



# UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,  
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

“Monitoreo por métodos moleculares de la  
bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae* en muestras de  
jitomate y chile en el estado de SLP”

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

**L.P. Verónica Zárate Chávez**

**ASESORES: Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
Dra. Diana Elinos Calderón**

## **Agradecimientos**

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por su asesoría y tiempo que dedico para que yo pudiera cumplir con esta meta, así como todas las facilidades para realizar los experimentos tanto en el laboratorio uno como en el LANBAMA.

A la Dra. Diana Elinos Calderón por su asesoría en el escrito de esta tesis.

Por su asesoría técnica en los experimentos al Biól. Salvador Ambríz Granados, QFB. Elvira Hernández Rico, Mireya Sánchez Garza y al Ing. Maximiliano Tenorio Valdez.

A los Ingenieros Juan Guillermo Moreno Chávez y Hugo Moreno Monsiváis de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Villa de Arista San Luis Potosí, y al Ing. Miguel Reyes Hernández de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Río Verde San Luis Potosí.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por las facilidades para realizar algunos experimentos en su laboratorio y sus recomendaciones.

A todos los estudiantes del Dr. Ángel Alpuche por sus valiosas sugerencias.

Al laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT).



## **Dedicatoria**

A Dios por darme salud y una familia y permitirme terminar esta tesis.

A mi esposo Salvador el amor de mi vida, por todo ese amor y comprensión que me ha dado durante estos veinticuatro años de casados, él me ha demostrado qué si existe el amor y que este supera todos los obstáculos, te amo Salvador, gracias por toda esa paciencia que sólo puede dar un gran ser humano como tú.

A mis hijos Josué Salvador y Cynthia Citlalli por toda su paciencia que me han tenido durante la carrera. Gracias por venir a darme el orgullo de ser madre, lo amos tal como son.

A mis hermanos, Irma, Irineo, Avelina, Gerardo, Silvia, Luz, Isabel, Rene y Juana que a pesar de las adversidades seguimos juntos porque somos una familia y nunca nos abandonaremos, seguiremos siendo una familia de locos felices. Gracias por darme sobrinos maravillosos.

*“Hay una fuerza más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica:*

*La voluntad”.*

*Albert Einstein*

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	5
<b>2. Introducción</b>	5
<b>3. Marco teórico</b>	7
<b>3.1. Enfermedades en plantas ocasionadas por "<i>Candidatus Liberibacter</i>"</b>	9
<b>3.1.1. Huanglongbing (HLB)</b>	9
<b>3.2. Métodos de diagnóstico de enfermedades en plantas</b>	10
<b>3.2.1. Métodos microbiológicos e inmunológicos</b>	11
<b>3.2.2. Método bioquímico</b>	11
<b>3.2.3 Métodos moleculares PCR</b>	12
<b>3.3. Fundamentación</b>	12
<b>3.3.1. Justificación</b>	14
<b>4. Hipótesis</b>	16
<b>5. Objetivos</b>	16
<b>5.1. Objetivo general</b>	16
<b>5.2. Objetivos específicos</b>	16
<b>6. Metas</b>	16
<b>7. Diagrama de flujo del trabajo experimental</b>	17
<b>8. Cronograma y recursos</b>	18
<b>9. Metodología</b>	19
<b>9.1. Colecta de material vegetal</b>	19
<b>9.2. Extracción de ADN</b>	19
<b>9.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	20
<b>9.3.1 Amplificación del ADN en termociclador</b>	20
<b>9.3.2 Mezcla de reacción de PCR</b>	21
<b>9.3.3 Programa en termociclador Applied Biosystems</b>	21
<b>9.3.4 Electroforesis</b>	21
<b>9.4. Clonación de muestras positivas a CLPs en PCR</b>	22
<b>9.4.1. Reacción de ligación</b>	22
<b>9.5. Transformación por choque térmico de bacterias <i>E. coli</i> (Top-10F)</b>	23



