et al., 2009). Jagoueix y colaboradores (1997) reportaron que el primer OI2 posee alta especificidad para identificar a *Ca. L. asiaticus* así como también para otras especies pertenecientes al género como *Ca. L. africanus* y *americanus*. Además, este iniciador amplifica el ADN de la bacteria sin amplificar el ADN de la planta durante el proceso de PCR.

La PCR convencional ha tenido gran aplicabilidad en el diagnóstico del enverdecimiento de los cítricos. Utilizando esta técnica Irey y colaboradores (2004) diagnosticaron el HLB en huertos de cítricos en Florida puntualizando la eficiencia del uso de técnicas moleculares en comparación al diagnóstico por síntomas visuales para establecer la incidencia de la enfermedad. Jagoueix, et al. (1994) y Deng y colaboradores (2008a, 2008b) realizaron la caracterización molecular de las tres especies miembros del género *Candidatus Liberibacter* para la determinación taxonómica y el establecimiento de relaciones filogenéticas.

A pesar de su eficiencia, la técnica de PCR en la identificación de CLA posee ciertas limitaciones relacionadas con la obtención de una alta frecuencia de falsos negativos (Wilson, 1997). Los falsos negativos pueden ser generados como consecuencia de que los iniciadores OI1 y OI2 son cortos ya que han sido diseñados a partir de una porción conocida de la región 16S más no de la región completa (Hoy et al., 2001; Deng et al., 2008b). Además, las secuencias 23S rRNA, 23S- 5S ITS y el gen 5S rRNA del genoma de *Ca. L. asiaticus* no han sido reportadas (Deng et al., 2008a). Se podría lograr mayor eficiencia en la identificación no únicamente de *Ca. Liberibacter asiaticus* sino de las otras dos especies causantes del Enverdecimiento de los Cítricos: *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus* si se obtuviese información más completa sobre la secuencia de las regiones 5S, 16S, 23S e ITS (Deng et al., 2008a).

El uso de otros iniciadores disponibles puede optimizar la identificación del patógeno como los iniciadores ITSaf/ITSAr (Deng et al., 2008a) y los nusG-rp/K. Estos han permitido amplificar un fragmento de ADN de 5005 bp y de mayor intensidad que aquella lograda con los

iniciadores OI1 y OI12, sugiriendo más sensibilidad en la detección de CLA a partir de iniciadores con secuencias largas (Deng et al., 2008a). Los iniciadores de mayor longitud incrementan la eficiencia de la PCR convencional en dos órdenes de magnitud en bajas concentraciones de ADN, por esta razón al usar los iniciadores 16S se produce una banda tenue y débil indicando fuerte inhibición de la PCR convencional cuando el DNA de la planta está presente (Hoy et al., 2001). El uso de iniciadores conservados diseñados a partir de las secuencias disponibles provenientes de bacterias filogenéticamente relacionadas también podría mejorar la amplificación del ADN utilizando PCR convencional (Deng et al., 2008a).

El uso de la innovadora técnica del PCR de Alta Fidelidad recientemente utilizada en el diagnóstico de microorganismos fitopatógenos ha demostrado mayor eficiencia y sensibilidad que PCR convencional (Hoy et al., 2001; Vincelli y Tisserat, 2008). En la presente investigación la técnica de PCR de Alta Fidelidad utilizando los iniciadores OI1 y OI2 logró amplificar una secuencia de 1160 bp correspondiente a *Ca. L. asiaticus* generando una banda brillante y de mayor definición que aquella generada con la PCR convencional. La variación en la intensidad de las bandas se relaciona directamente con el nivel del amplicón obtenido (secuencia de ADN), un nivel bajo del amplicón se manifiesta con bandas tenues mientras que un nivel alto se manifiesta con bandas claramente visibles (Deng et al., 2008a).

Esta técnica permitió la identificación de 12 muestras (9% del total de muestras analizadas) identificadas como negativas con el PCR convencional, reduciendo la frecuencia de falsos negativos (Hoy et al., 2001). La eficiencia del PCR de alta fidelidad radica en la utilización de elementos como: la enzima Accuzyme que previene la degradación de los iniciadores y el ADN de interés durante el ciclo de PCR proveyendo alta sensibilidad. En adición el buffer HotStar de Alta Fidelidad contiene el factor SB que optimiza los dNTP's y MgSO<sub>4</sub>, este factor provee fuerte sensibilidad y confiabilidad en la técnica, la enzima "Hot Star" incrementa diez veces la precisión de la enzima Taq polimerasa constituyéndose en una poderosa herramienta para aplicaciones de PCR que requieren bajo error (Hoy et al., 2001; Quiagen, 2010). La concentración de los iniciadores es otro de los factores esenciales en la técnica, 100x versus el PCR convencional que utiliza los iniciadores en concentración 1x.

Comparativamente, la sensibilidad lograda en el análisis con las técnicas de PCR convencional y la de Alta Fidelidad, demostró que esta última es más sensible que la técnica de PCR convencional. El PCR de alta fidelidad es significativamente más sensible que el PCR

convencional hasta en cinco ordenes de magnitud (Hoy et al., 2001; Jeyaprakash y Hoy, 2000) La PCR de alta fidelidad ha permitido identificar a *Ca. L. asiaticus* en presencia del ADN de la planta analizada, del psílido vector e incluso del parasitoide del psílido. La PCR de alta fidelidad logró sustentar la hipótesis de la introducción accidental de *Ca. L. asiaticus* a la Florida a través del parasitoide, *Tamarixia radiata* (Hoy et al., 2001).

La PCR de alta fidelidad ha demostrado su eficiencia en la identificación de patógenos potenciales a partir de bajas concentraciones de ADN. Esta técnica es capaz de detectar hasta 1 fg del ADN blanco en presencia del ADN del hospedero (Cating et al., 2012). Se logró identificar a *Sclerotium rolfsii* y *Dickeya* sp. a partir del tejido vegetal de orquídeas, confirmando la alta eficiencia del PCR de Alta Fidelidad con respecto a la técnica convencional.

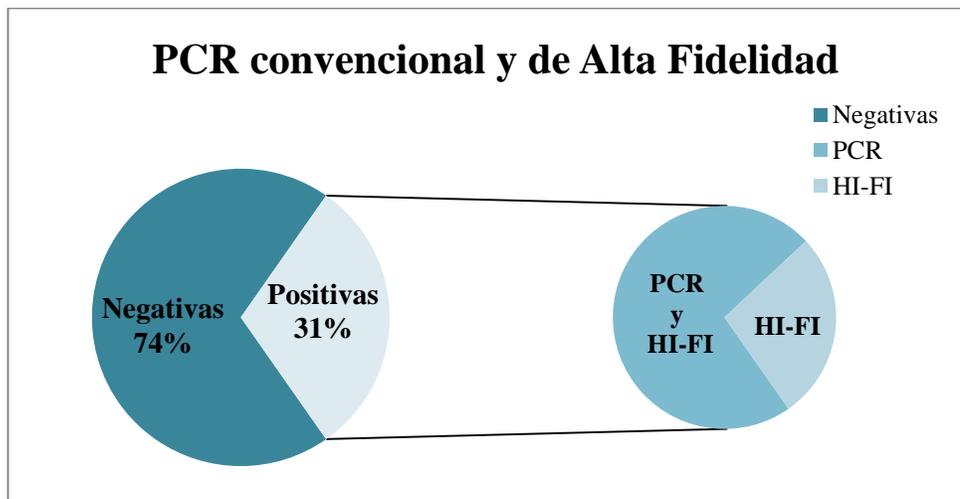
La capacidad del PCR de Alta Fidelidad de detectar al patógeno potencial en presencia del ADN del hospedero es de gran utilidad e importancia para una detección temprana del patógeno aun cuando los síntomas de la enfermedad no sean evidentes. El patógeno puede ser detectado cuando se encuentre en estado de latencia, en bajas concentraciones, no pueda ser cultivado y/o cuando su ADN se encuentre combinado con el de la planta hospedera o el insecto vector (Cating et al., 2012; Hilgenboecker et al., 2008; Hoy et al., 2001; Hung, 2004).

A pesar del éxito logrado con las técnicas de PCR convencional y el de alta fidelidad, se recomienda combinar la identificación molecular con identificación visual de síntomas para discriminar óptimamente entre los síntomas característicos del Enverdecimiento de los Cítricos y aquellos causados por deficiencias nutricionales como por ejemplo la deficiencia de zinc (Deng et al., 2008a; Irely et al., 2006).

En la presente investigación, las técnicas moleculares tanto el PCR convencional como el de Alta Fidelidad mostraron concordancia entre los síntomas observados y los resultados de la identificación molecular. En la investigación realizada por Deng y colaboradores (2008a) se mostró una concordancia de más de un 80% entre los síntomas observados y los resultados de la identificación con la técnica de PCR utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Por lo tanto, la sintomatología característica del HLB continua siendo efectiva y puede utilizarse como un diagnóstico presuntivo de la enfermedad siempre y cuando la evaluación la realice un profesional con experiencia (Deng et al., 2008b).

La identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* con PCR convencional y de Alta Fidelidad fue compleja. Se esperó un mayor número de muestras positivas ya que de un total de

138 muestras analizadas solo se logró identificar al patógeno en 44 muestras (31%) mientras que 102 muestras (74%) fueron negativas (Figura 3.7). De las 44 muestras, 32 (23%) fueron positivas para *Ca. L. asiaticus* con la técnica de PCR convencional y 36 (26%) fueron positivas con la PCR de Alta Fidelidad. Dentro de las 36 están incluidas las 32 muestras positivas con PCR convencional. La PCR de Alta Fidelidad identificó a *Ca. L. asiaticus* en 12 (9%) muestras adicionales en las cuales la PCR convencional no logró detectar a la bacteria (Figuras 3.2 y 3.7).



**Figura 3.7. Porcentaje de muestras positivas para *Ca. L. asiaticus* con las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad (HI-FI). Muestras positivas incluyen: HI-FI, PCR y HI-FI.**

Las dificultades en la identificación del patógeno se deben principalmente a que CAL es una bacteria no cultivable en condiciones in vitro y a la escasa cantidad de material genético (ADN) en los cítricos afectados por HLB. Estos factores impiden obtener cantidades suficientes de ADN para los estudios de genómica, también aumenta la probabilidad de amplificar ADN de otras bacterias endofíticas sensibles, principalmente cuando en las técnicas moleculares se utilizan iniciadores de regiones conservados del genoma (Deng et al., 2008a; Garnier et al., 2000). Otro factor limitante es la distribución heterogénea de *Ca. L.* en la planta (Deng et al., 2008a; Ireys et al., 2006). A pesar de que se seleccione una porción sintomática de la planta que presente todos los síntomas de la enfermedad y que se encuentre severamente afectada, no necesariamente será positiva al realizar la identificación molecular del CAL, debido a que el

patógeno circula por los vasos floemáticos y puede alojarse indistintamente en la planta. Este factor también produce diferencias en la sensibilidad en la detección entre las muestras a causa del contenido de ADN en cada muestra (Deng, 2008b; Irey et al., 2006).

Existen condiciones limitantes para la identificación de *Ca. L. asiaticus* relacionados directamente con fallas en el proceso de amplificación mediante PCR como: la inhibición de la reacción por la inhabilidad del primer o de la secuencia blanco de ADN a hibridizarse por causa de un bloqueo no específico y producir una lectura engañosa o una variación en las bandas durante el PCR. La presencia de células bacterianas, residuos, anticuerpos, enzimas, proteínas, polisacáridos, compuestos orgánicos e inorgánicos y soluciones salinas (buffers) pueden causar inhibición. Efectos físicos en la reacción de PCR pueden hacer que la secuencia blanco de DNA no esté disponible para la enzima polimerasa. El uso de iniciadores en altas concentraciones puede inhibir la reacción produciendo una interrupción en la fase de extensión de la cadena de ADN sintetizada por medio de la Taq polimerasa como consecuencia de la no complementariedad del iniciador (primer) (Newsletter Microbial, 2009; Wilson, 1997).

Las muestras identificadas como positivas para *Ca. L. asiaticus* no fueron óptimamente secuenciadas, sin embargo esto no repercute en la veracidad de la identificación molecular utilizando los iniciadores OI1 y OI12. Para superar esta deficiencia se sugiere realizar clonación utilizando plásmidos pMD18-T antes de secuenciar el material genético (Deng et al., 2008b). El material genético fue evaluado 18 meses después y no fue posible amplificar nuevamente la secuencia correspondiente al gen 16S de la bacteria. El DNA amplificado con las técnicas moleculares que ha sido almacenado puede ser degradado debido a que la estructura primaria del ADN es susceptible a la inestabilidad, deterioro, hidrólisis, metilación y degradación enzimática y daño oxidativo (Wilson, 1997).

Debido a la complejidad intrínseca del patógeno y de su identificación se están implementando nuevas tecnologías y métodos de detección que involucran el desarrollo de anticuerpos específicos diseñados a partir de antígenos provenientes de proteínas bacterianas, los cuales permiten la detección serológica de HLB. Se ha determinado que el uso anticuerpos monoclonales puede lograr la diferenciación entre cepas de *Ca. Liberibacter* de diferentes orígenes, aunque la identidad de los antígenos específicos aun sea desconocida (Deng et al., 2008b). Al momento su detección depende primordialmente de técnicas moleculares como el PCR convencional y de Alta Fidelidad.

## CONCLUSIONES

- Las muestras utilizadas en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* presentaron síntomas de amarillamiento de las hojas, clorosis y moteado distribuido en forma asimétrica, engrosamiento y amarillamiento de la nervadura central, alargamiento, deformaciones y reducción de tamaño de las hojas. Los frutos presentaron coloración amarillenta y deformaciones.
- La PCR convencional y de alta fidelidad con los cebadores OI1 y OI2 amplificaron fragmentos de ADN de 1160 bp correspondientes a *Candidatus Liberibacter asiaticus*.
- *Candidatus Liberibacter asiaticus* fue identificado con PCR convencional y de alta fidelidad en el tejido vegetal de plantas de lima Tahití (*Citrus latifolia.*), limón (*Citrus limón*), obtenido en viveros localizados en Adjuntas, Corozal, Juana Díaz, Sabana Grande, San Sebastián; y de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) de dos huertos comerciales localizados en Ciales, Castañer e Isabela.
- La PCR de alta Fidelidad demostró mayor sensibilidad que la PCR convencional en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Amplificó un fragmento de ADN de 1160 bp en 12 de las muestras que resultaron negativas con la PCR convencional.

## RECOMENDACIONES

- La PCR convencional y PCR de alta fidelidad deben ser utilizadas para el diagnóstico rápido y oportuno de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.
- Establecer protocolos para PCR convencional y de Alta Fidelidad que permitan identificar a *Candidatus Liberibacter asiaticus* a partir del insecto vector, el psílido, *Diaphorina citri* y del parasitoide del psílido, *Tamarixia radiata*.
- Implementar el diagnóstico molecular en la certificación de viveros de cítricos para evitar la diseminación del Enverdecimiento de los cítricos
- Desarrollar la técnica de PCR en tiempo real (Real Time PCR) para lograr la cuantificación exacta del material genético de *Candidatus liberibacter asiaticus*.
- Evaluar otros cebadores como rplA2/rplJ5, GB1/GB3 (Bové, 2006) para la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of Citrus. *J. Plant Pathol.* 88 (1): 7-37.
- Cating, R. A., Hoy, M. A. and Palmateer, A. J. 2012. A Comparison of Standard and High-Fidelity PCR: Evaluating Quantification and Detection of Pathogen DNA in the Presence of Orchid Host Tissue. *96 (4): 480-485.*
- Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu, Jr., J. and Machado, M. A. 2004. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in Brazil. *Plant Disease* 88 (12).
- Da Gaca, J. V. 1991. Citrus Greening Disease. *Ann. Rev. Phytopathology* 29:109-136.
- Das, A. K., Rao, C. N. and Shyam Singh. 2007. Presence of citrus greening (Huanglongbing) disease and its psyllid vector in the North-Eastern region of India confirmed by PCR technique. *Curr. Sci.* 92 (12): 1759-1763.
- Estévez de Jensen, C., Roman, F., Abreu, E. Alvarado, A. y Ortiz, O. 2009. Presencia del Enverdecimiento de los Cítricos en Puerto Rico. *Memorias de la Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas.* p.5. Hato Rey, PR.
- Garnier, M. and Bove, J-M. Citrus Greening Disease and the Greening Bacterium Citrus Greening Disease. pp: 212-219. In: Twelfth ZOCV Conference.
- González, P. C., Etxeberria, Ed., Achor, D, Dawson, W., Spann, T., Yates, J. D. and Albrigo, D. 2008. Uso de la reacción almidón – yodo para la selección de hojas sospechosas con HLB: distribución anatómica de niveles anormalmente altos de almidón en arboles de naranja valencia positivos al HLB. Horticultural Sciences Department , University of Florida, IFAS, Citrus Research and Education Center, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, Florida 33850.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K.L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 330-353.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215–220.

- Hoy, M. A., Jeyaprakash, A., and Nguyen, R. 2001. Long PCR is a sensitive method for Detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological control* 22:278-287.
- InfoStat (2005). *InfoStat versión 2005*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Irey, M., Gast, T. and Gottwald, T. R. 2006. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. *Proc. Fla. State. Hort. Soc.* 119: 89-93.
- Jagoueix, S.; Bove, J. M and Garnier, M. 1994. The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus. Is a Member of the a Subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (3): 379-386.
- Jagoueix, S., Bove, J. M. & Garnier, M. 1996. Techniques for the Specific Detection of the Two Huanglongbing(Greening) *Liberobacter* Species: ADN/ADN Hybridization and ADN Amplification by PCR. *Mol. Cell. Probes* 10: 43-50.
- Jagoueix, S.; Bove, J. M AND Garnier, M.. 1997. Comparison of the 16S/23S Ribosomal Intergenic Regions of “*Candidatus Liberobacter asiaticum*” and “*Candidatus Liberobacter africanum*,” the Two Species Associated with Citrus Huanglongbing (Greening) Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (1): 224–227.
- Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* ADN amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9:393-405.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M. A. 2004. Multiple displacement amplification in combination with *high-fidelityPCR* improves detection of bacteria from single females or eggs of *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 86 (3): 111-116.
- Karunasagar, D., Balarama- Krishna, M. V., Maruthi- Mohan, P. and Arunachalam, J. 2004. Rapid detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) disease using PCR. *Current Science* 87 (9): 1183-1185.
- Khairulmazmi, A., Kamaruzaman, S., Habibuddin, H., Kadir, J. and Syed Rastan, S. O. 2008. Cloning and sequencing of *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolated from citrus trees in Malaysia. *International Journal of Agriculture and Biology* 10( 4):417-421.