<b>9.6. Minipreparación de ADN plasmídico método de Birnboim</b>	23
<b>8.7 Digestión del ADN</b>	24
<b>9.8 Secuenciación</b>	24
<b>10. Resultados</b>	25
<b>10.1 Colecta de material vegetal e insecto vector</b>	25
<b>10.2 Condiciones óptimas para la extracción de ADN</b>	26
<b>10.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	29
<b>10.4 Resultados de secuenciación</b>	36
<b>11. Análisis de resultados</b>	39
<b>12. Perspectivas de alcance del proyecto a nivel nacional o estado</b>	40
<b>13. Conclusiones</b>	40
<b>14. Bibliografía</b>	41



## 1. Resumen

San Luis Potosí ocupa el segundo lugar en la producción nacional de jitomate *Solanum lycopersicum*, así como el cuarto lugar en la producción de chile *Capcicum annum*. Esto hace que sean las hortalizas de mayor importancia en este estado.

Estos cultivos y otras solanáceas se ven afectados por patógenos de plantas (fitopatógenos) e insectos vectores que les transmiten enfermedades, como la causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllaurous* transmitida por el vector perteneciente a los psílidos: *Bactericera cockerelli*. Por otro lado, al ser una bacteria que invade floema, es difícil controlarla con métodos convencionales como antibióticos y sales de cobre.

Una de las desventajas para el estudio de este género de bacterias es que no ha sido posible mantenerlas en cultivo, por lo tanto, una de las opciones para poder detectar dicha bacteria en plantas es por medio de métodos moleculares basados en la extracción y amplificación del ADN, como es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En este trabajo se analizarán muestras de chile y tomate procedentes de diferentes regiones del estado de San Luis Potosí para detectar *Candidatus Liberibacter psyllaurous* por técnicas moleculares.

### Palabras clave

PCR, *Candidatus Liberibacter psyllaurous*, fitopatógenos, *Bactericera cockerelli* y técnicas moleculares.

## 2. Introducción

Una de las actividades agrícolas de mayor importancia económica en nuestro país es el cultivo del jitomate y chile; en el estado de San Luis Potosí los municipios que tienen la mayor producción de estas hortalizas son los ubicados en la región



del altiplano (Villa de Arista, Moctezuma, Villa de Guadalupe, y Cedral) y la zona media, (Río Verde y Cd. Fernández) (Monreal-Vargas, 2005).

Los principales problemas que limitan la producción de estas hortalizas son las enfermedades causadas por fitoplasmas, hongos, virus y bacterias, y estos problemas pueden disminuirse a través del diagnóstico preciso y oportuno para controlar la propagación de estos patógenos.

Una de las alternativas más modernas para detectar estos patógenos son los métodos moleculares los cuales son precisos, reproducibles y rápidos ya que se puede detectar la presencia del patógeno en plantas aún sin que esta tenga síntomas visibles.

Una de las técnicas moleculares más utilizadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual se basa en la amplificación de secuencias específicas del material genético de los patógenos, esta técnica se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico, diferenciación y determinación cuantitativa de virus, hongos, bacterias y fitoplasmas que atacan a las plantas (Monreal, 2005).

En el estado de San Luis Potosí, que es un productor importante de tomate y chile no existía hasta antes del año 2000 ningún laboratorio o centro de investigación que realizara diagnósticos fitopatológicos por métodos moleculares en plantas (Monreal, 2005).

En el año 2005 en el trabajo de tesis de maestría realizado por la QBP. Clara Teresa Monreal en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (IPICYT), asesorada por sus directores de tesis Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, se identificaron algunos patógenos en plantas en el estado de San Luis Potosí por métodos moleculares, entre estos, bacterias fitopatógenas de importancia agrícola en tomate y chile como fueron *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*. En este trabajo no se detectaron por métodos moleculares otras bacterias como *Candidatus Liberibacter psyllaurous* ya sea



porque no se sabía de su existencia, o la sintomatología se atribuía a otros patógenos o todavía no se encontraba este patógeno en estas zonas.