- Kim, J-S., Shankar Sagaram, U., Burns, J. K., Li, J. L. and Wang, N. 2009. Response of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Infection: Microscopy and Microarray Analyses. *Phytopathology* 99(1): 50-57.
- Manjunath, K. L, Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S. and Lee, R. F. 2008. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and Its Importance in the Management of Citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98 ( 4): 387-396  
[http://www.extension.org/pages/Citrus\\_Greening\\_\(Candidatus\\_Liberibacter\\_asiaticus\)](http://www.extension.org/pages/Citrus_Greening_(Candidatus_Liberibacter_asiaticus))
- Rivera, G. 2006. Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis de Maestría. Depto de Biología. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. p. 20.
- Deng, X., Chen, J., Li, H. 2008a. Sequestering from host and characterization of sequence of a ribosomal RNA operon (rrn) from “*Candidatus Liberibacter asiaticus* Molecular and Cellular Probes 22: 338–340.
- Deng, X., Chen, J., Feng, Z., Shan, Z., Guo, H., J. Zhu, Li, H. and Civerolo, E. L. 2008b. Identification and Characterization of the Huanglongbing Bacterium in Pummelo from Multiple Locations in Guangdong, P. R. China. *Plant Disease* 92 (4): 513-518.
- Diario Dominicano. Apetecible oportunidad para las naranjas de RD y Puerto Rico. 30 de enero del 2012. <http://diariodominicano.com/economia/2012/01/30/102765/apetecible-oportunidad-para-las-naranjas-de-rd-y-puerto-rico>.
- Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P. R., Le Roux, H. F. and Bove, J. M. 2000. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of ‘*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. capensis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2119–2125.
- Gottwald, T. R. 2010. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48: 119-139.
- Hoy, M. A., Jeyaprakash, A., and Nguyen, R. 2001. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological Control* 22:278-287.

- Hung, T. H., Wu, M. L. and Su, H. J. 1999. Development of A Rapid Method for the Diagnosis of Citrus Greening Disease using the Polymerase Chain Reaction. *J. Phytopathology* 147: 599-604.
- Hung, T. H., Hung, S.C., Chen, C.N., Hsu, M. H. and Su, H. J. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. *Plant Pathology* 53: 96–102.
- Newsletter Microbial. 2009. La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. Newsletter Microbial 3: 1-2. <http://www.microbial-systems.com>
- Pluke, R. W. H., Escribano, A., Michaud, J. P. and Stansly, P. A. 2005. Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (homoptera: psyllidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist* 88(2): 123-128.
- Pluke, R. W. H., Qureshi, J. A. and Stansly, P. A. 2008. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia rabiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. *Florida Entomology* 91 (1): 36-42.
- Ramos-Méndez, E. 2008. Huanglongbing (“Citrus Greening”) y el psílido asiático de los cítricos, Una perspectiva de su situación actual. *Revista Tecnica Agrosanitario*: 5-19. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/CaracterizacionHLB.pdf>
- Tomimura, K., Miyata, S., Furuya, N., Kubota, K., Okuda, M., Subandiyah, S., Hung, T-H., Ji Su, H. and Iwanami, T. 2009. Evaluation of Genetic Diversity Among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Isolates Collected in Southeast Asia. *Phytopathology* 99 (9): 1062-1069.
- Vincelli, P. and Tisserat, N. A. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Dis.* Vol. 92 No.5:660-669.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *applied and environmental microbiology* 63 (10): 3741–3751

## CAPÍTULO 4

### IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Pythium* sp., AFECTANDO CILANTRILLO EN HIDROPONÍA

#### RESUMEN

La pudrición de la raíz causada por *Pythium* spp. es un problema recurrente en cultivos hidropónicos de cilantrillo (*Coriandrum sativum* L.) en Puerto Rico. En el año 2010 *Pythium* spp. causó pérdidas en cultivos hidropónicos de cilantrillo y lechuga en el municipio de Adjuntas. Se aisló *Pythium* spp. a partir de tejido afectado de cilantrillo en medios de cultivo papa dextrosa (PDA) y agar agua (WA) con antibióticos. Se realizaron inoculaciones con *Pythium* spp. en cilantrillo variedad 'Lonestar' y se observaron manchas necróticas en la parte inferior del tallo y en la raíz después de 21 días de la inoculación. En arveja (*Pisum sativum* L.) cv. 'Sugar Baby' se observaron lesiones necróticas 15 días después de la inoculación. *Pythium* spp. se re aisló desde el tejido enfermo. Las características morfológicas observadas en los aislados 1271 y 1272 corresponden a la especie *P. dissotocum*. El micelio fue algodonoso, abundante y de color blanco con hifas de 10.12  $\mu\text{m}$  de ancho. Se observaron esporangios terminales y filamentosos, formando estructuras dendroides, oogonias subglobosas y terminales de diámetro promedio de 20.55  $\mu\text{m}$ . Las oogonias contienen una única oospora aplerótica de 17.18  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las oosporas germinadas miden 21.51  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen un tubo germinativo. Se observaron también anteridios monoclinos rodeando a la oogonia. El PCR convencional y el de Alta Fidelidad con los cebadores ITS1/ITS4 amplificaron una banda de 808 bp a partir del ADN del aislado 1271 directamente del tejido vegetal de las plantas inoculadas. Los resultados de la secuenciación mostraron un 99% de homología con *Pythium dissotocum*. La detección temprana del patógeno puede ser crucial para implementar prácticas de manejo en sistemas hidropónicos.

**Palabras claves:** Pudrición de la raíz, *Pythium* sp., *Pythium dissotocum*, cilantrillo, PCR, hidropónicos.

## IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Pythium* sp., AFFECTING CILANTRO IN HYDROPONIC CROPS

### ABSTRACT

The root rot caused by *Pythium* spp. is a recurrent problem in hydroponic cilantro (*Coriandrum sativum* L.) crops in Puerto Rico. In 2010, *Pythium* spp. caused crop losses in cilantro and lettuce hydroponically in municipality of Adjuntas. *Pythium* spp was isolated from affected tissue of cilantro in culture media potato dextrose (PDA) and water agar (WA) with antibiotics. In cilantro variety 'Lonestar' necrotic spots were observed in the lower stem and root 21 days after inoculation. In pea (*Pisum sativum* L.) cv. 'Sugar Baby' necrotic lesions were observed 15 days after inoculation. *Pythium* spp was isolated from diseased tissue. The morphological characteristics observed in isolates 1271 and 1272 correspond to *P. dissotocum*. The mycelium was cottony, white and abundant with hyphae of 10.12  $\mu\text{m}$  in diameter. Sporangia filamentous and terminal was observed forming dendroids structures. Oogonia subglobose and terminal of 20.55  $\mu\text{m}$  in diameter was observed. The oogonia contain a single oospore aplerotic of 17.18  $\mu\text{m}$  in diameter. Oospores germinated of 21.51  $\mu\text{m}$  in diameter with germ tube. Antheridia monoclinos were observed encircling the oogonium. The conventional PCR and High Fidelity with primers ITS1/ITS4 amplified a band of 808 bp from the DNA of isolate 1271 directly from the tissue of inoculated plants. The sequencing results showed a 99% homology with *Pythium dissotocum*. Early detection of the pathogen can be crucial to implement management practices in hydroponic systems.

**Key words:** *Pythium* root rot, *Pythium* spp., *Pythium dissotocum*, cilantro, PCR, hydroponics

## INTRODUCCIÓN

El género *Pythium* taxonómicamente se encuentra clasificado dentro de la familia Pythiaceae, clase Oomycetes, orden Peronosporales (All – Shtayeh, 1986). Las especies miembros del género son cosmopolitas y generalistas. Se encuentran en zonas tropicales, templadas y frías, ocupando un amplio rango de hábitats tales como de vida libre en agua fresca, salada o en el suelo y principalmente como patógenos de plantas considerándose unos de los patógenos más destructivos, ya que contienen enzimas pectolíticas y celulíticas que destruyen el tejido vegetal (All – Shtayeh, 1986; Van Der Plaats-Niterink, 1981).

Las especies de *Pythium* constituyen una de las causas más comunes y de mayor importancia de la pudrición de las semillas, sancochos (“damping-off”) y pudrición de las raíces en todo tipo de plantas (Agrios, 2005; All – Shtayeh, 1986). Producen síntomas que se manifiestan como una falla en la germinación de las semillas (sancocho pre-emergente) o como la muerte de las plántulas (sancocho post-emergente) (Agrios, 2005). El sancocho pre-emergente afecta la germinación de las semillas. Estas se tornan suaves y de color marrón, se marchitan y finalmente se desintegran (Agrios, 2005; Hagedorn, 1984; Koike et al., 2007). El sancocho post-emergente afecta al desarrollo de las plántulas poco tiempo después de emerger. La infección puede ser más drástica en plántulas, los daños se producen a nivel de la raíz, tallo o bajo la línea del suelo; en la raíz se produce pudrición y lesiones caféas, necróticas. En el tallo hay retraso en el crecimiento y el follaje suele ser clorótico (Agrios, 2005; Hagedorn, 1984; Koike et al., 2003). Algunas de las especies de *Pythium* que producen sancocho pre y post-emergente y causan severos daños al sistema radicular y la base del tallo son: *P. ultimum* (Chen et al., 1987) *P. irregulare*, *P. artotrogus*, *P. debaryanum*, *P. mastophorum*, *P. paroecandrum* (Koike et al., 2003), *P. aphanidermtum* (Koffi et al., 2010; Utkhede et al. 2000) y *Pythium coloratum* (Herrero et al., 2003).

La identificación de las especies del género se ha realizado en primera instancia en base al estudio detallado de la morfología intrínseca del género. Se han considerado características como la coloración del micelio que varían de transparente o amarillento, a grisáceo o lila; las dimensiones y formas de hifas, anteridios, esporangios, esporas, oogonios, oosporas y zoosporas que varían en tamaño y forma dependiendo la especie (Van Der Plaats-Niterink, 1981). *Pythium* afecta un amplio rango de plantas incluyendo varias especies de vegetales y leguminosas como *Pisum sativum* (Fabaceae) (Hagedorn, 1984), *Lactuca sativa* (Asteraceae) y umbelíferas como

*Coriandrum sativum* (Apiaceae) (Davis y Raid, 2002), entre otras. Este patógeno causa severos daños a cultivos en suelo y en condiciones de hidroponía. *Pythium* puede habitar saprofiticamente en los cultivos hidropónicos alimentándose de los exudados de la planta convirtiendo el agua en un medio apropiado para su desarrollo (Herrero et al., 2003). Las condiciones de abundante humedad favorecen la proliferación de las zoosporas características de este organismo y la recirculación del agua en el sistema agrava la situación incrementando la cantidad del inóculo. El inóculo abundante puede alcanzar a infectar a todas las plantas que se encuentran en el cultivo causando severos daños en la raíz y el tallo e incluso su muerte en poco días (Herrero et al., 2003; Jenkins et al., 1983). *Pythium* es altamente agresivo en cultivos hidropónicos donde el sistema radicular de la planta se encuentra expuesto y en contacto directo con el agua. Se ha reportado el 100 % de severidad en cultivos hidropónicos en Carolina del Norte (Jenkins et al., 1983)

La serología basada en la técnica ELISA ha demostrado ser eficiente para la identificación de *Pythium* y otras especies de oomicetos a partir de tejido vegetal y de cultivos puros. La técnica ELISA contiene anticuerpos específicos como los son los monoclonales utilizados en la detección de *Pythium* y *Phytophthora*. Estos reconocen productos metabólicos como los componentes de la pared celular permitiendo la identificación de especies de *Pythium ultimum* y *Pythium sulcatium* (Kabashima et al., 2006; Narayasanami, 2011).

La PCR ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la taxonomía y filogenia de oomicetos como *Pythium* y *Phytophthora* basándose en la amplificación de regiones conservadas del genoma como la región del espaciador intergénico ITS del ADN ribosomal nuclear y el gen II de la enzima citocromo oxidasa (Schroeder et al., 2006). La amplificación de las regiones genómicas conservadas ha logrado discriminar con exactitud a especies relacionadas (Borman et al., 2008; Lévesque et al., 1994) y ha facilitado la identificación de especies asexuales o heterotálicas, así como de especies de *Pythium* no patogénicas y de lento crecimiento en medio de cultivo (Schroeder et al., 2006).

Los cultivos hidropónicos en Puerto Rico son de gran importancia ya que aproximadamente el 50% del cilantrillo (*Coriandrum sativum*) y la lechuga (*Lactuca sativa*) se producen de esta forma (Estévez et al., 2006). El cilantrillo junto con la calabaza, el pimiento y la cebolla son las hortalizas de mayor importancia económica en la Isla. Hasta año fiscal 2008 la producción de cilantrillo alcanzó una producción de 6,027 kg mazos con un valor de \$3.96 cada

uno y generó un ingreso bruto anual de \$ 3.791 millones. Recientemente dos proyectos para la producción de cilantrillo en la isla generaron \$548,080 (Oficina de Estadísticas Agrícolas, San Juan, Puerto Rico, 2011). El proyecto ubicado en el municipio de Guánica generó \$409,170 y otro proyecto privado ubicado al sur de la Isla generó \$138,910. La presencia de *Pythium* sp. afectando cultivos hidropónicos de cilantrillo y lechuga en Puerto Rico ha causado pérdidas entre el 25% y 45% respectivamente, en los municipios de Lares, Coamo y Castañer (Estévez et al., 2006).

La severidad de la pudrición de la raíz causada por *Pythium* y las pérdidas económicas producidas en varias especies de vegetales, hortalizas y flores cultivadas en condiciones de invernadero e hidroponía, hacen necesario el diagnóstico temprano del patógeno (Favrin et al., 1988; Sutton et al., 2006; Vincelli y Lorbeer, 1990). Las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad han demostrado ser eficientes en la identificación de microorganismos fitopatógenos. Estas técnicas evitan errores que pudieran generarse con los métodos convencionales de identificación, que requieren de conocimientos y experiencia en taxonomía, y que limitan la identificación a nivel de especie por la ausencia de estructuras que faciliten la diferenciación entre especies (Lévesque y De Cock, 2004). La reacción en cadena de la polimerasa, mediante la amplificación de la región ITS, permite la identificación de especies de *Pythium* como *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. dissotocum* Drechsler, *P. ultimum* Trow var. *ultimum*, *P. coloratum* Vaartaja y miembros del grupo F, agentes causales de la pudrición de la raíz en espinaca, pepino, tomate, pimiento, lechuga, rúcula, cilantrillo, cebolla y rosas (Favrin et al., 1988; Sutton et al., 2006; Vincelli y Tisserat, 2008; Vincelli y Lorbeer, 1990).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de las muestras**

Se colectaron muestras de cilantrillo (*Coriandrum sativum*) en una finca en el municipio de Adjuntas ubicada en la Latitud N 18° 11' 40,96", Longitud W 66°, 49' 49,92" y a una elevación de 1500 ft. Las muestras fueron ingresadas a la clínica de diagnóstico con los números 1271 y 1272. Las plantas colectadas presentaron síntomas de marchitez, follaje clorótico, lesiones de color marrón en la raíz y la base del tallo y retraso en el crecimiento.

Se realizaron aislamientos a partir de tejido vegetal enfermo en medio de cultivo papa dextrosa agar acidulado: 20 g/L (Difco) y 10 ml/L ácido láctico enmendado con antibióticos como rifampicin (Fisher BioReagents Fair Lawn, New Jersey 07410) y suspensión acuosa de pimaricin al 2.5 % (MP Biomedicals, LLC 29525 Fountain PKwy, Solon, Ohio 44139) (Anexo 3.1) y en medio de agar agua utilizando los mismos antibióticos (Anexo 3.2) (Martin, 1992a). Para la purificación se utilizó medio selectivo V8 con los siguientes antibióticos: pimaricina (10 mg/l), vancomicina (200 mg/l) y fungicida como pentanitroclorobenceno (PCNB) (100 mg) (Martin, 1992a). (Anexo 3.3). El tejido enfermo se cortó en secciones de 1 a 2 mm y se desinfectó colocando 1 minuto en hipoclorito de sodio (solución comercial) al 50% y dos lavados en agua estéril. Los platos se incubaron por 3 días y se obtuvieron aislados puros desde punta de hifa tomando un disco de agar de 5 mm de diámetro de la porción de micelio más joven del cultivo.

### **Identificación Morfológica**

Para realizar la identificación morfológica de los aislados 1271 y 1272 se cultivó el oomiceto en medios de cultivos: PDA (Anexo 3.1) y V8 (Anexo 3.3). Una vez que se obtuvo abundante micelio se procedió a preparar una laminilla utilizando 1 gota de solución de lactofenol con azul de algodón (0.05%) y una porción del micelio. Utilizando el microscopio (Olympus modelo Cx31, Olympus America Inc., Center Valley, PA) se tomaron medidas del ancho de la hifa, el diámetro de las oogonias y esporangias. Las estructuras se fotografiaron con una cámara digital (Olympus DP 20, a 40X). Se utilizó también microscopía bajo la óptica de Nomarski u óptica de contraste interdifereencial (DIC) y de contraste de fase (100X). La medida de cada una de las estructuras se obtuvo en base al promedio de las mediciones de 20 repeticiones de cada una.

### **Identificación Serológica**

Se utilizó una prueba serológica de ELISA específica para *Pythium ultimum* (Agdia®, Indiana, USA). Se preparó el anticuerpo de captura mediante una dilución con buffer de carbonato para recubrimiento (“carbonate coating buffer”). Se colocaron 100 µl del anticuerpo de captura concentrado por cada 10 ml de la solución del buffer carbonato (1X) para recubrimiento. Se colocaron 100 µl del preparado conteniendo el anticuerpo de captura en casa fosa, se incubó

la placa en cámara húmeda por 4 horas a temperatura ambiente o durante la noche en una nevera a 4°C. Luego de la incubación, la placa ELISA se lavó con buffer PBST 1 por tres veces consecutivas.

El tejido vegetal fue macerado en bolsas de malla con 1 ml de buffer GEB (General Extraction Buffer). Para muestras provenientes de micelio de un cultivo puro del oomiceto se colocó 1 ml del buffer GEB en un tubo eppendorf de 1.5 o 2.0 ml con esferas de vidrio y se maceró (1247W CELL DIS - BioSpec Mini Bead Beater) por 5 minutos. Se colocaron 100 µl de la solución del buffer GEB con las muestras en cada fosa de la placa ELISA incluyendo el control positivo (Agdia®, Indiana, USA) y el control negativo (buffer GEB). Se incubó durante dos horas en cámara húmeda a temperatura ambiente o durante la noche en la nevera a 4°C.

El conjugado enzimático se preparó con una dilución en buffer ECL 1X (*Enhanced Chemiluminescence Buffer*). En 10 ml de buffer ECL se colocaron 100 µl de la solución A y 100 µl de la solución B. Luego de la incubación se realizó el lavado con buffer PBST 1X por 7 veces consecutivas, se eliminó el exceso de agua de la placa ELISA y se colocaron 100 µl de la solución del conjugado enzimático. Se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente.

Luego de la incubación se lavó con buffer PBST por 8 veces, se liberó el exceso de agua y se colocaron 100 µl del sustrato PNP. Se incubó la cámara húmeda por 60 minutos protegiéndola de la exposición a la luz directa. La lectura de la placa ELISA se realizó en el lector ELISA (Biotek ELX 808, Agdia, USA). En base a la medición de la densidad óptica de cada muestra en comparación con los controles (positivo y negativo) se determinaron los resultados positivos.

La confirmación de los resultados obtenidos con la prueba serológica se realizó mediante la identificación molecular con PCR convencional. Se utilizaron los cebadores K1 5'-ACGAAGGTTGGTCTGTTG-3' y K3 5'-TCTCTACGCAACTAAATGC-3', específicos para *Pythium ultimum*. La combinación de estos cebadores generó una banda de ADN de 670 bp. La amplificación del material genético se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos con una extensión final durante 10 minutos a 72°C (Kageyama et al., 1997).