La propagación de bacterias fitopatógenas en plantas ha aumentado debido al comercio internacional, la globalización, el cambio climático, la intensificación de la agricultura, y esto ha favorecido la llegada de nuevas bacterias que son patógenas a plantas. En este trabajo se tratará de identificar si está presente en algunos municipios del estado de San Luis Potosí una nueva especie de bacteria *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L. psyllaourous*), la cual afecta a solanáceas; esta bacteria fue reportada en el año 2009 por primera vez en México en cultivos cercanos a la ciudad de Saltillo (Munyaneza et al., 2009).

### **3. Marco teórico**

Los principales problemas que limitan la producción agrícola son las enfermedades causadas por fitoplasmas, hongos, virus y bacterias, los problemas pueden disminuirse a través de diagnósticos precisos y oportunos, utilizando técnicas nuevas modernas como lo son los métodos moleculares para así poder diagnosticar oportunamente y controlar la propagación oportuna de estos patógenos.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las más utilizadas en la biología molecular ya que por medio de ésta se amplifica exponencialmente un fragmento específico de ADN a partir de una cadena molde. Para tener éxito en esta técnica es de suma importancia el diseño de los oligonucleótidos o cebadores, así como la estandarización de la técnica basada en las concentraciones de ADN molde, cofactores, enzima polimerasa y temperatura (Henson y French, 1993).

La detección de patógenos por medio de la PCR se basa en la amplificación de secuencias específicas del material genético del patógenos, esta técnica se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico, diferenciación y determinación



cuantitativa de virus, hongos, bacterias y fitoplasmas que atacan a las plantas (Monreal, 2005).

La secuenciación de ADN es el proceso para determinar el orden exacto de los nucleótidos en una molécula de ADN, es decir la secuenciación es conocer el orden de las bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina y timina en un fragmento de ADN. Para secuenciar las muestras que dieron positivo en PCR se utilizará el método de Sanger también llamado cadena terminal (Sanger et al., 1977).

El método de Sanger es uno de los métodos más utilizados para secuenciar fragmentos de ADN, para llevar a cabo este método, se requiere ADN molde de cadena sencilla, un oligo, ADN polimerasa, dNTPs y una versión de ddNTPs, nucleótidos marcados con fluorescencia (Sanger et al., 1977).

Estos ddNTPs terminan la elongación de la cadena al carecer del grupo 3'-OH produciendo varios fragmentos de ADN de diferentes longitudes.

Los ddNTPs no tienen grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar de este modo el ADN polimerasa no puede enlazar otro nucleótido dNTPs por que le falta el grupo hidroxilo.

En un nucleótido normal, el grupo hidroxilo 3' actúa como un "gancho" que permite que un nuevo nucleótido se añada por medio de una enzima ADN polimerasa, a una cadena existente, una vez que se añade a la cadena un nucleótido dideoxi, ya no hay un hidroxilo sobre el que se puedan agregar más nucleótidos y la cadena termina con el nucleótido dideoxi, que está marcado. Todo este proceso se lleva a cabo en un equipo que maneja diferentes temperaturas de manera estable (termociclador), para abrir el ADN (94°C), para la alineación de los oligonucleótidos (cerca de 55°C) y para la extensión de las cadenas de ADN que se copian (72°C), lo cual se conoce como una reacción de PCR, al terminar se realiza la purificación de los fragmentos para eliminar los ddNTPs oligo y dNTPs que no se incorporaron, para después llevar la muestra a un secuenciador automatizado y hacer la electroforesis capilar. En ésta migran primero los



fragmentos más pequeños seguidos de los más largos a través de un capilar llenado con un polímero, al final un láser detecta las diferentes longitudes de onda de los ddNTPs marcados enviando la señal a una computadora y genera un electroferograma (Reguero, 2014).

### **3.1. Enfermedades en plantas ocasionadas por "*Candidatus Liberibacter*"**

El control de plagas y enfermedades en plantas es una problemática a la cual se enfrentan todos los agricultores, debido a los gastos que se generan al tratar de controlarlos y a las pérdidas en la producción; este tema es muy complejo debido a la gran variedad de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos.