## **Identificación Molecular**

### **Extracción de DNA y PCR**

Para la extracción de ADN se utilizó el DNeasy PLant Mini Kit de Quiagen (Quiagen, California, USA,) de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (Mini Protocol) (Quiagen group, 2006). Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los cebadores: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Integrated ADN Technologies, Coralville, IA). Para realizar la PCR tradicional se utilizaron 12.5 µl el master mix Go Green Tag, 2.50 µl del primer ITS 1, 2.50 µl del primer ITS 4 y 2.50 µl de agua molecular por cada muestra. Se utilizó un volumen total de reacción de 25 µl, conteniendo: 20 µl de mezcla del master mix Go Green Tag y 5 µl del ADN de cada una de las muestras. El control negativo estuvo constituido por agua molecular y el positivo por un aislado de *Pythium* sp. obtenido e identificado anteriormente de cilantrillo. La reacción de PCR consistió de un ciclo inicial de 94°C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por 6 minutos (Vega, 2009). El producto de PCR se almacenó a una temperatura de -20 °C.

### **PCR de Alta Fidelidad**

Se utilizaron tres buffers: Buffer Mix, Enzyme Mix y Template Mix que fueron preparados de la siguiente manera:

**Buffer Mix:** Se añadió 1.75 µl de dNTP, 8 µl de los iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

**Enzyme Mix:** Se añadió 1 µl de Taq y 0.2 µl de Accuzyme (Accuzyme, Cat. No. BIO-21051, BIO-21052, Bioline USA Inc).

**Template Mix:** Se añadió 5 µl de PCR buffer (Acuzyme), 1 µl de Enzyme Mix, 12.25 µl de agua destilada desionizada.

La reacción final contuvo 29.75 µl de Buffer Mix, 18.25 µl de Template Mix, 2 µl de ADN, un total de 50 µl.

Los ciclos y los tiempos de amplificación para el PCR de Alta Fidelidad fueron los siguientes: temperatura inicial 94°C, desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido de 10

ciclos de: 94°C 10 segundos (desnaturalización), 56°C 30 segundos, 68°C un minuto y 25 ciclos de 94°C 10 segundos (desnaturalización), 56 °C 30 segundos, 68° C un minuto (hibridación) y finalmente una pausa a 4°C (Hoy et al., 2001; Jeyaprakash and Hoy, 2000).

Los productos obtenidos de la extracción del ADN, de la amplificación del PCR convencional y de Alta Fidelidad fueron visualizados en un gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 1%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St.Louis, USA). Se realizó una electroforesis a 100 V, 400 amperios por 30 minutos, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó una cámara visualizadora de rayos ultravioleta y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con una marcador molecular de de 1 Kb (Sigma, St. Louis, USA).

### **Purificación del producto de PCR para la secuenciación**

La purificación del producto del PCR se realizó utilizando el Kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit Protocol de QIAGEN (Qiagen, California, USA). Se añadieron 5 volúmenes del buffer PB por cada volumen del producto de PCR y luego de homogenizar con un vórtex, se colocó la mezcla en un tubo QIAquick (spin column) y se centrifugó por 60 segundos a 13,000 rpm, se descartó el filtrado y se conservó el tubo colector y el filtro. Se añadieron 750 µl del buffer PE en la columna QIAquick y se centrifugó por 60 segundos a 13,000 rpm. Se descartó el filtrado y se conservó la columna y el tubo colector, se centrifugó la columna por 1 minuto adicional. Se colocó el filtro de la columna QIAquick en un nuevo tubo de 1.5 ml, se añadieron 30 µl de buffer EB en el centro de la columna, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm, posteriormente se almacenó el filtrado que constituye el ADN purificado.

### **Análisis de la secuencia ITS del ADN ribosomal**

La secuenciación se realizó en MacroGen, Inc. en Rockville, USA. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.1.3. Posteriormente, las secuencias alineadas se compararon con otras especies en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (para la sigla en inglés NCBI, GenBank)

utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search (Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Conservación de los aislados**

Los aislados 1271 y 1272 cultivados en PDA con antibióticos (Anexo 3.1) purificados y libres de bacterias fueron conservados en medio de cultivo agar agua (Anexo 3.2) y PDA con antibióticos (Anexo 3.1). Además, fueron conservados también en agua, suelo y millo (*Pennisetum glaucum*) acorde a los procedimientos recomendados por Martin (1992b). Para la conservación *Pythium* sp. en medio de cultivo Agar agua y PDA con antibióticos, se colocaron dos discos del oomiceto de aproximadamente 5 mm de diámetro en el radio central de la placa petri con una distancia de 1 cm entre ellos. Se sellaron las placas petri y fueron mantenidas en refrigeración a 4°C. Se almacenaron cuatro cultivos en medio PDA y cuatro en Agar agua.

Para la conservación de *Pythium* sp. en agua se utilizaron 15 ml de agua destilada estéril contenidos en tubos de vidrio y se colocaron 10 discos de micelio. Se taparon, se sellaron con parafilm y se almacenaron (dos tubos por cada aislado) en oscuridad y a temperatura ambiente de  $\pm 22^{\circ}\text{C}$ . Además, se colocaron cuatro discos de micelio de *Pythium* sp. en 15 gr de suelo estéril. Los tubos fueron sellados con parafilm. Se almacenaron dos tubos por cada aislado y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente  $18^{\circ}\text{C}$ . Para la conservación de *Pythium* sp. Para la conservación en millo (Pearl millet) se esterilizó la semilla durante una 1 hora a  $121^{\circ}\text{C}$  por dos días consecutivos, una vez cada día, y por 15 minutos adicionales antes de usarlo (El-Tarabily et al., 2003). En 10 gr de millo hidratado y estéril se colocaron cuatro discos de micelio. Se incubó el cultivo a temperatura ambiente de  $18^{\circ}\text{C}$  por 7 días, una vez que se obtuvo crecimiento de *Pythium* sp., los tubos fueron sellados con parafilm. Se almacenaron dos tubos por cada aislado en iguales condiciones que aquellos conservados en suelo.

### **Pruebas de Patogenicidad realizadas con *Pythium* sp.**

Se realizaron cuatro ensayos de patogenicidad, dos en cilantrillo, *Coriandrum sativum* cv. “Lonestar” y dos en arveja, *Pisum sativum* cv. “Sugar Baby”. Se utilizaron semillas de arveja y plántulas pre-germinadas de cilantrillo. Las semillas de cilantrillo y arveja fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2.5 % por tres minutos y luego enjuagadas con agua estéril. El inóculo se obtuvo a partir de un aislado puro de *Pythium dissotocum* crecido en medio de cultivo

PDA acidulado: 20 g/L (Difco) y 10 ml/L ácido láctico y los antibióticos: rifampicin y solución de pimaricin al 2.5 % (Anexo 3.1). El inóculo fue multiplicado en millo esterilizado durante una hora a 121°C por dos días (El-Tarabily et al., 2003).

Para la multiplicación del inóculo en millo (Pearl millet) se transfirieron tres discos de *Pythium dissotocum* y se incubaron a temperatura ambiente y en obscuridad por 10 días. En un recipiente plástico previamente desinfectado con alcohol etílico al 70%, se mezclaron 20 gr del inóculo y 50 gr de PROMIX BX ® (Premier Tech Horticulture, Québec, Canadá) hasta obtener una mezcla homogénea. Esta mezcla se colocó en el tiesto de capacidad de 907 gr conteniendo PROMIX y se distribuyó uniformemente en la porción cercana al área de siembra. Se depositó una semilla de arveja y una plántula de cilantrillo en cada tiesto.

En los ensayos de patogenicidad con cilantrillo y arveja se determinó la severidad de la infección en base al porcentaje de necrosis presente en la raíz y en la base del tallo utilizando la escala 1-9 donde: 1 = raíz sana, 0% de necrosis en la raíz, 3 = 10% de necrosis, 5 = 25% de necrosis, 7 = 50% de necrosis y 9 = mayor al 50% de necrosis y marchitez del tejido foliar (Altier 1995; Vallad et al., 2003). Se realizaron aislados de la raíz en medio de cultivo PDA con antibióticos.

Se realizó una prueba DAS ELISA específica para *Pythium ultimum*. Para la identificación molecular se utilizó ADN extraído utilizando el Kit REDExtract (Quiagen) a una concentración de 20 ng. Se realizó la PCR convencional y de Alta Fidelidad según los protocolos antes mencionados, directamente a partir del tejido vegetal tanto de las plantas control como de las plantas inoculadas. Se compararon los resultados obtenidos en la identificación de *Pythium* sp. en base a la presencia de bandas de ADN. El PCR de Alta Fidelidad se utilizó para la identificación de *P. dissotocum* en los resultados falsos negativos obtenidos con PCR convencional. De las pruebas realizadas en el experimento se determinó en porcentaje las determinaciones positivas y negativas para las plantas inoculadas con las dos técnicas.

### **Análisis estadístico**

Los resultados de severidad obtenidos de las pruebas de patogenicidad se analizaron estadísticamente por medio del programa Infostat versión estudiantil (InfoStat, 2005), donde se realizó un análisis de variancia (ANOVA) utilizando la prueba estadística de Tukey. Las medias fueron comparadas con un nivel de significación del 0.05.

**Comparación del PCR convencional y de Alta Fidelidad en la detección de *Pythium dissotocum* a partir de ocho diluciones seriadas de ADN.**

Se obtuvo un aislado puro de *Pythium dissotocum* proveniente de la muestra 1271 cultivado en medio PDA con antibióticos y se realizaron diluciones en escala logarítmica. Las diluciones se efectuaron luego de determinar la concentración de DNA de la muestra  $10^0$ . Se colocó 1 ul de la muestra  $10^0$  en 9  $\mu$ l de agua molecular libre para PCR. A partir de la muestra  $10^0$  se realizaron 8 diluciones subsiguientes:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  hasta obtener la concentración de 1 ng. La concentración de DNA se determinó por densidad óptica utilizando un lector de absorbancia Eppendorf BioPhotometer plus (Eppendorf Hamburg 22331 Germany). Las diferentes diluciones (Tabla 4.1) se analizaron con PCR convencional y de Alta Fidelidad y se compararon los resultados obtenidos con ambas técnicas.

**Tabla 4.1. Diluciones de ADN utilizadas en la comparación del PCR convencional y de Alta Fidelidad para la detección de *Pythium dissotocum***

Aislado	Diluciones	Absorbancia ng/ $\mu$ l	
		Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1271	$10^0$	117	146
1271	$10^{-1}$	125	121
1271	$10^{-2}$	102	89
1271	$10^{-3}$	88	84
1271	$10^{-4}$	69	65
1271	$10^{-5}$	48	44
1271	$10^{-6}$	91	24
1271	$10^{-7}$	12	5
1271	$10^{-8}$	6	3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Obtención de las muestras y sintomatología**

En las muestras de cilantrillo colectadas en el municipio de Adjuntas se observaron síntomas de marchitez, lesiones necróticas en el sistema radicular y en la base de tallo, pudrición de la raíz y sancocho. Estos síntomas concuerdan con los reportados para varias especies de *Pythium* causantes de sancocho y pudrición de la raíz de plántulas de vegetales (Herrero et al., 2003). Entre estas especies están *P. ultimum* y *P. aphanidermatum* afectando cultivos hidropónicos de vegetales (Herrero et al., 2003) así como *Pythium irregulare* y *Pythium dissotocum* causando pudrición de la raíz en cebolla (Vincelli y Lorbeer, 1990). De las muestras de cilantrillo afectadas se obtuvieron dos aislados de *Pythium* identificados como 1271 y 1272. Los aislados fueron cultivados en medio de cultivo PDA y V8 con antibióticos.

### **Identificación morfológica**

Después de 7 días de incubación a  $\pm 22^{\circ}\text{C}$  en PDA y V8, en los aislados 1271 y 1272 se observó abundante micelio, de color blanco cremoso y consistencia algodonosa (Figura 4.1) con hifas hialinas de  $10.12\ \mu\text{m}$  de ancho (Apéndice 3.4 y figuras 4.1 y 4.4). Se observaron esporangios filamentosos y terminales, formando estructuras dendroides (Tabla 4.2 y Figura 4.4) en ambos aislados cultivados en medio V8. Las oogonias fueron subglobosas y terminales con un diámetro promedio de  $20.55\ \mu\text{m}$ , conteniendo una única oospora aplerótica de  $17.18\ \mu\text{m}$  de diámetro (Tabla y Figura 4.2). Las oosporas germinadas poseen un tubo germinativo y un diámetro promedio de  $21.51\ \mu\text{m}$  (Tabla 4.2 y Figura 4.3). El anteridio monoclinio y sésil rodea al oogonio y se origina del pie debajo de la oogonia (Figura 4.2).



Figura 4.1. Micelio de *Pythium dissotocum* en medio de cultivo PDA con rifampicin y pimaricin 2.5 %. A.) aislado 1271 y B.) aislado 1272.

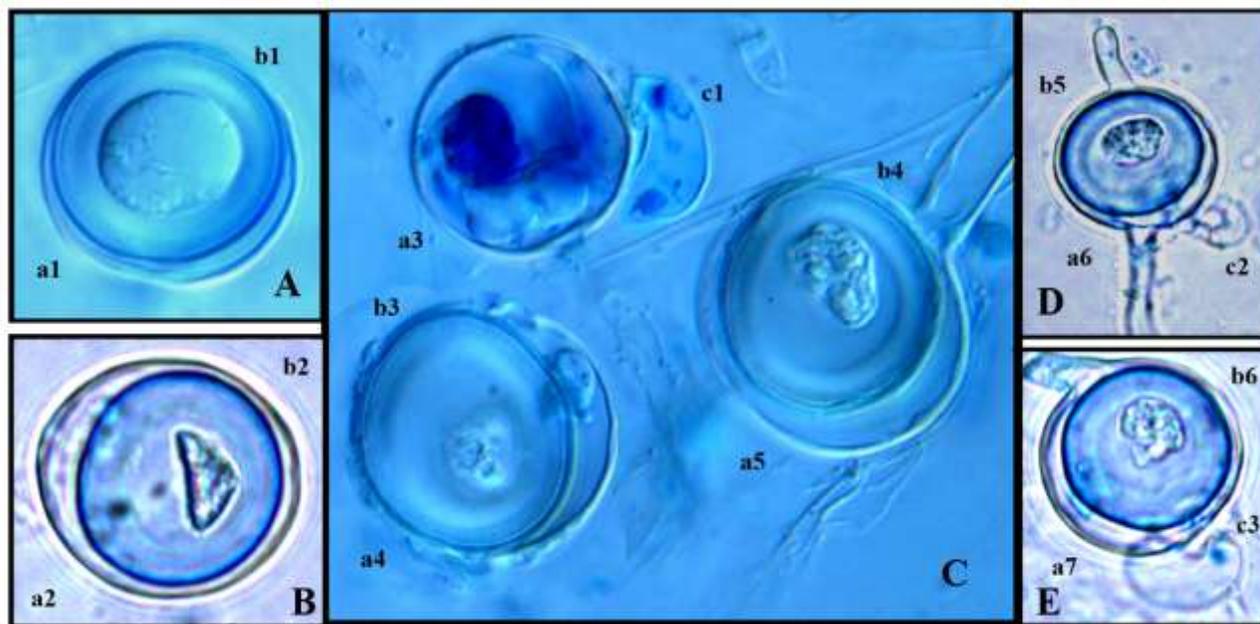


Figura 4.2. *Pythium dissotocum* a1-7. Oogonia terminal y subglobosa (20.55  $\mu\text{m}$ ), b2-6 Oopora globosa y aplerótica (17.18  $\mu\text{m}$ ), c1-3 anteridios monoclinos y sésiles (100x). A y C. Nomarski. B, D y E. Contraste interdiferencial (DIC).

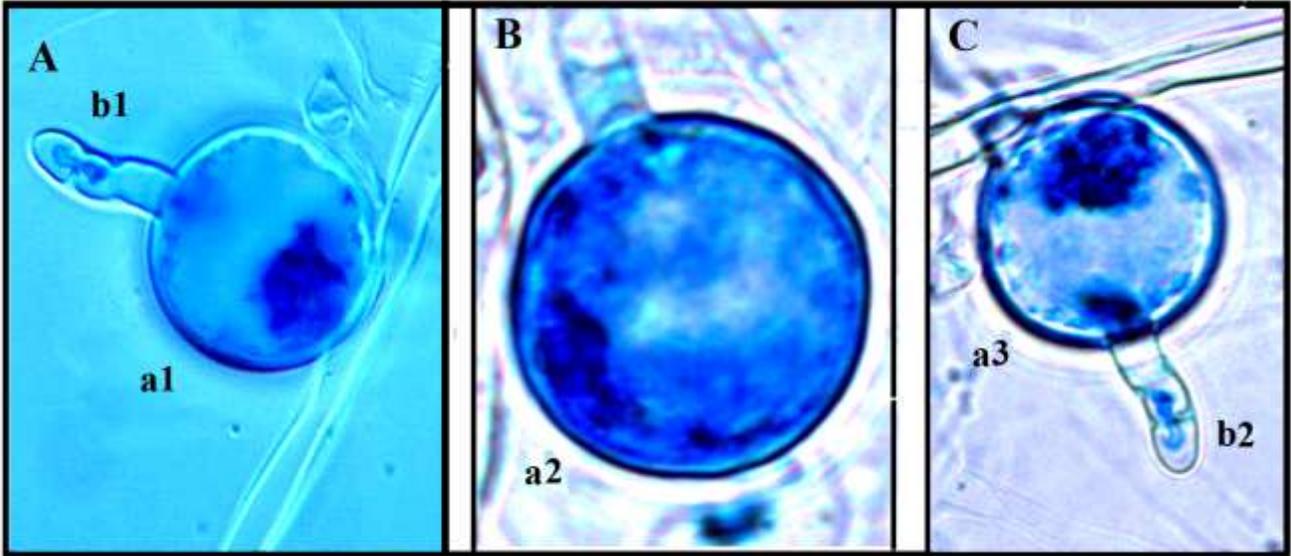


Figura 4.3. *Pythium dissotocum* a1-3 oospora germinada (21.51  $\mu\text{m}$ ). b1-2 tubo germinativo (100x). A. Nomarski. B y C. Contraste interdiferencial (DIC).

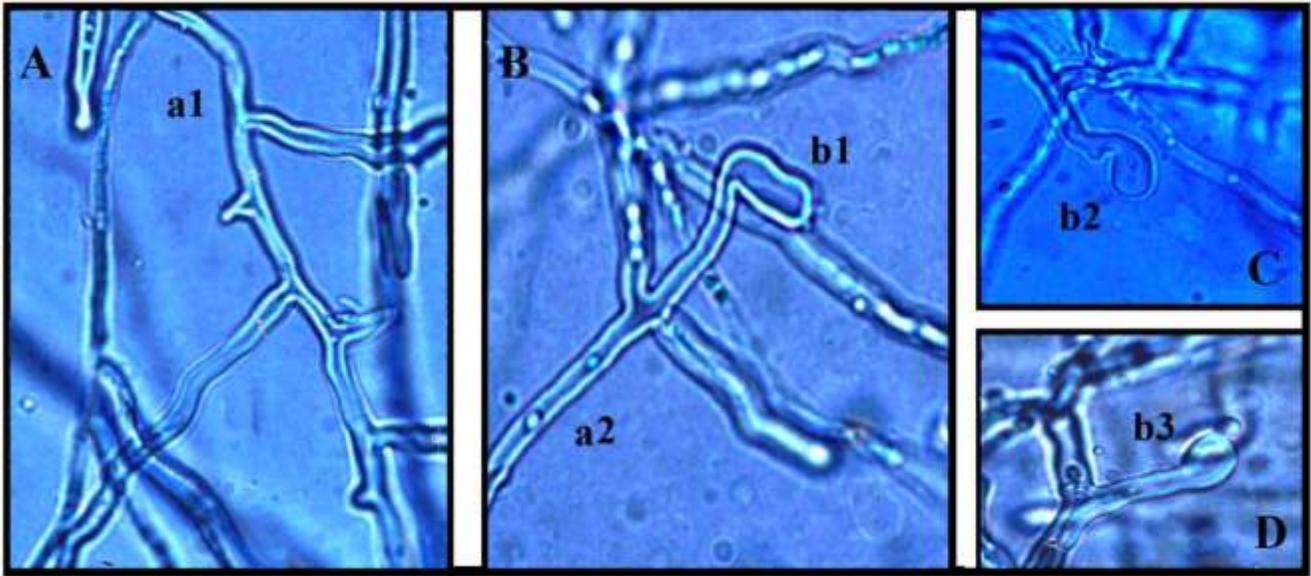


Figura 4.4. *Pythium dissotocum* a1-2 hifa (10.12  $\mu\text{m}$ ). b1-3 esporangia filamentosa con forma dendroide (100X). A, B y D. Contraste interdiferencial (DIC) y C. Nomarski.

Las características morfológicas identificadas en los aislados 1271 y 1272 concuerdan con las características morfológicas reportadas por Van Der Plaats-Niterink (1981) y Bala et al. (2010) para la especie *Pythium dissotocum*.

### **Identificación serológica**

Al realizar la prueba DAS ELISA específica para *P. ultimum* se obtuvieron resultados negativos en los aislados 1271 y 1271. Se comprobó que ambos aislados no corresponden a la especie *P. ultimum*. Se analizaron serológicamente 14 muestras que consistieron de dos controles positivos para *P. ultimum*, dos controles negativos, cinco repeticiones de ambos aislados (1271 y 1272). Los resultados obtenidos en 10 repeticiones, cinco de cada uno de los aislados fueron negativos. La densidad óptica obtenida en los aislados de *Pythium* muestra resultados negativos para la especie *P. ultimum*. El aislado 1271 presentó una densidad óptica promedio de 1.19 nm y el aislado 1272 presentó una densidad óptica promedio de 1.24 nm.

**Tabla 4.2. Prueba ELISA para la identificación de *Pythium* sp. en los aislados 1271 y 1272.**

<b>Plantas de tomate inoculadas</b>		<b>Absorbancia (nm)</b>
<b>CONTROLES</b>		
<b>Replicas</b>		
1	Positivo	3
2	Positivo	3
1	Negativo	1.21
2	Negativo	1.05
<b> AISLADOS</b>		
<b>Replicas</b>	<b>1271</b>	<b>1272</b>
1	0.98	1.03
2	1.12	1.29
3	0.91	1.36
4	1.46	1.41
5	1.46	1.12
<b>Promedio</b>	1.19	1.24

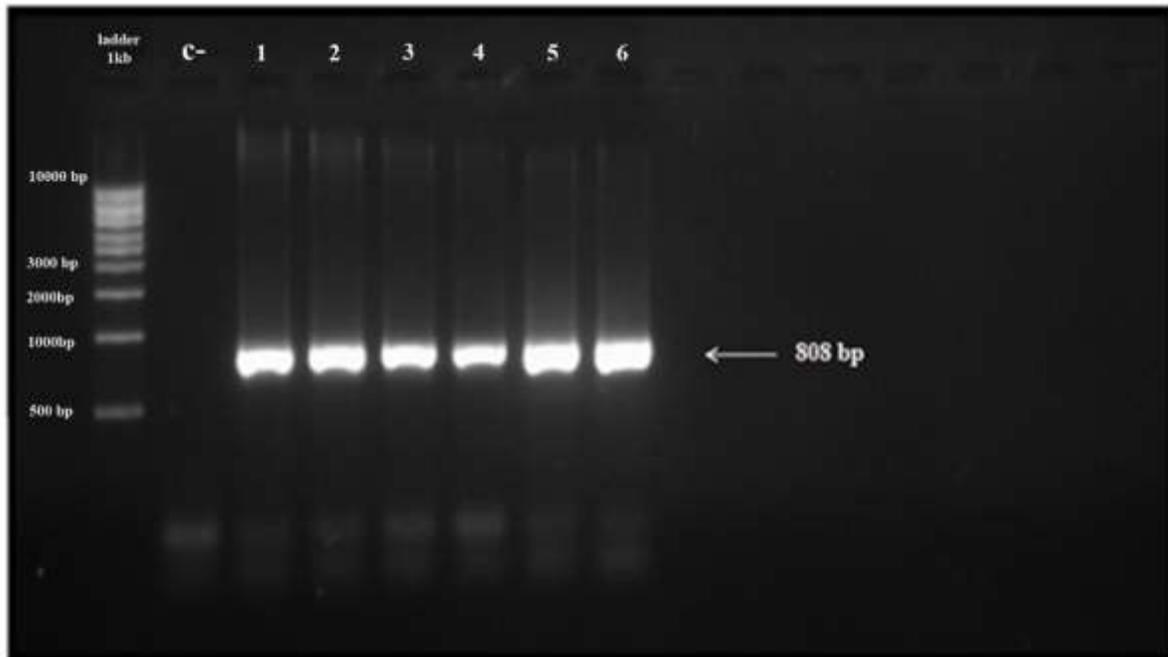
Los resultados negativos de la prueba ELISA fueron confirmados molecularmente mediante PCR convencional utilizando los cebadores específicos para *P. ultimum* K1 y K3. En ninguna de las 10 muestras analizadas se amplificó la banda de ADN de 670 bp correspondiente al material genético de *P. ultimum*. La combinación de los cebadores K1 y K3 ha demostrado tener alta especificidad en la identificación de *P. ultimum* a partir de plántulas enfermas (Kageyama et al., 1997).

La prueba ELISA específica para *P. ultimum* también fue utilizada en las pruebas de patogenicidad. La técnica DAS ELISA permite la detección e identificación rápida de varias especies del género *Pythium* (Agdia, 2008; Ali-Shtayeh et al., 1991). La prueba DAS ELISA específica para *P. ultimum* no genera reacción cruzada con otras especies de *Pythium* correspondientes al serotipo I: *mamillatum*, *multisporum*, *myriotylum*, *oligandrum*, *paroecandrum*, *spinosum*, *splendons*, *sylvaticum*, *tardicrescens*, *torulosum*, *vanderpoolii*, *violae*. Tampoco produce reacción cruzada con *Phytophthora capsici*, *citrophthora*, *infestans*, *parasítica* y *sojae* (Agdia, 2008).

A pesar de la sensibilidad de esta técnica no posee un nivel de especificidad suficiente para identificar certeramente a *Pythium* a nivel de especie generando reacción cruzada. La prueba DAS ELISA específica para *P. ultimum* presenta reacción cruzada con *P. intermedium*, *P. irregulare* (serogrupo II) y *P. sylvaticum* (Agdia, 2008). Incluso, esta a técnica puede ser incapaz de detectar especies como *P. coloratum* y *P. rostratum* (Ali-Shtayeh et al., 1991). En esta investigación la prueba de DAS ELISA específica para *P. ultimum* no presentó reacción cruzada con *P. dissotocum*.

### **Identificación molecular**

Se realizó la identificación molecular de los dos aislados que presentaron características morfológicas correspondientes a *P. dissotocum* y que mediante serología fueron positivas para el género *P. ultimum*. En los aislados provenientes de las muestras 1271 y 1272 se obtuvo una banda de ADN con 808 bp producto de la amplificación con los cebadores específicos ITS-1 (sentido) y ITS-4 (anti sentido) (Figura 4.5) correspondiente con el peso molecular obtenido de la secuencia parcial del genoma de *P. dissotocum* disponibles en el BLAST.



**Figura 4.5. Gel de agarosa para la determinación de *Pythium dissotocum* utilizando los cebadores ITS-1 y ITS-4. Ladder (1 Kb), control negativo C - , pocillos 1, 2 y 3: Aislado 1271 y pocillos 4, 5 y 6: Aislado 1272. La flecha indica los productos de amplificación del PCR en 280 bp.**

La falta de suficientes estructuras y caracteres morfológicos distintivos en el género *Pythium* (Bala et al., 2010), la ausencia de secuencias *consensus* para las características morfológicas conservadas, la alta variabilidad en estructuras utilizadas en su diagnóstico y la superposición entre especies, son algunos de los factores directamente relacionados con los errores de la identificación morfológica (Lévesque y De Cock, 2004). Las deficiencias de la identificación morfológica se relacionan también con errores de apreciación visual que afectan la precisión de la identificación y que pueden producirse cuando el identificador no posee experiencia de varios años trabajando con el género (Lévesque y De Cock, 2004).

Estas deficiencias han sido superadas con la identificación molecular basada PCR utilizando cebadores universales. La técnica de PCR ha permitido identificar con exactitud y eficiencia al género *Pythium* en base a la amplificación de la región del espaciador intergénico

ITS. Esta región del rADN es la más utilizada en el estudio de la filogenia de las especies dentro del género *Pythium* (Lévesque y De Cock, 2004; Robideau et al., 2011).

En esta investigación la amplificación de la región ITS con el uso de los cebadores específicos ITS1 e ITS4 permitió la identificación de *P. dissotocum* en los aislados 1271 y 1271 provenientes del municipio de Adjuntas. La identificación molecular permitió corroborar la identificación morfológica realizada previamente. La región ITS es altamente conservada dentro de las especies del género *Pythium*, específicamente la región ITS1 posee secuencias idénticas de adenina-guanina y la región ITS 2 regiones idénticas de guanina-timina (Belbahri et al., 2008). Esta sinonimia taxonómica de las regiones ITS ha permitido la identificación al nivel de especies, subespecies y cepas dentro del género *Pythium* (Lévesque et al. 2010; Belbahri et al., 2008).

A pesar de la utilidad taxonómica y genética del espaciador intergénico ITS pueden presentarse ciertas deficiencias relacionadas con la aparente pérdida de funcionalidad de las regiones no transcritas del rDNA y la numerosa cantidad de inserciones y deleciones que impiden la secuenciación completa de secuencias a partir de la región ITS. Debido a estas limitaciones, la identificación molecular puede complementarse con el uso de otras secuencias como aquellas la COI y COX1 codificadas por genes mitocondriales y que han demostrado ser exitosas en la identificación de especies en un amplio rango de formas de vida eucariotas (Robideau et al., 2011).

### **Secuenciación de la región del espaciador intergénico ITS**

Las secuencias de la región del espaciador intergénico ITS del ADN ribosomal de los dos aislados identificados como *P. dissotocum* fueron comparadas con las secuencias depositadas en el Gen Bank, a través del BLAST. Los aislados de *P. dissotocum* mostraron un porcentaje de homología del 99% con las secuencias de *P. dissotocum* con números de acceso al banco de genes (Gen Bank): BR323, HQ643501.1 y HQ643503.1 (Gen Bank) correspondientes a la secuencia parcial de la región 18S del gen del RNA ribosomal, la secuencia del espaciador intergénico transcrito 1 y 2, la región 5.8 S del gen de RNA ribosomal, y la secuencia parcial de la región 25 S del gen de RNA ribosomal. El número de bases no homologas que se encontraron fue bajo, entre 0 y 3%. Los resultados obtenidos de la secuenciación confirmaron la presencia de *Pythium dissotocum* en los aislados 1271 y 1272 (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Identificación molecular de aislados de *Pythium dissotocum* de cilantrillo, utilizando la secuenciación de la región ITS del rADN y el programa BLAST**

Aislado	Identificación en BLAST	% Homología	% Cobertura	Número de bases Idénticas	Número de bases diferentes
1271 - ITS1	<i>Pythium dissotocum</i>	99%	97%	786/788	0/788
1271- ITS4	<i>Pythium dissotocum</i>	99%	97%	791/793	1/793
1272 - ITS1	<i>Pythium dissotocum</i>	99%	97%	802/806	3/806
1272 - ITS4	<i>Pythium dissotocum</i>	99%	97%	793/797	3/797

La región del espaciador intergénico ITS del ADN ribosomal constituye una potencial fuente de variación genética entre organismos cercanamente relacionados. Ha sido ampliamente usada en la identificación molecular y en el establecimiento de la taxonomía y filogenia de las especies miembros del género *Pythium* (Belbahri et al., 2008; Lévesque et al., 2010). La región ITS ha permitido la identificación de especies nuevas y el establecimiento de las diferencias existentes entre aislados de una misma especie mediante el reconocimiento de las homologías basadas en la similitud, heterogeneidad y polimorfismo de las secuencias genéticas (Belbahri et al., 2008; Lévesque et al., 2010).

En esta investigación la secuenciación de la región ITS permitió establecer la homología del 99% de los aislados 1271 y 1272 con la especie *P. dissotocum*. Las secuencias obtenidas de los dos aislados fueron homólogas a las secuencias con número de acceso al banco de genes (gen Bank): BR323, HQ643501.1 y HQ643503.1 de *P. dissotocum* disponibles en la base de datos del Gen Bank. Gran parte de la información genética de la secuenciación de la región ITS de un sinnúmero de especies del género *Pythium* esta disponible Gen Bank y puede ser utilizada para establecer identidad y filogenia en nuevas secuencias (Belbahri et al., 2008; Lévesque et al., 2010). La Sociedad Americana de Fitopatología ha identificado a *Pythium* como un patógeno

prioritario de estudio en la patología de plantas. El secuenciamiento de su genoma y la identificación de nuevas especies representativas es de gran importancia (Lévesque et al., 2010).

## **PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CON *Pythium sp.***

### **Sintomatología**

En las pruebas de patogenicidad se inocularon plantas de cilantrillo y arveja con un aislado de *P. dissotocum* proveniente de las muestras 1271. En las plantas de arveja, después de 15 días de la inoculación, se observaron síntomas de marchitez, sancocho y lesiones necróticas en el sistema radicular y en la base de tallo. En las plantas de cilantrillo se observaron síntomas similares después de 21 días de la inoculación. Estos síntomas en cilantrillo y arveja fueron similares a los síntomas observados inicialmente en las muestras 1271 y 1271 provenientes de Adjuntas. Los síntomas de necrosis se manifestaron desde el nivel de severidad: 1 = raíz sana, 0% de necrosis en la raíz hasta 9 = mayor al 50% de necrosis y marchitez del tejido foliar (Tabla 4.4 y 4.5, figuras 4.6 y 4.7) (Altier 1995; Vallad et al., 2003).

**Tabla 4.4. Promedios de la severidad en plantas de arveja inoculadas con el aislado 1271 de *Pythium dissotocum*.**

<b>Tratamiento</b>	<b>No. de plantas</b>	<b>Medias</b>	
		<b>Primer Ensayo</b>	<b>Segundo Ensayo</b>
Control	4	1 A <sup>1</sup>	1 A <sup>1</sup>
1271 ( <i>P. dissotocum</i> )	10	6.20 B <sup>1</sup>	5.60 B <sup>1</sup>
<b>DMS %</b>		39.49	2.01

<sup>1</sup> Prueba de Tukey. Diferencias significativas entre los tratamientos: control vs. Inóculo (*Pythium dissotocum*)

**Tabla 4.5. Promedios de la severidad en plantas de cilantrillo inoculadas con el aislado 1271 de *Pythium dissotocum*.**

Tratamiento	No. de plantas	Medias	
		Primer Ensayo	Segundo Ensayo
Control	4	1 A <sup>1</sup>	1 A <sup>1</sup>
1271 ( <i>P. dissotocum</i> )	10	5.8 B <sup>1</sup>	5.4 B <sup>1</sup>
<b>DMS %</b>		2.68	2.05

<sup>1</sup> Prueba de Tukey. Diferencias significativas entre los tratamientos: control vs. Inóculo (*Pythium dissotocum*)



**Figuras 4.6. Severidad de la pudrición de la raíz en el 1er y 2do ensayo en arveja (*Pisum sativum*) utilizando la escala 1-9. A: Plantas a1, a2 y a3 con síntomas de marchitez en el tejido foliar en los niveles de severidad 3, 4 y 5 respectivamente. B: Planta b1 con severidad 3 (10% de necrosis), y planta b2 severidad 5 (25% de necrosis), C: Planta c1 severidad 50% de necrosis y planta c2 severidad 9 (mayor al 50% de necrosis y marchitez del tejido foliar).**



**Figuras 4.7. Severidad de la pudrición de la raíz en el 1er y 2do ensayo en cilantrillo (*Coriandrum sativum*) utilizando la escala 1-9. A: Plantas sanas a1 y a2, B: Plantas b1 y b2 severidad 3 ( 10% de necrosis), C: Plantas c1 y c2 severidad 5 (25% de necrosis), D: Plantas d1 y d2 severidad 7 (50% de necrosis) y E: Plantas e1 y e2 severidad 9 ( mayor al 50% de necrosis y marchitez del tejido foliar).**

Varias especies de *Pythium* spp. afectan las plántulas de vegetales destruyendo el sistema radicular y causando incluso la muerte de la totalidad de las plantas de cultivos como el pepino (Gómez -Vázquez et al., 2011) y la cebolla (Vincelli y Lorbeer, 1990). Además, *Pythium* es un limitante en cultivos hidropónicos y semilleros principalmente por el uso de agua de riego reciclada (Ali-Shtayeh et al., 1991). Especies como *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. myriotylum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. sylvaticum*, *P. coloratum* y aislados del grupo de *Pythium* «group G» afectan severamente el sistema radicular de cultivos como el pepino (Gómez -Vázquez et al., 2011). Los síntomas producidos se manifiestan como reducción del crecimiento necrosis en la base del tallo y sancocho. Estas especies han provocado severos daños en ensayos

de inoculación artificial causando los síntomas variados desde severos hasta la muerte de la planta, dependiendo de la especie y sus interacciones con las condiciones ambientales (Gómez - Vázquez et al., 2011).

En esta investigación el aislado 1271 causó severos daños al sistema radicular de las plantas de cilantrillo y arveja inoculadas. La manifestación de estos síntomas confirmó que el aislado identificado como *P. dissotocum* corresponde al agente causal de la pudrición de la raíz inicialmente en las plantas de cilantrillo provenientes del municipio de Adjuntas. La prueba de la separación de las medias estimada por DMS ( $\alpha = 5\%$ ) en los cuatro ensayos de patogenicidad, 2 en arveja y 2 en cilantrillo, mostró diferencias significativas con respecto a los controles. El aislado 1271 de *P. dissotocum* fue patogénico para la arveja y el cilantrillo en los ensayos de patogenicidad realizados.

Después de la inoculación, 21 días en el cilantrillo y 15 días en la arveja, las plantas manifestaron los síntomas característicos de la pudrición de la raíz en los distintos niveles de la escala de severidad (Altier 1995; Vallad et al. 2003). El sancocho causado por *Pythium* se produce cuando oosporas que sobreviven en el suelo germinan en condiciones ambientales propicias y proliferan por los ápices de la raíz y los pelos radicales. Como consecuencia de la infección se producen daños en las paredes celulares manifestándose inicialmente como lesiones necróticas que avanzan progresivamente hasta el deterioro del sistema radicular. El sancocho pre-emergente se produce a nivel del tallo causando pudrición blanda y acuosa (Laemmlen, 2001).