Enfermedades ocasionadas por virus, hongos, fitoplasmas, nematodos y bacterias son comunes en los cultivos, aunado a esto debido a la globalización, cambio climático y a la intensificación de la agricultura han surgido nuevas enfermedades o bien estas no se conocían debido a que no se tenían las herramientas biotecnológicas para la detección de éstas. Una enfermedad devastadora es Huanglongbing (HLB) enfermedad que se encuentra en los cítricos, causada por una bacteria que pertenece al género *Candidatus Liberibacter* no cultivable con restricción de floema de la planta hospedera, la cual está vectorizada por dos especies de psílicos, *Diaphorina citri* Kuwamaya y *Trioza erytrae*, se ha reportado una nueva especie *Candidatus Liberibacter* que afecta a hortalizas como tomate y papa la cual está vectorizada por la especie psílida *Bactericera cockerelli* (Hansen et al., 2008).

#### **3.1.1. Huanglongbing (HLB)**

Esta enfermedad también es conocida como "enverdecimiento de los cítricos", es causada por una bacteria no cultivable que pertenece al género *Candidatus Liberibacter* restringida al floema de la planta hospedera, es considerada la más destructiva de las especies de cítricos en el mundo, y hasta el momento no se conoce cura para los árboles infectados, actualmente amenaza la existencia de



la industria de los cítricos, esta bacteria se distribuye en el floema de la planta, causa retraso del crecimiento de plantas en desarrollo, con brotes amarillentos y hojas moteadas manchadas, fruta pequeña con poco color con desprendimiento del árbol prematuramente, engrosamiento de nervaduras y aborto de semilla, (Sechler et al., 2009). Tres especies de *Candidatus Liberibacter* han sido descritas como causa de HLB en diferentes países, *Candidatus asiaticus*, *Candidatus africanus* y *Candidatus americanus* (Hansen et al., 2008).

La primera detección en México de HLB se realizó en julio de 2009, en Tizimín, Yucatán, En febrero 2015, 23 de los 25 estados que integran la citricultura nacional confirmaron la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles y principalmente en vectores (Flores et al., 2015).

### **3.2. Métodos de diagnóstico de enfermedades en plantas**

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el agricultor es al diagnóstico de enfermedades en las plantas, este es la base para un buen manejo del patógeno, un buen método de diagnóstico permite tomar decisiones apropiadas a los agricultores para enfrentarlas; hacer un diagnóstico de forma inadecuada puede ocasionar pérdidas económicas considerables.

Las enfermedades en plantas son principalmente causadas por virus, bacterias, hongos, fitoplasmas nematodos y bacterias, estas enfermedades es una interacción entre un patógeno que puede ser transmitido por un vector, un hospedante y el medio ambiente, las enfermedades causa en los hospedantes cambios anormales de tipo fisiológico y morfológico. Existen aproximadamente 350,000 especies de plantas, de las cuales unas 3,000 son empleadas como alimento por los humanos, constituyendo el 99% de suministro de su alimento. De éstas, solo 300 especies son ampliamente cultivadas y solo 11 cultivos: arroz, maíz, trigo, sorgo, caña de azúcar, papa, yuca, frijol, patata, banano y coco, constituyen el 95% del suministro de alimentos a la humanidad (Guzmán, 2009).



El primer paso para la detección de una enfermedad en plantas es la observación, la cual se hace desde el análisis del medio ambiente, es decir en que época del año surge, o bien si existe alguna plaga o algún insecto en el cultivo; observar la sintomatología de la planta y en qué etapa de esta se presenta más, cabe mencionar que también es importante que se observe el suelo y los cultivos cercanos, el agua con el cual se está regando, si ha habido cambios en el riego, en la aplicación de nutrientes.

### **3.2.1. Métodos microbiológicos e inmunológicos**

Uno de los métodos tradicionales para la detección de hongos y bacterias son los de identificación a partir de aislamientos en medios sintéticos selectivos o semi-selectivos, este se basa en el aislamiento a partir de material vegetal afectado en medios selectivos o semi-selectivos, tomando en cuenta requerimientos nutricionales básicos de algunos patógenos; en el caso de los virus los métodos de detección se han basado en la utilización de injertos con variedades vegetales susceptibles al patógeno o indexación o bien observación de alteraciones como malformaciones, amarillamiento o mosaico; también existen métodos comerciales como los kits, ensayos inmunodiagnósticos y las pruebas de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) (Respetro y Vargas, 2007).