El aislado de *Pythium* utilizado para la inoculación logró infectar el 100% de las plantas de cilantrillo y de arveja (Tabla 4.6). El nivel de severidad 3 en los ensayos de patogenicidad en arveja se presentó en el 20% de las plantas inoculadas y en cilantrillo en el 25%. El nivel de severidad 5 en los ensayos de patogenicidad en arveja y cilantrillo se presentó en el 30% de las plantas inoculadas. El nivel de severidad 7 en los ensayos de patogenicidad realizados en arveja se presentó en el 35% de las plantas inoculadas y en cilantrillo en el 25%. El nivel 9 en el primer ensayo de patogenicidad en arveja se presentó en el 15% de las plantas inoculadas y en cilantrillo en el 20% (Tabla 4.6).

Especies como *P. dissotocum*, *P. aphanidermatum* y *P. ultimum*, se desarrollan óptimamente en invernadero en condiciones de alta humedad y temperaturas que fluctúan entre los 25 a 30° C (Herrero et al., 2003). En agua de riego de cultivos hidropónicos, *Pythium* puede

tolerar temperaturas de hasta 40° C (Narayasanami, 2011). *Pythium* puede crecer abundantemente constituyéndose en una fuente potencial de inóculo cuando habita sustratos enriquecidos como medios que contienen semillas de pepino, cáñamo y millo (Gómez -Vázquez et al., 2011).

**Tabla 4.6. Porcentaje de severidad de la pudrición de la raíz en arveja y cilantrillo.**

Nivel de Severidad	% Severidad	
	Arveja	Cilantrillo
3	20	25
5	30	30
7	35	25
9	15	20
<b>Total</b>	100	100

### **Identificación serológica**

La prueba ELISA específica para *P. ultimum* se realizó con las 40 plantas del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad en cilantrillo y arveja. Se analizaron serológicamente los controles negativos y las 10 plantas inoculadas en cada uno de los ensayos de patogenicidad. Los resultados obtenidos en las 40 plantas: 20 de arveja y 20 de cilantrillo así como en los 16 controles, cuatro por cada ensayo fueron negativos. Los controles del primer y segundo ensayo realizado en arveja presentaron una densidad óptica promedio de 0.95 y 1.10 nm respectivamente (Tabla 4.7). En el primer y segundo ensayo de patogenicidad en cilantrillo los controles presentaron una densidad óptica promedio de 0.61 y 0.77 nm respectivamente (Tabla 4.8).

En el primer ensayo de patogenicidad en arveja la densidad óptica promedio fue de 0.36 nm y en el segundo ensayo fue de 1.21 nm (Tabla 4.7). En el primer ensayo de patogenicidad en cilantrillo la densidad óptica fue de 0.17 nm y en el segundo ensayo fue de 0.34 nm (Tabla 4.8).

**Tabla 4.7. Prueba TAS ELISA específica para *Pythium ultimum* realizada en plantas de arveja del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.**

No. de planta evaluada	Absorbancia (nm)	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
<b>Controles</b>		
Positivos	3	3
Negativo	0.65	0.72
1	0.58	1.12
2	0.67	1.01
3	0.63	0.33
4	0.14	0.41
<b>Promedio</b>	0.95	1.1
<b>Plantas Inoculadas</b>		
1	0.39	0.98
2	0.15	1.12
3	0.29	0.91
4	0.39	1.46
5	0.48	1.46
6	0.37	1.03
7	0.38	1.29
8	0.39	1.36
9	0.2	1.41
10	0.54	1.12
<b>Promedio</b>	0.36	1.21

**Tabla 4.8. Prueba TAS ELISA específica para *Pythium ultimum* realizada en plantas de cilantrillo del primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.**

No. de planta evaluada	Absorbancia (nm)	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
<b>Controles</b>		
Positivos	3	3
Negativo	0.13	0.15
1	0.14	0.25
2	0.13	0.39
3	0.12	0.45
4	0.12	0.392
<b>Promedio</b>	0.61	0.77
<b>Plantas Inoculadas</b>		
1	0.13	0.3
2	0.49	0.28
3	0.13	0.3
4	0.13	0.24
5	0.15	0.47
6	0.12	0.3
7	0.14	0.31
8	0.12	0.36
9	0.12	0.42
10	0.12	0.39
<b>Promedio</b>	0.17	0.34

En el segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad en arveja la absorbancia promedio (1.21 nm) fue mayor comparada con el primer ensayo en arveja y con ambos ensayo de patogenicidad en cilantrillo. Se ha reportado que la arveja más susceptible a la infección de *Pythium* y puede ser que por esta razón la concentración de *Pythium* spp. puede ser mayor. A pesar de que la prueba serológica no resultó ser apropiada debido a que se trataba de la especie *P. dissotocum*.

El Health Inspection Service, Plant Protection y Quarantine (USDA-APHIS-PPQ) fomentan el uso de la técnica ELISA como método de detección pre-eliminar para *Pythium* y *Phytophthora*. Únicamente las muestras con un resultado positivo para esta técnica son corroboradas posteriormente por el re-aislamiento del oomiceto y la identificación molecular con

PCR. El uso de la técnica ELISA en la detección pre eliminar del patógeno reduce el costo y la cantidad de muestras que serán identificadas con las pruebas subsecuentes para el cumplimiento de los postulados de Koch (Kox et al., 2007).

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales PABs o MABs ha logrado mayor eficiencia en la prueba ELISA. Estos anticuerpos establecen la interacción específica ligando-enzima con los antígenos de algunas especies del género *Pythium*, convirtiendo a esta prueba en una alternativa diagnóstica rápida y eficiente (Ali-Shtayeh et al., 1991; Kyuchukova et al., 2006; Narayasanami, 2011). La técnica ELISA a logrado un mayor nivel de detección de *Pythium* a partir de sustratos como material vegetal, hojas y semillas de millo en comparación con la detección directa a partir de cultivos puros (Narayasanami, 2011). Los sustratos proveen las condiciones óptimas para el desarrollo y consecuente incremento del inóculo.

A pesar de la utilidad de la prueba DAS ELISA para la detección de *Pythium* a nivel de género producen reacción cruzada con algunas especies de *Phytophthora* y pueden ser perturbados por la interferencia con otros hongos, oomicetos y extractos (Ali-Shtayeh et al., 1991; Kyuchukova et al., 2006). Las deficiencias que poseen las pruebas serológicas para la identificación de *Pythium* han sido superadas mediante la identificación molecular usando cebadores específicos y pruebas de patogenicidad usando plantas susceptibles. Sin embargo, no existen muchos trabajos en donde se compare los resultados de la técnica ELISA con los obtenidos con la identificación molecular por PCR (Kox et al., 2007).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y de alta fidelidad**

Las concentraciones de ADN obtenidas de las dos secciones de cada plántula del experimento fue medida en nanogramos (ng/ml) (Tablas 4.9 y 4.10) y la concentración fue igualada a 20 ng/ml en todas las muestras antes de realizar la amplificación del ADN.

Se identificó a *P. dissotocum* mediante PCR convencional y de Alta Fidelidad con la amplificación de una banda de ADN de 808 bp. En el primer ensayo de patogenicidad realizado en arveja se identificó a *P. dissotocum* en el control positivo y en las plantas inoculadas 1, 3, 4 y 5 mediante PCR convencional y de Alta Fidelidad (Tablas 4.9 y 4.11, figuras 4.8 A, B). En el segundo ensayo se identificó al patógeno en el control positivo y en las plantas inoculadas 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (Tablas 4.9 y 4.11, figuras 4.9 A, B). Estos resultados confirmaron la infección de *P. dissotocum* inoculado.

En el primer ensayo de patogenicidad realizado en cilantrillo se identificó a *P. dissotocum* mediante PCR convencional en el control positivo y cuatro de las diez plantas inoculadas: 1, 4, 8 y 9 (Tabla 4.7 y Figura 4.19A). Mediante PCR de alta fidelidad se identificó al oomiceto en el control positivo y en seis de las diez plantas inoculadas: 2, 3, 5, 6, 7 y 10 (Tablas 4.9 y 4.11; Figura 4.9B) en las cuales *P. dissotocum* no fue detectado con la PCR convencional. En el segundo ensayo de patogenicidad se identificó a *P. dissotocum* con PCR convencional en el control positivo y las plantas inoculadas 3 y 10 (Tablas 4.9 y 4.11, figura 4.11A), mientras que la técnica de PCR de alta fidelidad permitió identificar al patógeno en ocho de las diez plantas inoculadas donde *P. dissotocum* no fue detectado con la PCR convencional: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (Tablas 4.9 y 4.11, figura 4.11B).

Las bandas de ADN identificadas con PCR convencional fueron más brillantes, definidas y de mayor grosor que las bandas amplificadas con el PCR de Alta Fidelidad. Sin embargo el PCR de Alta Fidelidad permitió la identificación de falsos negativos que no fueron detectados el PCR convencional, en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad en cilantrillo.

**Tabla 4.9. Concentración del ADN obtenido de las plantas de arveja inoculadas con *P. dissotocum* en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad**

Arveja		
Plantas control		
Planta inoculada	Concentración de DNA en ng <sup>1</sup>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	43	56
2	22	64
3	51	52
4	37	65
<b>Media</b>	38	59

<sup>1</sup> Concentración del DNA en nanogramos por mililitro (ng/ml) mediante densidad óptica

**Tabla 4.9. Concentración del ADN obtenido de las plantas de arveja inoculadas con *P. dissotocum* en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad**

Arveja		
Plántulas inoculadas con <i>Pythium dissotocum</i>		
Secciones de la planta inoculada	Concentración de DNA en ng <sup>1</sup>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	48	27
2	55	31
3	83	141
4	127	60
5	39	172
6	132	185
7	150	42
8	98	83
9	112	56
10	61	52
<b>Media</b>	91	85

<sup>1</sup> Concentración del DNA en nanogramos por mililitro (ng/ml) mediante densidad óptica

**Tabla 4.10. Concentración del ADN obtenido de las plantas de cilantrillo inoculadas con *P. dissotocum* en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad**

Cilantrillo		
Plantas control		
Plantas inoculadas	Concentración de DNA en ng <sup>1</sup>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	32	27
2	28	30
3	43	70
4	12	23
<b>Media</b>	29	38

<sup>1</sup> Concentración del DNA en nanogramos por mililitro (ng/ml) mediante densidad óptica

**Tabla 4.10. Concentración del ADN obtenido de las plantas de cilantrillo inoculadas con *P. dissotocum* en el primer y segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad**

Cilantrillo		
Secciones de la planta inoculada	Concentración de DNA en ng <sup>1</sup>	
Plántulas inoculadas con <i>Pythium dissotocum</i>		
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	156	8
2	67	97
3	52	114
4	198	46
5	42	35
6	28	58
7	38	50
8	190	41
9	122	22
10	30	150
<b>Media</b>	92	62

<sup>1</sup> Concentración del DNA en nanogramos por mililitro (ng/ml) mediante densidad óptica

**Tabla 4.11 Detección de *Pythium dissotocum* en tejido vegetal de plantas de arveja mediante PCR convencional y de alta fidelidad**

Arveja				
No de planta evaluada	PCR convencional <sup>a</sup>		PCR de alta fidelidad <sup>a</sup>	
Controles	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

a+ = Resultados positivos, - Resultados negativos

**Tabla 4.11. Detección de *Pythium dissotocum* en tejido vegetal de plantas de arveja mediante PCR convencional y de alta fidelidad**

Arveja				
No de planta evaluada	PCR convencional <sup>a</sup>		PCR de alta fidelidad <sup>a</sup>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	+	+	+	+
2	-	+	-	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	-	+	-	+
7	-	+	-	+
8	-	+	-	+
9	-	-	-	-
10	-	+	-	+

<sup>a</sup>+ = Resultados positivos, - Resultados negativos

**Tabla 4.12. Detección de *Pythium dissotocum* en tejido vegetal de plantas de cilantrillo mediante PCR convencional y de alta fidelidad**

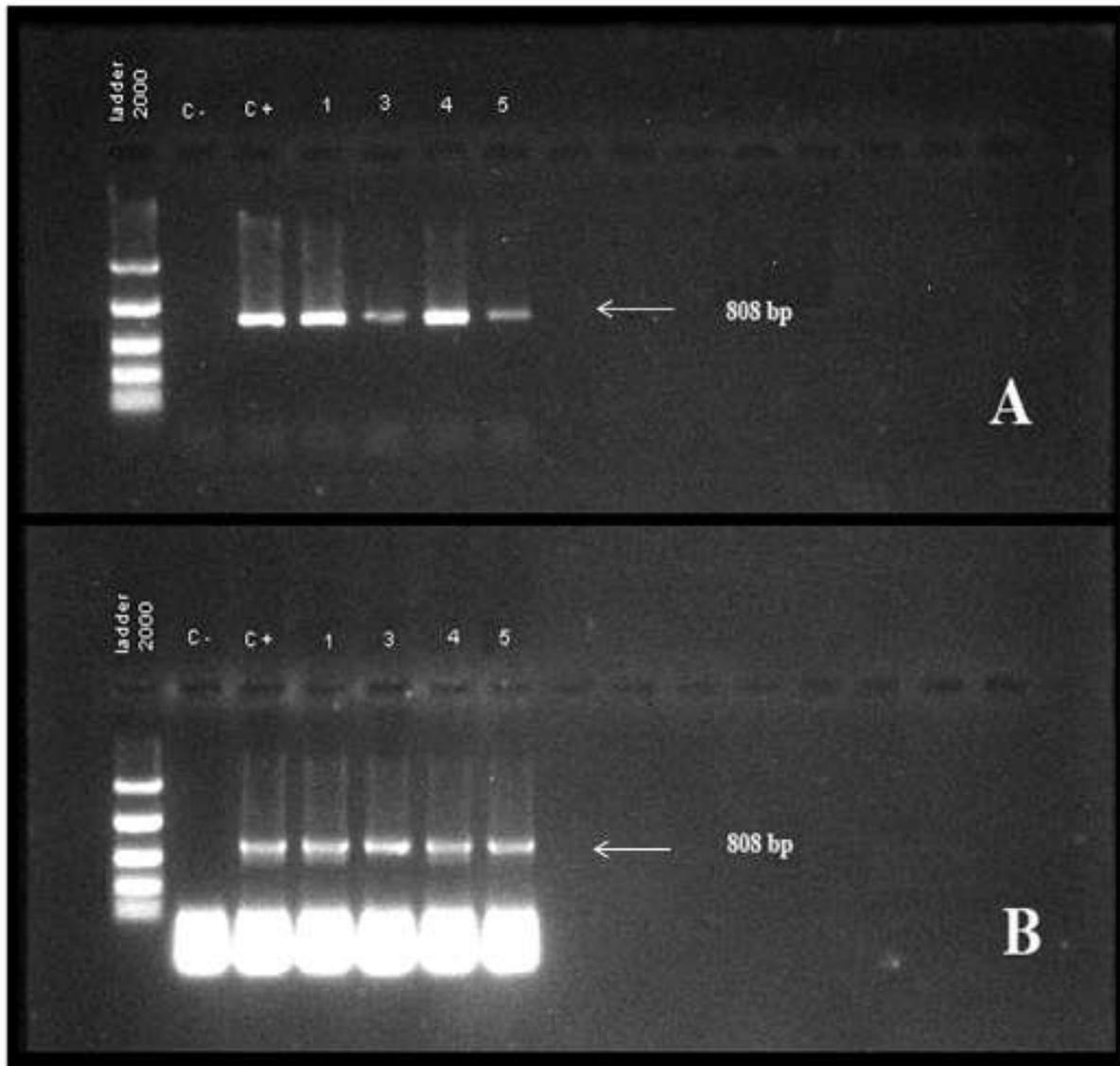
Cilantrillo				
No de planta evaluada	PCR convencional <sup>a</sup>		PCR de alta fidelidad <sup>a</sup>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

<sup>a</sup>+ = Reacción positiva, - Reacción negativa

**Tabla 4.12. Detección de *Pythium dissotocum* en tejido vegetal de plantas de cilantrillo mediante PCR convencional y de alta fidelidad**

Cilantrillo				
No de planta evaluada	PCR convencional <sup>a</sup>		PCR de alta fidelidad <sup>a</sup>	
Plantas Inoculadas	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
1	+	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	+	+	-
4	-	-	-	+
5	+	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	+	-	-	+
9	+	-	-	+
10	-	+	+	-

<sup>a</sup>+ = Reacción positiva, - Reacción negativa



**Figura 4.8. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* a partir de tejido de plantas de arveja inoculadas. Escalera (ladder) controles C-, C+ y plantas inoculadas I1, I3, I4 y I5. A) PCR convencional B) PCR de alta fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Primer ensayo de las pruebas de patogenicidad**

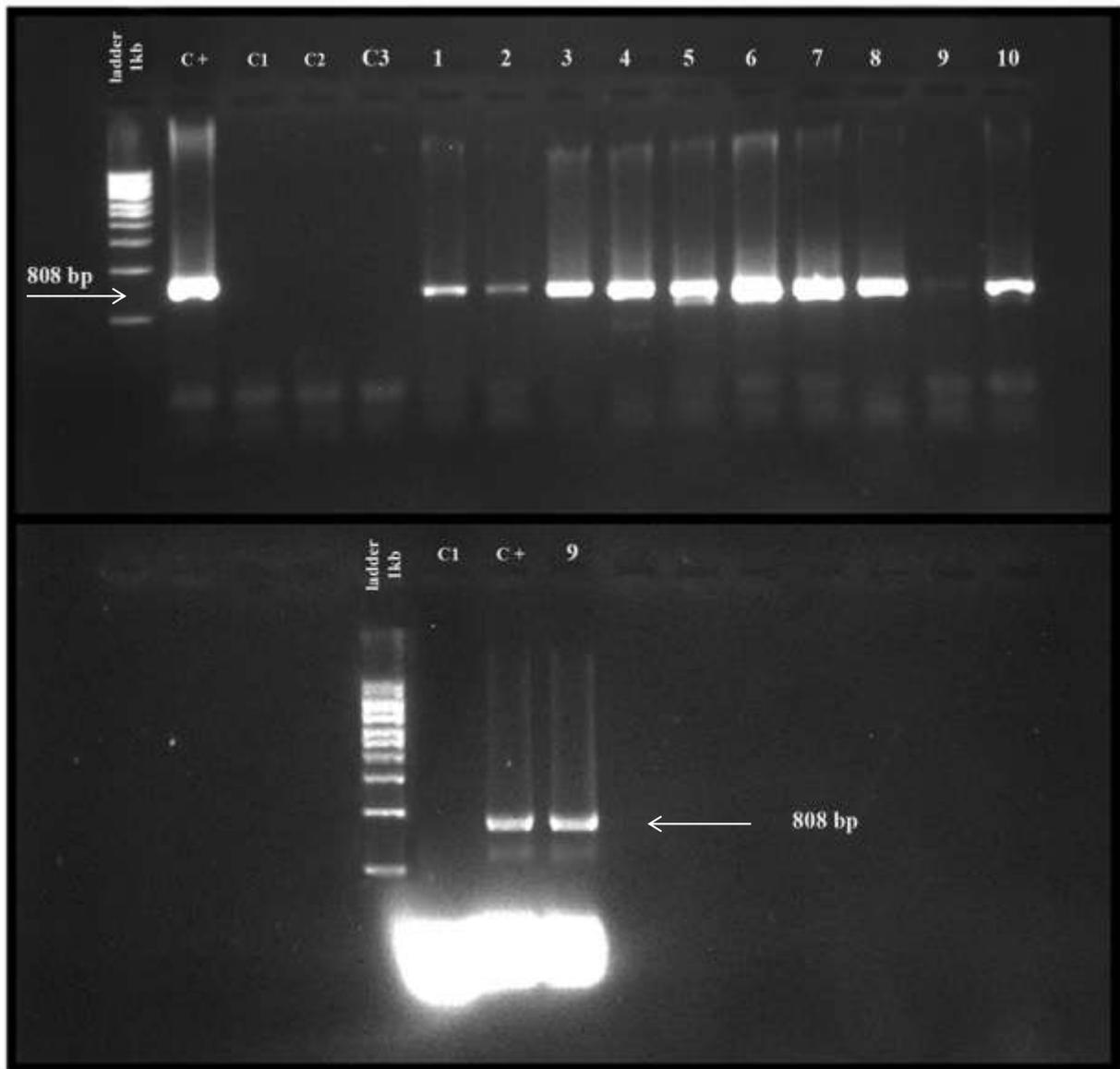


Figura 4.9. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* a partir de tejido de plantas de arveja inoculadas. Escalera (ladder) controles C+, C1, C2, C3 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. A) PCR convencional B) PCR de alta fidelidad. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.