### **3.2.2. Método bioquímico**

Existen en el mercado tecnologías patentadas como la de Biolog que en base a la "Utilización de fuente de Carbono" y una reacción colorimétrica del colorante tetrazolio violeta, pueden producir un patrón característico (o huella). Cuando un microorganismo se introduce a una gran variedad de fuentes de carbono pre-seleccionados en una microplaca empieza a utilizar la fuente de carbono para llevar a cabo sus procesos metabólicos y respiratorios. Mientras respira reduce el tetrazolio de estado oxidado a estado reducido y se produce un patrón



característico o “huella digital” que es analizado en un software para sugerir la especie del microorganismo (Hernández, 2004).

### **3.2.3 Métodos moleculares PCR**

La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica molecular moderna y confiable que permite identificar patógenos con casi un 100% de confiabilidad, además permite desarrollar formas de clasificación de estos patógenos basándose en la composición de su genoma. La PCR permite amplificar a gran escala regiones específicas del ADN del patógeno y facilita la manipulación posterior de los fragmentos amplificados (Hernández, 2004).

La PCR amplifica exponencialmente secuencias de ADN específicas mediante síntesis de ADN *in vitro*, esta incluye tres pasos esenciales, la desnaturalización de la cadena de ADN molde, alineación de dos cebadores oligonucleótidos a las cadenas de ADN desnaturalizadas, y la extensión del cebador por una ADN polimerasa termoestable. Las cadenas de ADN recién sintetizadas sirven como dianas para la síntesis subsiguiente de ADN, ya que los tres pasos se repiten de unas 20 a 35 veces. La especificidad del método se deriva de los cebadores oligonucleotídicos sintéticos, que forman un par de bases y definen cada extremo de la secuencia diana a amplificar. La PCR ofrece varias ventajas en comparación con los métodos de diagnóstico más tradicionales ya que los organismos no necesitan ser cultivados antes de su detección por PCR; es una técnica muy sensible ampliamente utilizada en el diagnóstico de enfermedades de plantas (Henson y French, 1993).

### **3.3. Fundamentación**

Anteriormente síntomas en plantas enfermas con *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L.*) se atribuían a virus, insectos o fitoplasmas, pero gracias a las técnicas moleculares se ha descubierto que, aunque tiene una forma de vida parecida a la de los fitoplasmas no están relacionado taxonómicamente ya que los fitoplasmas



son bacterias Gram positivas. *Ca. L.* es transmitido por psílicos parásitos de plantas e insectos, y las bacterias se alimentan del floema de las plantas, *Ca. L.* es capaz de multiplicarse en las células eucariotas de las plantas o de los psílicos siendo un parásito intracelular (Casteel et al., 2012).

En la actualidad se han descrito ocho especies de *Liberibacter* las cuales son *Candidatus Liberibacter africanus* (*Ca. L. af*), *Candidatus Liberibacter americanus* (*Ca. L. am*) y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca. L. as*) que causan el "Huanglongbing" (HLB) o citrus greening en cítricos; *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*Ca. L. so*) que afecta a solanáceas y apiáceas y *Candidatus Liberibacter caribbeanus* (*Ca. L. ca*), *Candidatus Liberibacter europeus* (*Ca. L. eu*) y *Candidatus Liberibacter brunswickensis* (*Ca. L. br*), asociadas a cítricos, peral y psílicos de berenjena y otras solanáceas, respectivamente, ninguna de estas tres últimas especies se ha comprobado que produzcan enfermedad en los cultivos en los que se ha encontrado, finalmente, *Liberibacter crescens* (*L. cr*), asociada a papaya de montaña, es la única especie que puede crecer en medio de cultivo axénico, ésta no ha sido identificada como patógena de plantas, por lo cual se ha utilizado como modelos de investigación (Palomo et al., 2017).

Mediante estudios realizados a psílicos *Bactericera cockerelli* se comprobó que el insecto es portador de la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllaourous*; ésta se trasmite tanto horizontalmente de planta a planta utilizando al psílido como vector así como verticalmente mediante transmisión transovárica, esta capacidad que tiene la bacteria tiene implicaciones epidemiológicas importantes ya que permite su transmisión a cultivos en la siguiente temporada (Casteel et al., 2012).

En México se documentó la presencia del psílido *Bactericera cockerelli* que afecta a solanáceas desde 1947, en Durango, Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas; a partir de los 70 esta especie ha sido una plaga primaria de la papa, chile y tomate. *Bactericera cockerelli* ocasiona daños directos a la planta al succionar la savia. En el estado de Guanajuato disminuyó el 60% de la producción de jitomate en los 90s. En los años siguientes la superficie cultivada



se redujo 85%. En San Luis Potosí se ha comportado como plaga primaria de los cultivos de chile y jitomate (Vega et al. 2008).

En los estados de Coahuila y San Luis Potosí es común que se realicen hasta doce aplicaciones de insecticidas durante la temporada de cultivo de jitomate y papa y se desconoce el estado de la susceptibilidad a dichos agroquímicos. Los productores de jitomate y papa de San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León han manifestado preocupación por la falta de control de *B. cockerelli* (Vega et al., 2008).

La mayoría de las bacterias patógenas de plantas son Gram negativas como es el caso de *Candidatus Liberibacter psyllauros* que también es conocida como *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Casteel et al., 2012).

El primero hospedero registrado con *Candidatus Liberibacter solanacearum* fue en papa, en la cual causa severos daños; después del 2008 se han registrado nuevos hospederos de esta bacteria principalmente en solanáceas, entre los que destaca el tomate en el cual produce síntomas como enrollamiento y clorosis apical de folíolos, oscurecimiento de las venas, moteado, reducción del tamaño de las plantas, y en algunas variedades desarrollo deforme de los frutos (Casteel et al., 2012).

Los síntomas que produce en plantas de chile *Candidatus Liberibacter solanacearum* son muy parecidos a los de algunos geminivirus ya que la planta presenta deformación en hojas jóvenes, clorosis, enchinado y prominencia, conforme progresa la infección en la hoja la deformación es más prominente hacia el ápice, así como malformación en el nervio principal.

### **3.3.1. Justificación**

Huanglongbing (HLB) es una enfermedad devastadora en los cítricos causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. que es transmitida por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Ku-wamaya y *Trioza erytrae*, esta plaga está distribuida prácticamente en todas las zonas citrícolas de México.



Este género de bacterias Gram-negativas, se componía de tres especies *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus*. En el 2008 se descubrió una nueva especie *Candidatus Liberibacter psyllaourous* la cual afecta a solanáceas (Hansen et al., 2008). Pero ahora se conocen ochos especies más.

En el 2009 se dio el primer reporte en México de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* que afectaba a la papa (*Solanum tuberosum* L.) en cultivos establecidos cerca de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México (Munyaneza et al., 2009). Esta enfermedad se caracteriza por un patrón rayado en forma de estrella resultado de la necrosis en los tubérculos producidos en las plantas infectadas que causando pérdidas económicas en la agricultura.

Conociendo los graves daños que ocasiona ha cítricos este género de bacteria y saber que la especie *psyllaourous* afecta severamente a solanáceas como la papa, es de suma importancia monitorear y conocer la situación en que se encuentra zonas de importancia agrícola en el estado de San Luis Potosí, el cual ocupa un lugar importante en la producción de solanáceas como tomate y chile a nivel nacional, para que el agricultor tome las medidas necesarias y controlar al vector que causa esta enfermedad.

En este trabajo se analizarán muestras de tomate y chile de diferentes zonas del estado de San Luis Potosí, de las cuales se realizará extracción de ácidos nucleicos para posteriormente realizar la técnica de PCR y lograr detectar si es el caso, la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, y así, poder apoyar a los agricultores de esta zona para que se tomen medidas necesarias para la prevención y control de dicha bacteria.