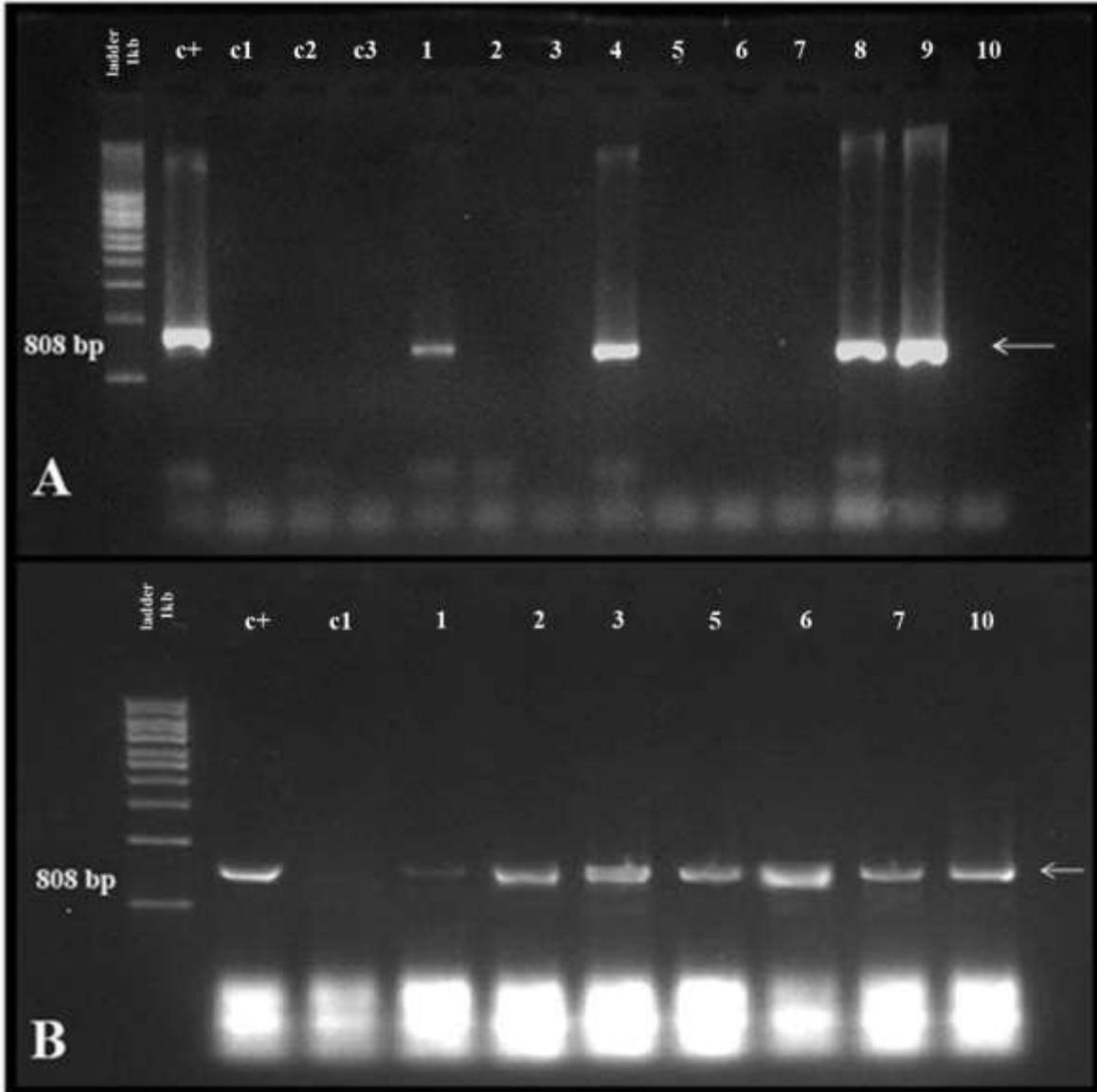
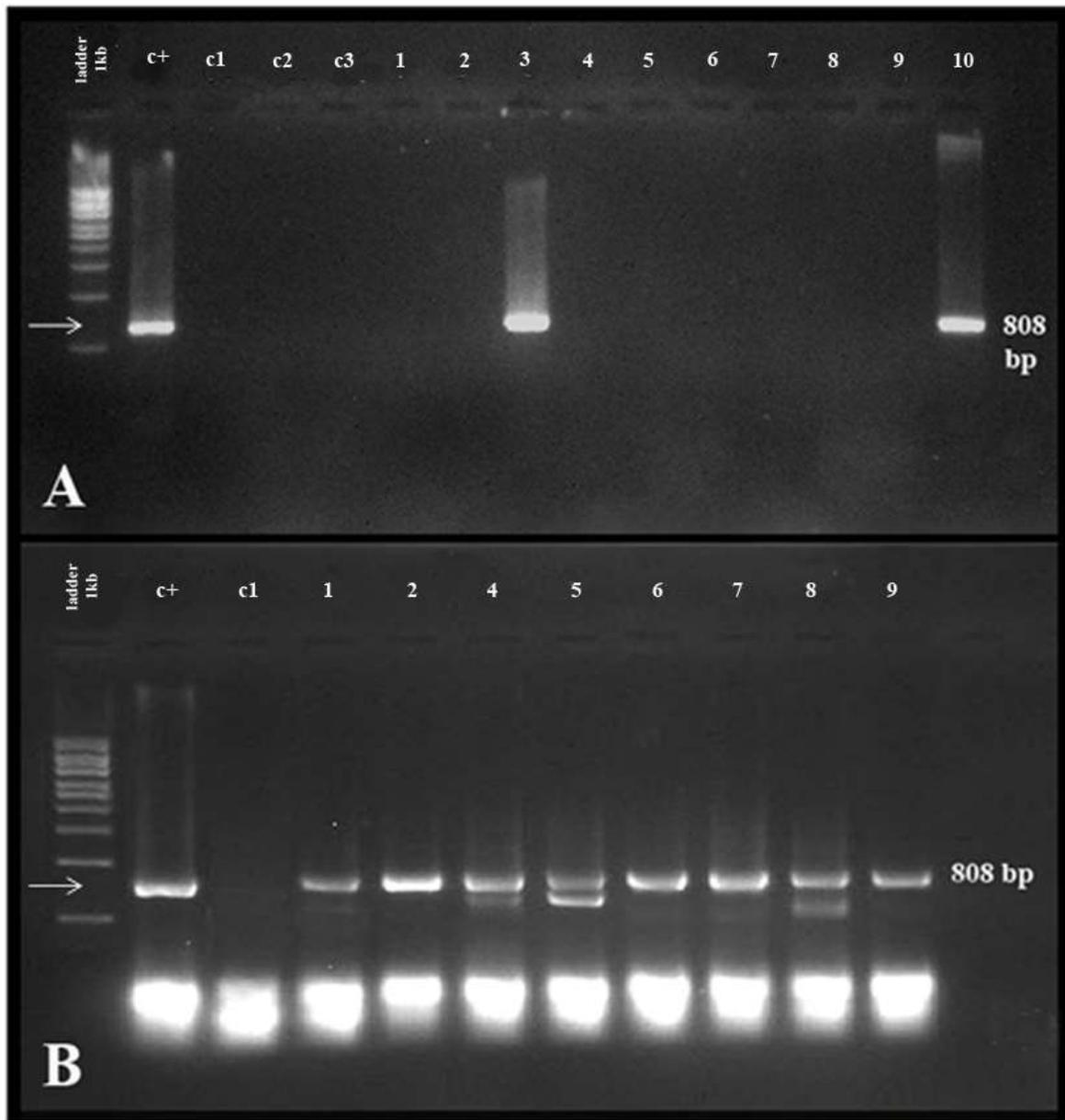


Figura 4.10. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* a partir de tejido de plantas de cilantro inoculadas. Escalera (ladder) A) PCR convencional controles C+, C1, C2, C3 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. B) PCR de alta fidelidad controles C+, C1 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Primer ensayo de las pruebas de patogenicidad.



**Figura 4.11.** Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde el tejido de plantas de cilantro inoculadas. Escalera (ladder) A) PCR convencional controles C+, C1, C2, C3 y plantas inoculadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. B) PCR de alta fidelidad controles C+, C1 y plantas inoculadas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp. Segundo ensayo de las pruebas de patogenicidad.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sensible y eficiente ampliamente utilizada para la amplificación y detección de la secuencia del espaciador intergénico ITS del rADN. La región ITS es capaz de generar más de 50 secuencias repetidas de rADN, lo cual le proporciona una alta sensibilidad de detección y le confiere el atributo de ser una secuencia genómica blanco para la identificación molecular precisa (Kageyama et al., 1997). La técnica de PCR basada en la región ITS ha permitido la identificación molecular de las especies del género *Pythium* a partir de aislados puros o directamente desde muestras medioambientales (Lévesque y De Cock, 2004; Robideau et al., 2011).

En la presente investigación la amplificación de la región intergénica ITS mediante la técnica de PCR convencional y los cebadores ITS1 e ITS4, permitió identificar eficientemente a *P. dissotocum* a partir del tejido vegetal de arveja y cilantrillo. Se amplificó un fragmento de 808 bp. En arveja en el primer ensayo se identificó a *Pythium* en cuatro (40%) de las 10 plantas inoculadas (Figura 4.10 y tabla 4.13) y en el segundo ensayo en nueve (90%) de las 10 plantas inoculadas (Figura 4.11 y tabla 4.13). En cilantrillo en el primer ensayo se identificó a *P. dissotocum* en cuatro (40%) de las 10 plantas inoculadas (Figura 4.12 y tabla 4.13) y en el segundo ensayo en dos (20%) de las 10 plantas inoculadas (Figura 4.13 y tabla 4.13). La técnica de PCR convencional mediante la amplificación de las regiones ITS y COI ha permitido la identificación taxonómica a nivel de especie dentro del género *Pythium*. En investigaciones como aquella realizada por Bala y colaboradores (2011) se ha logrado la identificación de nuevas especies como *P. oopapillum*, *P. emineosum* and *P. camurandrum*, aisladas de suelo en diferentes regiones de Canadá. La amplificación de las regiones ITS y COI ha permitido el establecimiento de relaciones filogenéticas del género. En investigaciones como aquella realizada por Lévesque y De Cock, (2004) se estableció la filogenia de 30 especies de *Pythium* mediante la amplificación de las regiones ITS y COI con la PCR convencional.

**Tabla 4.13. Número y porcentaje de plantas inoculadas de arveja y cilantrillo en la que se detectó a *P. dissotocum* con PCR convencional**

	# de plantas	% Identificadas	% no Identificadas
<b>Arveja</b>			
Primer Ensayo	4	40	60
Segundo ensayo	9	90	10
<b>Cilantrillo</b>			
Primer Ensayo	4	40	60
Segundo ensayo	2	20	80

A pesar de la eficiencia reportada en la técnica de PCR convencional para la amplificación de la región ITS de las especies del género *Pythium*. En la presente investigación la técnica de PCR convencional no amplificó la región ITS en seis (60%) de las 10 plantas inoculadas de arveja en el primer ensayo (Tabla 4.12) y una (10%) en el segundo ensayo (Tabla 4.12). En cilantrillo en seis (60%) de las 10 plantas inoculadas en el primer ensayo (Tabla 4.13) en ocho (80%) en el segundo ensayo de patogenicidad (Tabla 4.13).

La identificación de *Pythium* mediante PCR convencional a partir de muestras infectadas naturalmente puede ser perturbada por la presencia de sustancias inhibitoras como los ácidos húmicos. Estas sustancias se presentan en alta concentración en los hipocótilos y las raíces de plantas que manifiestan síntomas de pudrición (Kageyama et al., 1997). Otras sustancias presentes en los medios de cultivo también pueden causar interferencia puesto que se encuentran adheridas en las paredes celulares del oomiceto (Borman et al., 2008). Las deficiencias en la amplificación con PCR convencional también pueden ser consecuencia de la interferencia del ADN de la planta hospedera, evitando la discriminación del ADN del patógeno (Cating et al., 2012; Jeyaprakash y Hoy, 2000; Hoy et al., 2001).

Para superar las deficiencias que ocasionan la los inhibidores del PCR, Borman y colaboradores (2008) sugieren el uso de protocolos de extracción de ADN que logren mayor nivel de pureza del material genético. Sin embargo, estos protocolos disponibles aun no son lo

suficientemente eficientes para lograr eliminar todos los inhibidores del PCR y además son laboriosos y costosos (Borman et al., 2008).

Una alternativa que supera las limitaciones del PCR convencional y que proporciona mayor sensibilidad y eficiencia para la identificación de fitopatógenos, es la técnica de PCR de Alta Fidelidad (Hoy et al., 2001, Jeyaprakash and Hoy, 2000). En esta investigación la técnica de PCR de Alta Fidelidad permitió la identificación de *P. dissotocum*, amplificando una región de 808 bp en las muestras que resultaron negativas con la PCR convencional. En las plantas de arveja en el primer ensayo se identificó a *P. dissotocum* en el 60% de las plantas que resultaron negativas con la PCR convencional (Tabla 4.14) y en el segundo ensayo en una de las plantas (Tabla 4.14). En el cilantrillo se amplificó a *P. dissotocum* en seis (60%) de las plantas negativas con el PCR convencional (Tabla 4.14) y en el segundo ensayo en ocho (80%) de las plantas (Tabla 4.14).

La PCR de Alta Fidelidad permite la identificación del patógeno en los falsos negativos producidos por la técnica de PCR convencional. La reacción de Alta Fidelidad, conlleva la acción de dos enzimas ADN polimerasas, una de las cuales realiza actividad de corrección de errores (proof-reading). Estas enzimas ADN polimerasas confieren mayor eficiencia para lograr discriminar entre el DNA del patógeno y el DNA del hospedero (Cating et al., 2012; Hoy et al., 2001; Jeyaprakash y Hoy, 2000). En investigaciones como aquella realizada por Cating y colaboradores en el año 2012 se identificó al hongo *Pseudocercospora odontoglossi* en presencia del DNA de su hospedero, la orquídea *Cattleya*. Jeyaprakash y Hoy (2000) identificaron a *Wolbachia* en combinación con el material genético de su hospedero, en 63 especies de artrópodos. El ADN del *Candidatus liberibacter asiaticus* también a sido discriminado fielmente cuando se lo mezcla con ADN de plantas de cítricos, psílidos o parasitoides (Hoy et al., 2001).

La técnica de PCR de alta fidelidad también ha sido eficientemente utilizada para la identificación de hongos degradadores de poliuretano a partir de muestras de suelo sin presencia de inhibición (Cosgrove et al., 2007).

**Tabla 4.14. Número y porcentaje de plantas inoculadas de arveja y cilantrillo en la que se detectó a *P. dissotocum* con PCR de Alta Fidelidad**

	# de plantas	% Identificadas
<b>Arveja</b>		
Primer Ensayo	6	60
Segundo ensayo	1	10
<b>Cilantrillo</b>		
Primer Ensayo	6	60
Segundo ensayo	8	80

La infección causada por *P. dissotocum* en las plantas de arveja y cilantrillo demuestra que *Pisum sativum* cv. “Sugar Baby” y *Coriandrum sativum* cv. “Lonestar” fueron susceptibles al ataque del patógeno. Las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el periodo en que los ensayos de patogenicidad se realizaron fueron óptimas para su desarrollo. *Pythium dissotocum* como agente causal de la pudrición de la raíz infecta las plantas de arveja del primer ensayo en condiciones de temperatura que fluctuaron entre 23 y 30°C, y humedad relativa entre 59 y 92 % , durante el mes de mayo del 2011. Las plantas de arveja en el segundo ensayo y de cilantrillo en el primer ensayo se infectaron en condiciones de temperatura de 24 a 28°C y humedad relativa de 58 a 84% para el mes de septiembre del mismo año. Las plántulas de cilantrillo en el segundo ensayo se infectaron en condiciones de temperatura de entre 24 a 28°C, y humedad relativa de 61 a 84% en el mes de octubre del 2011 (National Weather Service Forecast, 2012).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Davis y Raid (2002), y Hagedorn, (1984) quienes indican que el rango de temperatura óptima para la infección de *Pythium* causando pudrición de la raíz fluctúan entre 18 y 24°C. Las condiciones de alta humedad, 80% en suelo y del 100% en hidropónicos, favorecen el desarrollo de *Pythium* (Sutton et al., 2006).

Las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad identificaron a *P. dissotocum* a partir de tejido vegetal de cilantrillo y arveja, amplificando una región de 808 bp. La técnica de PCR de Alta Fidelidad demostró mayor eficiencia en comparación con la técnica de PCR convencional, logrando identificar a *P. dissotocum* en todas las muestras de cilantrillo y arveja que resultaron falsos negativos con la técnica de PCR convencional. Se demostró la capacidad del PCR Alta Fidelidad para amplificar secuencias genéticas de ADN blanco en presencia de ADN no blanco o contaminante eliminando la posibilidad de la generación de falso negativos. La habilidad de las ADN polimerasas con actividad de corrección de errores permiten discriminar al material genético del patógeno del material genómico del hospedero (Cating et al., 2012; Hoy et al., 2000).

La determinación de las especies del género *Pythium* debe considerar integralmente la identificación morfológica utilizando caracteres diagnósticos, pruebas serológicas cuando estén disponibles y la identificación molecular (Bala et al., 2010). La complementariedad entre las técnicas de identificación es necesaria para lograr mayor precisión en la identificación taxonómica y superar las deficiencia que pudieran producirse (Bala et al., 2010; Schroeder et al., 2006).

La identificación morfológica puede presentar errores relacionados con la precisión del establecimiento de diferencias en la forma y dimensiones de las estructuras diagnósticas. La identificación molecular basada en la región ITS presenta limitaciones relacionadas a la disminución o ausencia, en algunos casos, de la variabilidad de la región ITS la cual es determinante en la diferenciación entre especies (Schroeder et al., 2006). En algunas especies como *P. aphanidermatum* y *P. deliense* al poseer regiones del espaciador intergénico (ITS) idénticas o casi idénticas, la identificación morfológica es determinante ya que estas especies presentan claras diferencias en su morfología (Van der Plaats-Niterink, 1981; Lévesque y De Cock, 2004).