Si se logran obtener muestras positivas por medio de la técnica de PCR se procederá a secuenciar el producto de PCR para corroborar que efectivamente es *Candidatus Liberibacter psyllaourous* y las posibles variantes de la bacteria.

#### **4. Hipótesis**

Es posible detectar por métodos moleculares a *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en cultivos de jitomate y chile infectados, ubicados en zonas agrícolas en el estado de San Luis Potosí.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. Objetivo general**

Detectar por medio de técnicas moleculares la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en cultivos de importancia de chile y jitomate del estado de San Luis Potosí.

##### **5.2. Objetivos específicos**

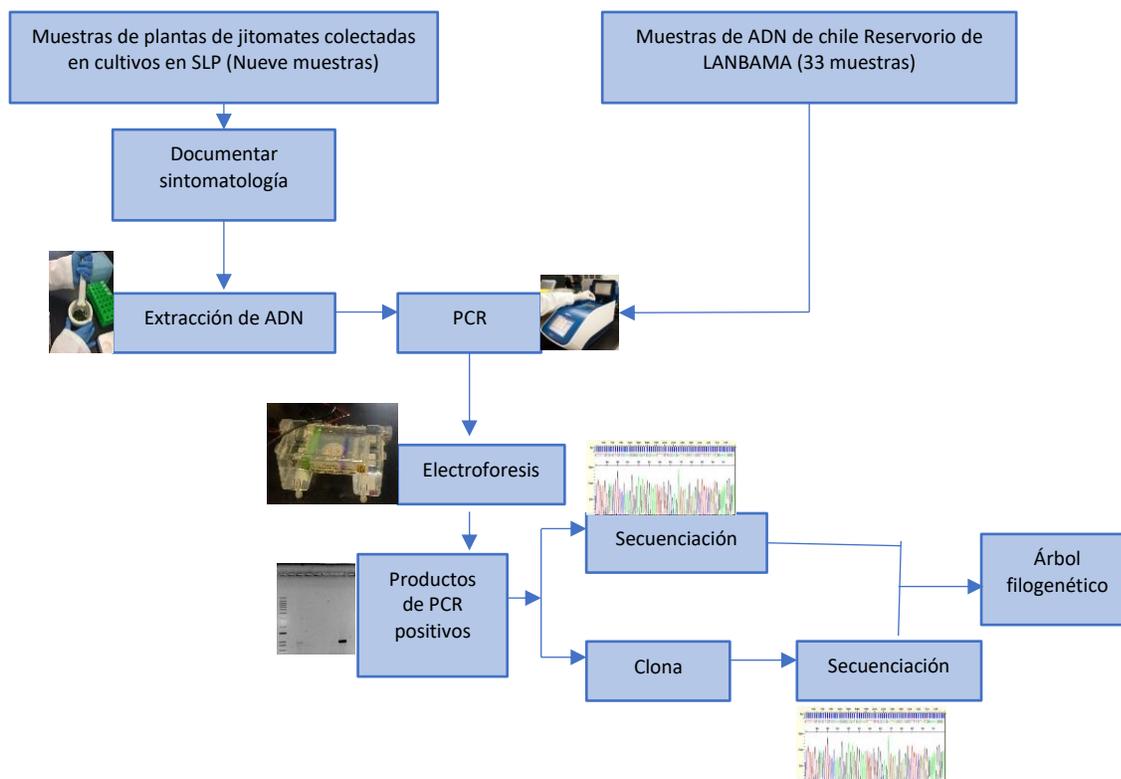
- 1.- Documentar la sintomatología de muestras de jitomate y chile presuntamente infectadas con *Candidatus Liberibacter psyllaourous*.
- 2.- Establecer las condiciones óptimas de extracción de ADN de muestras de jitomate y chile y el vector *Bactericera cockerelli*.
- 3.- Establecer las condiciones óptimas de la mezcla de reacción de la técnica de PCR que logren identificar con reproducibilidad la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* en cultivos de interés de jitomate y chile en el estado de San Luis Potosí.
- 4.- Obtener la secuencia y posible árbol filogenético de las cepas de *Candidatus Liberibacter psyllaourous* aisladas en la región.