El análisis de la región ITS así como las secuencias COI proveen suficiente evidencia en la identificación de nuevas especies (Bala, 2010).

La complejidad en la taxonomía de las especies de *Pythium* incrementa cuando múltiples especies constituyen una única especie identificada. Este es el caso de las especies pertenecientes al Cluster B2 el cual incluye a *P. dissotocum*, *P. diclinum*, *P. cf. dictyosporum*, *P. dissotocum*, *P. lutarium*, *P. sp.* 'Group F' y *P. sp.* 'tumidum'. La semejanza genética entre especies también

incrementa la complejidad taxonómica. Las secuencias ITS de *P. coloratum*, *P. lutarium*, *P. marinum* y *P. dissotocum* son idénticas, y en *P. diclinum* difieren en un par de bases del ADN (Lévesque y De Cock, 2004). Estas variaciones sutiles en las características morfológicas y en la región ITS hacen la diferencia entre especies cercanamente relacionadas tornando compleja su identidad taxonómica.

La identificación de las especies de *Pythium* se complementa también con el uso de marcadores moleculares derivados del ADN mitocondrial o secuencias COI. Esta secuencia ha logrado mayor exactitud en la determinación de especies cercanamente relacionadas y además, ha sido capaz de crear junto con la región ITS un código de barras del DNA para el banco de genes de oomicetos (Robideau et al., 2011).

El hábitat específico o el nicho ecológico de las especies es un factor que debe ser considerado en la definición biológica y evolutiva de especie (De Queiroz, 2005). En esta investigación el hábitat de *P. dissotocum* fue un carácter considerado como determinante identificarlo como agente causal de la pudrición de la raíz en cilantrillo de cultivos hidropónicos. El hábitat de *P. dissotocum* se relaciona con el agua, puesto que la especie fue aislada de fondos marinos (Lévesque y De Cock, 2004), además ha sido identificada afectando cultivos hidropónicos y/o en condiciones de invernadero (Calmin et al., 2008; Herrero et al., 2006).

La taxonomía de *P. coloratum* y *P. dissotocum* es compleja, incluso las bases de datos disponibles en el banco de genes Gen Bank poseen fallas en discriminar a las especies como *P. coloratum* y *P. disotocum*. El concepto de especies en este importante grupo requiere ser investigado utilizando genes altamente variables (Lévesque y De Cock, 2004).

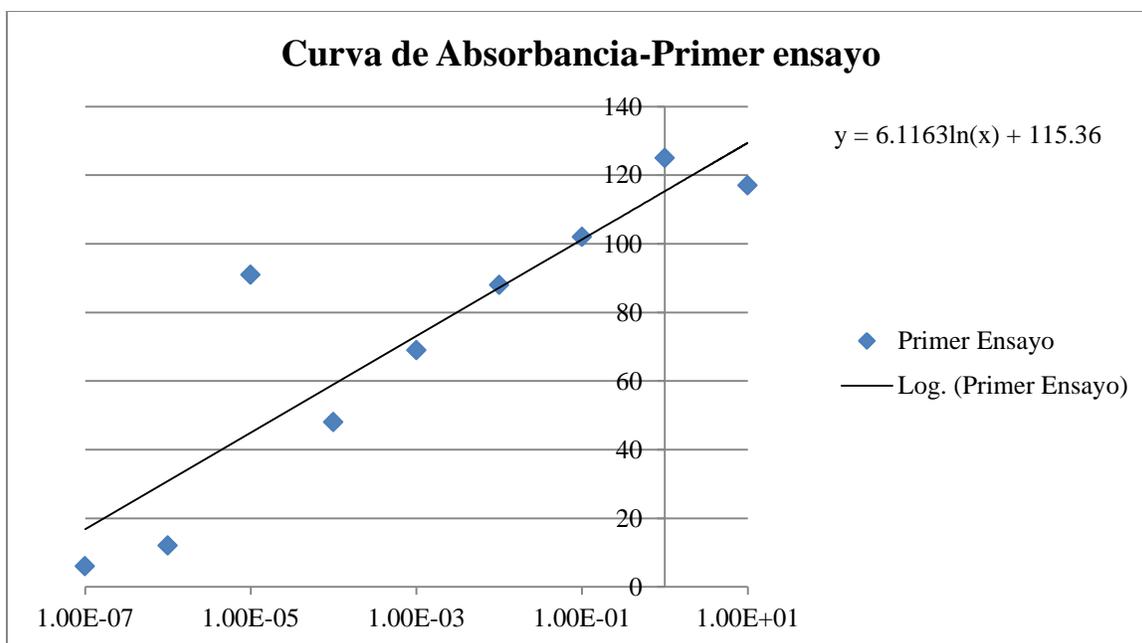
### **Comparación del PCR convencional y de Alta Fidelidad en la detección de *Pythium dissotocum* a partir de ocho diluciones seriadas de ADN.**

En el primer y segundo ensayo se comparó la sensibilidad de la PCR convencional y de Alta Fidelidad en la detección de *P. dissotocum* a partir de ocho diluciones seriales. La PCR convencional logró detectarlo en las diluciones  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se obtuvieron una banda definida y brillante en las diluciones  $10^0$  y  $10^{-1}$  y bandas de menor intensidad en las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  (Figuras 4.14 y 4.15)

Mediante PCR de alta fidelidad se logró detectar a *P. dissotocum* en las ocho diluciones seriales en los dos ensayos realizados. Se obtuvieron bandas brillantes y definidas en la dilución  $10^0$  del primer y segundo ensayo así como en la dilución  $10^{-1}$  del segundo ensayo. Se presentaron bandas de ADN tenues en la dilución  $10^{-1}$  del primer ensayo y las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  del primer y segundo ensayo. La intensidad de las bandas varía gradualmente en orden de magnitud, siendo casi imperceptible la banda de ADN obtenida en la dilución  $10^{-8}$  (Figuras 4.14 y 4.15).

**Tabla 4.15. Diluciones seriales para la detección de *P. dissotocum* con PCR convencional y de Alta Fidelidad. Primer Ensayo**

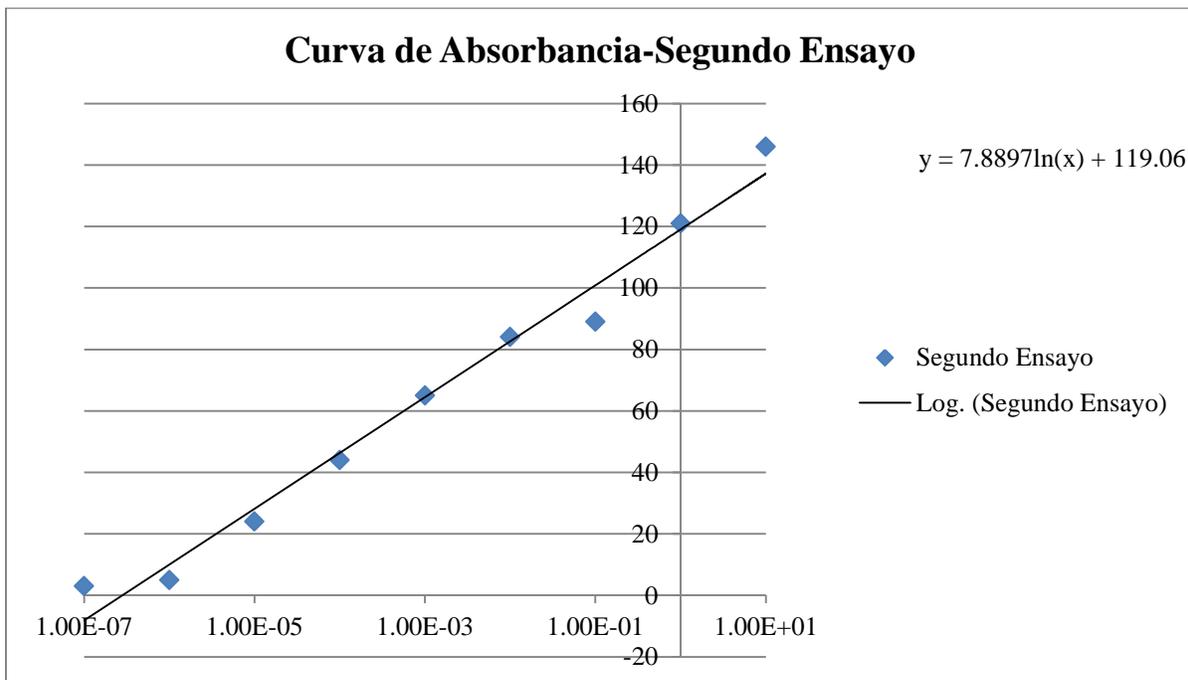
Aislado	Diluciones	Absorbancia ng/ $\mu$ l	
<b>Primer Ensayo</b>			
1271	1.00E+01	10.0000000	117
1271	1.00E+00	1.0000000	125
1271	1.00E-01	0.1000000	102
1271	1.00E-02	0.0100000	88
1271	1.00E-03	0.0010000	69
1271	1.00E-04	0.0001000	48
1271	1.00E-05	0.0000100	91
1271	1.00E-06	0.0000010	12
1271	1.00E-07	0.0000001	6



**Figure 4.12 Curva de calibración de las ocho diluciones seriales. Primer Ensayo**

**Tabla 4.16. Diluciones seriales para la detección de *P. dissotocum* con PCR convencional y de Alta Fidelidad. Segundo Ensayo**

Aislado	Diluciones	Absorbancia ng/μl
<b>Segundo Ensayo</b>		
1271	1.00E+01	10.000000
1271	1.00E+00	1.000000
1271	1.00E-01	0.100000
1271	1.00E-02	0.010000
1271	1.00E-03	0.001000
1271	1.00E-04	0.000100
1271	1.00E-05	0.000010
1271	1.00E-06	0.000001
1271	1.00E-07	0.000000



**Figure 4.13. Curva de calibración de las ocho diluciones seriales. Segundo Ensayo**

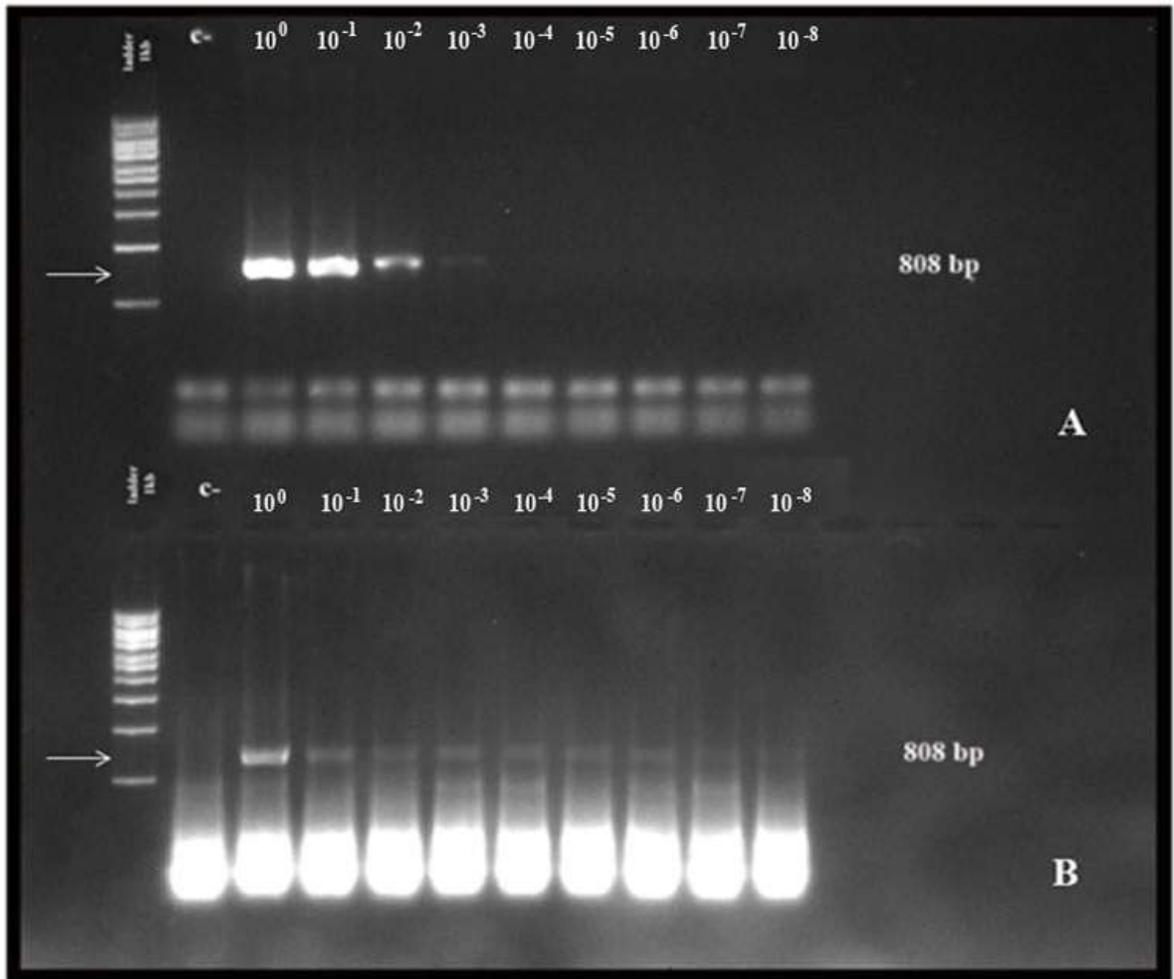


Figura 4.14. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde ocho diluciones seriales de ADN de la muestra 1271. Primer Ensayo A) PCR convencional y B) PCR de alta fidelidad controles de C- (control negativo),  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ . La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp.

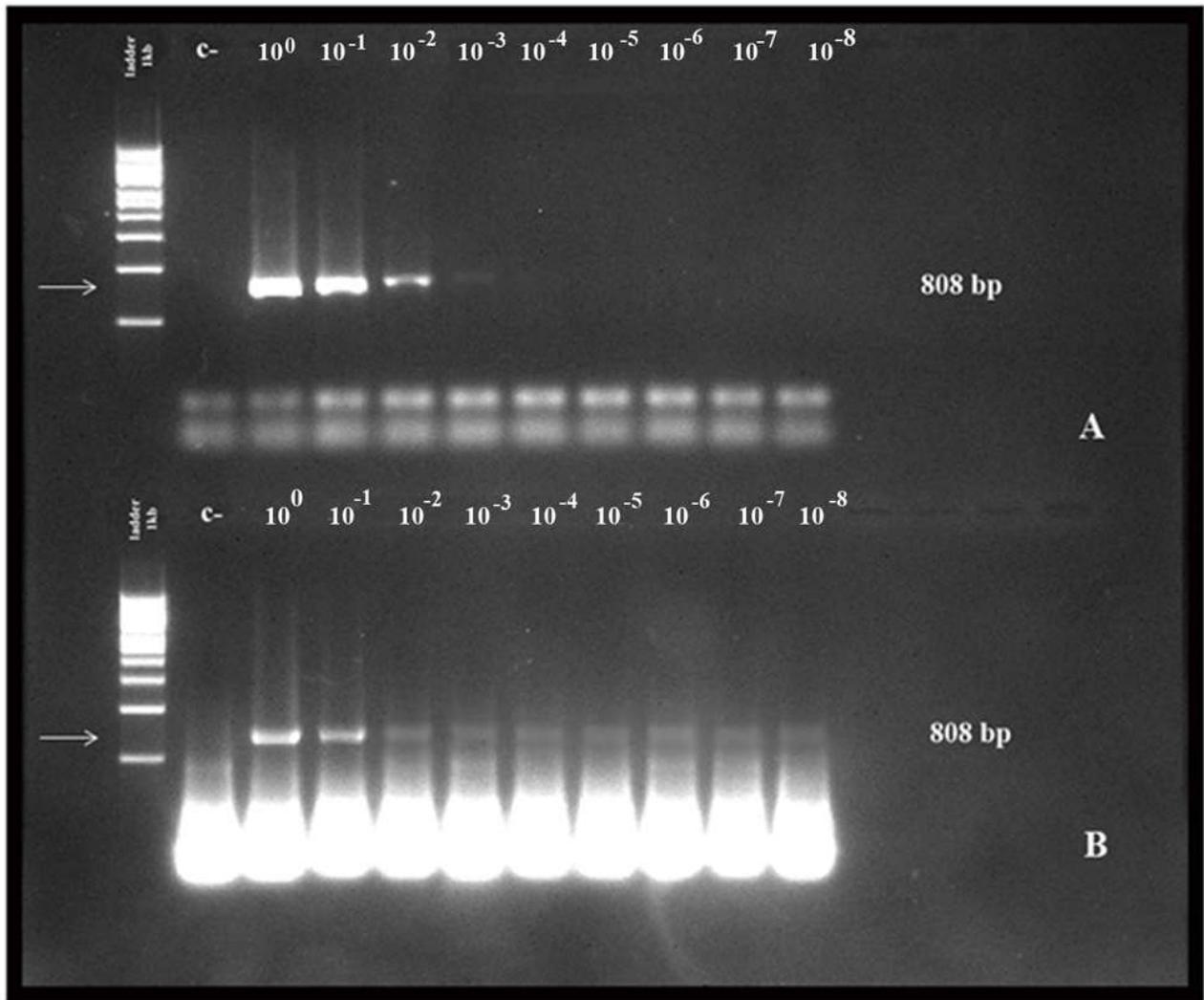


Figura 4.15. Gel de agarosa para la detección de *Pythium dissotocum* desde ocho diluciones seriales de ADN de la muestra 1271. Segundo Ensayo A) PCR convencional y B) PCR de alta fidelidad controles de C- (control negativo),  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ . La flecha indica los productos de amplificación del PCR convencional y de alta fidelidad de 808 bp.

El límite de detección de las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad se confirmó mediante la observación de las bandas de los productos del PCR en un gel de agarosa al 1%. Se consideraron dos parámetros: 1) la presencia o ausencia de bandas en cada una de las técnicas y 2) la definición, intensidad, y grosor de las mismas.

En los dos ensayos realizados las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad lograron identificar a *P. dissotocum* amplificando una banda de 808 bp con los cebadores ITS1-ITS4. La PCR de Alta Fidelidad fue ser más eficiente que la técnica de PCR convencional, logrando amplificar el ADN de *P. dissotocum* en la ocho diluciones seriales realizadas y el control positivo ( $10^0$ ). La PCR convencional logró detectar el oomiceto únicamente en cuatro de las ocho diluciones seriales:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

La PCR de Alta Fidelidad amplificó bandas de ADN definidas en las ocho diluciones seriales en ambos ensayos. Las bandas fueron gruesas y brillantes en el control positivo ( $10^0$ ) y la dilución ( $10^{-1}$ ) mientras que las bandas obtenidas en las 7 diluciones restantes fueron tenues y de baja intensidad. La PCR convencional amplificó bandas definidas, gruesas y brillantes en las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , mientras que en la dilución  $10^{-4}$  la banda de ADN fue definida pero muy tenue, casi imperceptible.

La técnica de PCR convencional posee limitaciones relacionadas con la fidelidad del producto final, la presencia de falsos negativos y con el tamaño del producto amplificado, limitado a 5 Kb (Barnes, 1994). Estas limitaciones han sido superadas con la PCR de Alta Fidelidad que ha demostrado ser mucho más sensitiva que la técnica convencional de PCR; particularmente en la identificación de patógenos (Hilgenboecker et al., 2008). Esta técnica permite la amplificación eficiente de ADN de interés en presencia de grandes cantidades de ADN genómico y evita la interferencia del material genómico de otros organismos contaminantes (Barnes, 1994; Cating et al., 2012).

El límite de detección de las técnicas de PCR convencional y de Alta Fidelidad se comparó en forma cuantitativa estableciendo la relación entre la absorbancia de cada dilución y la concentración. Al realizar la curva de calibración se determinó la tendencia lineal y la relación directamente proporcional de la absorbancia en relación a la concentración y al nivel de detección. Al no presentarse dispersión significativa en la relación absorbancia-concentración se demuestra la proporcionalidad de estos parámetros con el nivel de detección, representado con la ecuación lineal (Tablas 4.15 y 4.16 y figuras 4.12 y 4.13).

La PCR de Alta fidelidad ha demostrado ser más sensitiva que el PCR convencional en seis ordenes de magnitud (Cating et al., 2012). En los dos ensayos realizados se logró amplificar bandas brillantes y de 808 bp en las ocho diluciones, desde la más concentrada ( $10^{-1}$ ) (Tabla 4.16 y Figura 4.12) hasta la menos concentrada ( $10^{-8}$ ). La PCR de Alta Fidelidad logro amplificar el ADN de *P. dissotocum* en una concentración de  $10^{-8}$  y absorbancias de 6 nm (primer ensayo) (Tabla 4.15 y Figuras 4.12 y 4.14) y 3 nm (segundo ensayo) (Tabla 4.16 y Figuras 4.13 y 4.15). La PCR convencional posee un nivel de detección menor que la PCR de Alta Fidelidad, amplifico únicamente al ADN de *P. dissotocum* en una concentración de  $10^{-4}$  con una absorbancia de 48 nm (primer ensayo) (Tabla 4.15 y Figuras 4.12 y 4.14) y 44 (segundo ensayo) (Tabla 4.11 y Figuras 4.13 y 4.15).

La técnica de PCR de Alta Fidelidad ha demostrado su nivel más alto de detección identificando al ADN blanco en concentraciones de hasta 1fg, mientras que la PCR convencional ha logrado amplificar plásmidos de ADN en concentraciones de hasta en 1 ng. Este nivel de detección del ADN de patógenos se ha logrado en presencia del material genético del hospedero. En ausencia del ADN del hospedero la PCR convencional ha permitido detectar a secuencias de ADN blanco en concentraciones de hasta 10 fg (Cating et al., 2012).

El nivel de detección logrado con la PCR convencional y de Alta Fidelidad puede estar influenciado por la concentración del ADN blanco y por el tamaño de la secuencia de los iniciadores. Hoy y colaboradores (2001) demostraron que el PCR convencional genera falsos negativos cuando grandes cantidades de ADN blanco están presentes en la reacción. El tamaño de la secuencia de los iniciadores influye en el nivel de detección logrado con las técnicas de PCR. Los iniciadores de secuencia corta como aquellos diseñados a partir de la región 16S pueden fallar cuando existe abundante cantidad de ADN de blanco. Al usar iniciadores de secuencia larga como los iniciadores nusG-rp/K la escasa cantidad de ADN templado puede generar falsos negativos (Hoy et al., 2001).

## CONCLUSIONES

- Los aislados 1271 y 1272, obtenidos de un cultivo hidropónico de cilantrillo del municipio de Adjuntas, fueron identificados morfológicamente como *Pythium* spp.
- La prueba TAS ELISA para *Pythium ultimum* y la reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores K1 y K2 determinaron que los aislados 1271 y 1272 no corresponden a *P. ultimum*.
- La PCR convencional y de alta fidelidad, amplificaron una región de 808 bp con los iniciadores ITS1-ITS4 correspondiente a *Pythium dissotocum* a partir de los aislados 1271 y 1272 y del tejido vegetal de plantas de cilantrillo y arveja inoculadas.
- La PCR de alta fidelidad demostró mayor sensibilidad que la PCR convencional, amplificó una región de 808 bp correspondiente a *Pythium dissotocum* en los resultados falsos negativos obtenidos con la técnica de PCR convencional.
- La PCR de Alta Fidelidad posee mayor nivel de detección que la PCR convencional, ya que amplificó una región de 808 bp correspondiente a *P. dissotocum* en una dilución de ADN de  $10^{-8}$  con DO 4.5 nm.
- Las características morfológicas identificadas en los aislados 1271 y 1272 cultivados en medio PDA y V8 y la secuenciación de espaciador intergénico ITS determinaron que el agente causal de la pudrición de la raíz en cilantrillo en hidroponía es *Pythium dissotocum*.
- En las pruebas de patogenicidad el aislado 1271 de *Pythium dissotocum*, produjo síntomas de sancocho “damping off” postemergente, lesiones necróticas en la raíz y la base del tallo y pudrición en el sistema vascular, 15 días después de la inoculación en arveja y 21 días en cilantrillo. La severidad de los daños en el sistema radicular se presento en cinco niveles desde el nivel 1 con raíz sana y 0% de necrosis hasta en nivel 9 con más del 50% de necrosis en la raíz y marchitez del tejido foliar.

## RECOMENDACIONES

- Realizar un monitoreo de *Pythium dissotocum* causando la pudrición de la raíz en cultivos hidropónicos de cilantrillo en Puerto Rico.
- Utilizar las técnicas de PCR convencional y de alta Fidelidad para el diagnóstico rápido y oportuno de *Pythium dissotocum* directamente a partir del tejido vegetal.
- Evaluar el uso del PCR convencional y de Alta Fidelidad para la detección de *Pythium* spp. desde el agua de riego y de la solución nutritiva en sistemas hidropónico
- La PCR convencional podrá utilizarse como una técnica rutinaria para la identificación de *Pythium dissotocum* mientras que, la PCR de alta fidelidad podrá utilizarse para identificar a *P. dissotocum* en muestras que resultaron negativas con la PCR convencional. La PCR de Alta Fidelidad es costosa e requiere tiempo y destreza.
- Evaluar el uso de Multiplex PCR para la identificación de *Pythium* spp. a partir de suelo y agua
- La identificación de *Pythium dissotocum* debe ser complementada con el análisis de las secuencias COI y COX1 codificadas por genes mitocondriales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agdia, 2008. Triple Antibody Sandwich (TAS) ELISA for detection of *Pythium ultimum*. Online Catalog.  
[https://orders.agdia.com/InventoryD.asploc=INcollection=SRA2092500&attribute\\_Size=1000](https://orders.agdia.com/InventoryD.asploc=INcollection=SRA2092500&attribute_Size=1000)
- Agrios, G. 2005. Diseases caused by Oomycetos. Chapter eleven: Plant Diseases caused by fungi. Plant Pathology 5ta. Ed. Academic Press. New York . pp: 409-415.
- Ali-Shtayeh, M. S., MacDonald, J. D. and Kabasima, J. 1991. A Method for Using Comercial ELISA Test to Detect Zoosporas of *Phytophthora* and *Pythium* Species in Irrigation Water. Plant Disease 75 (3): 305-301.
- All – Shtayeh, M. S. 1986. The Genus *Pythium*. In the West Bank and Gaza Strip. The Resarch and Documentation Centre, An': Najah National University, Nablus pp: 2-4.
- Altier, N. H., Barnes, D. K., Thies, J. A. and Samac, D. A. 1995. Pythium Seed Rot and Damping-off Resistance. Standard Tests to Characterize Alfalfa Cultivars. Compendium: 1-2.
- Bala, K., Robideau, G.P., Désaulniers, D., De Cock, A.W.A.M., Lévesque, C.A. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. Persoonia 25: 22–31.
- Barnes, W. M. 1994. PCR amplification of up 35 kb ADN with High Fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:2216-2220.
- Belbahri, L., McLeod, A., Paul, B., Calmin, G., Moralejo, E., Spies, C.F., Botha, W.J., Clemente A, Descals, E., Sánchez-Hernández, E., Lefort, F. 2008. Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (Pythiaceae). FEMS Microbiol Lett. 284 (1):17-27.
- Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J. and Johnson, E. M. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61 (1), i7–i12.
- Calmin, G., Dennler, G., Belbahri, L., Wigger, A. and Lefort, F. 2008. Molecular Identification of Microbial Communities in the Recycled Nutrient Solution of a Tomato Glasshouse Soil-Less Culture. The Open Horticulture Journal,1: 7-14

- Cating, R. A., Hoy, M. A. Palmateer, A. J. 2012. A Comparison of Standard and High-fidelity PCR: Evaluating Quantification and Detection of Pathogen DNA in the Presence of Orchid Host Tissue. *Plant Disease*. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0705>
- Chen, W., Hoitink, H. A. J. and Schemitthenner, A. F. 1987. Factors affecting the *Pythium* suppression damping-off in container media amended with compost. *Ecology and Epidemiology* 77 (5): 755-760.
- Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Robson, G. D., and Handley, P. F. 2007. Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (18): 5817–5824.
- Davis, R. M. and Raid, R. N. 2002. *Pythium* Root Rot. *Compendium of Umbelliferous Crop Disease*. American Phytopathology Society: 38-39.
- De Queiroz, K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *PNAS* 102 (1): 6600–6607. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502030102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502030102)
- El-Tarabily, K. A., Nassar., H. A., Hardy, G. E. St. J. and Sivasithamparam, K. 2003. Fish emulsion as a food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var *sativus*) in sandy soil. *Plant and soil* 252 (2): 397-411.
- Estévez de Jensen, C., Cabrera, I., Mercado, W. y Morales, R. 2006. Enfermedades y plagas en cultivos hidropónicos de Puerto Rico. Resumen de la Reunión Anual de la Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas. p. 23.
- Favrin, R. J., Rahe, J. E. and Mauza, B. 1988. *Pythium* spp. associated with Crown rot in Cucumbers in British Columbia greenhouses . *Plant Diseases* 72 (8): 683-687.
- Gómez -Vázquez, J. M., Serrano-Alonso, Y. y Melero-Vara, J. M. 2011. Short communication. The wilt of winter cucumber in south-eastern Spain caused by *Pythium irregulare*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(1): 303-307.
- Hagedorn, D. 1984. *Pythium* Root Rot. *Compendium of Pea Disease*. American Phytopathology Society : 29.
- Herrero, M. L., Hermansen, A. and Elen, O. N. 2003. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian Greenhouses and their Pathogenicity on Cucumber Seedlings. *J. Phytopathology* 151, 36–41.

- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215–220.
- Hoy, M. A., Jeyaprakash, A., and Nguyen, R. 2001. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological control* 22:278-287.
- InfoStat (2005). InfoStat versión 2005. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jenkins, S. F., JR. and Averre, C. W. 1983. Root Disease of Vegetals in Hydroponic cultures Systems in North Carolina Greenhouse. *Plant Disease* 67 (9): 968-970.
- Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9:393-405.
- Kabashima, J. N., Macdonald, J. D., Dreistadt, S. H., Ullman, D. E., Easy On-Site Tests for Fungi and Viruses in Nurseries and Greenhouses. University of California. Division of Agricultural and Natural Resources. Publication 8002.  
<http://homeorchard.ucdavis.edu/8002.pdf>
- Kageyama, K., Ohyama, A., Hyakumachi, M. 1997. Deteccion of *Pythium ultimum* using Polymerase Chain Raction with Species-Specific Primers. *Plant Disease* 81 (10): 1155-1160.
- Koffi, C. N. B., Diallo, H. A., Kouadio, J. D., Kelly, P., Buddie, A. G., Tymo, L. M. 2010. Ocurrence of *Pythium aphanidermatum* Root and Collar Rot of Papaya (*Carica papaya* L.) in Cote d'Ivoire. *Fruit, Vegetal and Cereal Science and Biotechnology* 4 (1): 62-67.
- Koike, S. T., Subbarao, K. B., Davis, R. M. and Turini, T. A. 2003. Vegetals diseases caused by soil borne phatogens. ARN publication 8099: 1-13.
- Kox, L. F. F., van Brouwershaven, I. R., van de Vossenbergh, B. T. L. H., van den Beld, H. E., Bonants, P. J. M. and de Gruyter, J. 2007. Diagnostic Values and Utility of Immunological, Morphological, and Molecular Methods for In Planta Detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 97 (9): 1119-1129.

- Kyuchukova, M. A., Büttner, C., Gabler, J., Bar-Yosef, B., Grosch, R. and Kläring, H. P. 2006. Evaluation of a method for quantification of *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots at different temperatures and inoculum densities. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113 (3), S. 113–119.
- Laemmlen, F. 2001. Damping-off Diseases. University of California. Agricultural and Natural Resources. Publication 8041:1-4.
- Lévesque, C. A., Vrain, C. T., De Boer, S. H. 1994. Development of a Species-Specific Probe for *Pythium ultimum* Using Amplified Ribosomal DNA. *Phytopathology* 84 (5): 475-478.
- Lévesque, C. A. and De Cock, A. W. A. M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res.* 108 (12): 1363–1383.
- Martin, F. 1992a. *Pythium* Appendix A. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. Edit by: L. L. Singleton, J. D. Mihail, and C. M. Rush. APS PRESS. pp.255- 256.
- Martin, F. 1992b. *Pythium*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. Edit by: L. L. Singleton, J. D. Mihail, and C. M. Rush. APS PRESS. pp.39- 44.
- Narayanasami, P. 2011. Microbial Plant-Pathogens Detection and Diseases Diagnostics Fungal Pathogens. 2.1. 4.3. Immunodetection Technics for fungal pathogens. Springer Dordrecht Heilderberg London New York. Vol. 1 : 38-41.
- National Weather Service Forecast Office, San Juan- Puerto Rico, 2012.  
<http://www.nws.noaa.gov/climate/index.php?wfo=sju>
- Robideau, G. P., De Cock, A. W. a. M., Coffey, M. D., voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., De´ Saulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Chia-Hui hu, Kupper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B. and Le´ Vesque, C. A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11: 1002–1011.
- Schroeder, K. L., Okubara, P. A., Tambong, J. T., Lévesque, C. A. and Paulitz, T. C. 2006. Identification and Quantification of Pathogenic *Pythium* spp. from Soils in Eastern Washington Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 96 ( 6): 637-647.

- Sutton, J. C., Sopher, C. R., Owen-Going, T. N., Liu, W., Grodzinski, B., Hall, J. H., Renchimol, R. L. 2006 . Summa Phytopathol. Botucatu, 32 (4): 307-321.
- Utkhede, R. S., Lévesque, C. A. and Dinh, D. 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. Canadian Journal of Plant Pathology 22 (2): 138-144.
- Vallad, G. E., Stone, A. G., Goodman, R. M., Stevenson, W. R., and Cooperband, L. R. 2003. Paper mill sludge and compost effects on disease incidences in a vegetable rotation. <http://www.soils.wisc.edu/extension/wcmc/proceedings/5A.vallad.pdf>
- Van-Der Plaats-Niterink, A. J. 1981. *Pythium coloratum*. Monograph of the Genus *Pythium*. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn. pp 50-51.
- Vega-Jiménez, B. P. 2009. Etiología de la roya americana de la soya, *Phakopsora meibomia* arthur, en Puerto Rico. Tesis previa a la obtención del grado de Master en Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. pp. 44-47.
- Vincelli, P. C. and Lorbeer, J. W. 1990. Root rot of onion caused by *Pythium irregulare* and *Pythium coloratum*. Mycopathologia 111 : 67-72.
- Vincelli, P. and Tisserat, N. A. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied Plant Pathology. Plant Dis. Vol. 92 No.5:660-669.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. applied and Environmental Microbiology: 3741–3751.

## APÉNDICES

### RECETA PARA LA PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Las recetas de los medios de cultivo contienen las cantidades de cada uno de los ingredientes específicas para 1 L de agua destilada.

#### *Pythium spp.*

#### Apéndice 3.1

##### **PDA Potato Dextroza agar (Martin, F. 1992a)**

- Colocar 20 gr de Difco potato dextrose agar
- Colocar 1 litro de agua
- Mezclar los ingredientes y autoclavar
- Colocar 20 gotas de ácido láctico (10 ml/L ácido láctico)
- Colocar antibióticos: Pimaricin y Rifampicin.
  - Pimaricin 200 µl
  - Rifampicin 0,01 gr

**Rifampicin** M.W. = 822,96 (Fisher BioReagents Fair Lawn, New Jersey 07410, Lt. No. 053279, Cat No. BP2679250, Quantity 250 MG)

**Pimaricin** 2,5 % Aqueous suspensión M.W. = 665,7 (MP Biomedicals, LLC 29525 Fountain PKwy, Solon, Ohio 44139, Lt. No. 7568J, Cat No. 156254, L)

#### Apéndice 3.2

##### **Agar Agua (Martin, F. 1992a)**

- Colocar de 15 a 20 gr de Difco Bacto Agar
- Colocar 1 litro de agua
- Mezclar los ingredientes y autoclavar
- Colocar antibióticos: Pimaricin y Rifampicin.
  - Pimaricin 200 µl
  - Rifampicin 0,01 gr

**Rifampicin** M.W. = 822,96 (Fisher BioReagents Fair Lawn, New Jersey 07410, Lt. No. 053279, Cat No. BP2679250, Quantity 250 MG)

**Pimaricin** 2,5 % Aqueous suspensión M.W. = 665,7 (MP Biomedicals, LLC 29525 Fountain PKwy, Solon, Ohio 44139, Lt. No. 7568J, Cat No. 156254, L)

### **Apéndice 3.3**

#### **Medio de cultivo V8 clarificado (Martin, F. 1992a)**

- Colocar 350 ml de jugo vegetal V8
- Anadir 5 gr de  $\text{CaCO}_3$
- Centrifugar a 4000 rpm por 20 minutos
- Realizar la dilusion 1:4 con agua destilada o desionizada
- Colocar 20 gr de agar por litro
- Autoclavar
- Añadir pimaricina 10 mg l-1, vancomicina 200 mg l-1, pentanitroclorobenceno (PCNB) 100 mg.

### Apéndice 3.4

#### Diámetro promedio de 20 oogonias, oosporas, oosporas germinadas e hifas de

#### *Pythium dissotocum*

No de estructuras	Oogonias	Oosporas	Oosporas germinadas	Hifas
	Diámetro $\mu\text{m}$			Ancho $\mu\text{m}$
1	18.70	18.70	20.70	9.90
2	20.90	14.20	26.20	8.30
3	19.50	19.30	23.50	8.10
4	23.00	20.00	23.70	5.50
5	19.90	19.10	20.50	9.30
6	23.00	16.00	20.50	10.80
7	20.80	17.20	22.70	8.80
8	21.60	15.60	24.00	12.20
9	25.40	16.40	25.40	10.60
10	21.40	18.40	20.80	11.80
11	21.20	12.20	18.70	12.60
12	18.70	18.40	20.60	10.90
13	19.60	19.60	22.20	11.70
14	18.60	18.60	19.80	11.50
15	18.10	18.10	21.20	8.70
16	24.10	13.10	20.60	9.80
17	17.60	17.60	20.50	10.90
18	16.90	16.30	21.00	8.60
19	20.20	18.20	17.10	11.70
20	21.80	16.50	20.50	10.60
<b>Promedio</b>	<b>20.55</b>	<b>17.18</b>	<b>21.51</b>	<b>10.12</b>