#### **6. Metas**

- 1.- Contar con fotografías de síntomas en plantas presuntamente enfermas de *Candidatus Liberibacter psyllaourous*.
- 2.- Contar con un método estandarizado de extracción de ADN de buena calidad.
- 3.- Contar con un método estandarizado de PCR.

4.- Contar con al menos diez muestras positivas y secuencia de *Candidatus Liberibacter psyllae*.

## 7. Diagrama de flujo del trabajo experimental



## 8. Cronograma y recursos

Cronograma proyecto terminal I y II														
Actividad	Recursos				2018				2019					
	Materiales	Equipo	Accesorios	Reactivos	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	
Redacción del protocolo de tesis	Material bibliográfico	Computadora	NA	NA										
Recepción y almacenamiento de muestras de plantas para detección de fitopatógenos y seleccionar la que tengan síntomas visibles de <i>Candidatus Liberibacter psyllauros</i>	Marcadores y recipientes de almacenamiento de muestras	Ultracongelador	NA	NA										
Extracción de ADN de plantas de tomate y chile que tengan síntomas visibles de <i>Candidatus Liberibacter psyllauros</i>	Mortero, bisturí, pinzas, pizetas, servitoallas, puntas de diferentes medidas para micropipetas, tubos de 1.5 mL	Balanza analítica, termoblock, campana de flujo laminar, centrífuga, congelador y refrigerador	Micropipetas	Buffer de extracción, etanol, mercaptoetanol, fenol, cloroformo, isopropanol, etanol al 70%, RNase										
Verificar la calidad de la extracción del ADN y realizar el PCR	servitoallas, puntas de diferentes medidas para micropipetas, tubos de 1.5 mL, 0.2 mL y de 0.6 mL	Cámara de electroforesis, fuente de poder, fotodocumentador, centrifugas, termociclador, espectrofotómetro, congelador y refrigerador	Micropipetas	Taq polimerasa, DNTP's, MgCl <sub>2</sub> , oligos, Buffer TAE, Bromuro de etidio, marcador de peso molecular, agarosa										



Secuenciación de las muestras que hayan dado positivo a <i>Candidatus Liberibacter psyllae</i> , árbol filogenético y redacción de conclusiones y resultados	Puntas para micropipetas y tubos de 1.5 mL y 0.6 mL, placas de 96 pozos	Secuenciador, centrifuga, Espectrofotómetro, termociclador, concentrador, computadora, congelador y refrigerador	Micropipetas, c apilares	Química de secuenciación, oligos, formamida, POP, Buffers, reactivos de purificación									
--	---	--	-----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

## 9. Metodología

### 9.1. Colecta de material vegetal

Se seleccionaron 33 muestras de ADN de chile y del insecto vector del reservorio de LANBAMA, y adicionalmente se realizó colecta de material en diferentes zonas agrícolas del estado de San Luis Potosí, basados en la sintomatología descrita en la literatura y con el apoyo del personal de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Rio Verde y Villa de Arista, SLP. Se lava una las manos con etanol entre cada muestreo para evitar contaminación cruzada.

### 9.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las plantas se utilizará el protocolo de Dellaporta (Dellaporta et al., 1983) modificado, en donde se utiliza buffer de extracción el cual contiene D-sorbitol 0.14 M, Tris HCL pH 8, 0.22 mM, EDTA pH 8, 0.022 mM, NaCl 0.8 M, CTAB 0.8%, N-Lauryl Sarcosina 1%, PVP 1%, β Mercaptoetanol 0.2% para después hacer lavados con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), y ser tratado con RNasa 10mg/mL.

Protocolo extracción de ADN de tejido vegetal



1. Pesar aproximadamente 0.5 g de tejido vegetal, moler en mortero el tejido vegetal con 500  $\mu$ L de buffer de extracción, si el macerado está muy seco agregar 500  $\mu$ L más de buffer de extracción, coleccionar el líquido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y mezclar en vórtex, incubar a 65 °C por 40 min (agitar cada 10 min en vórtex) Centrifugar 2 min a 13,000 rpm, coleccionar la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL, agregar un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar con vórtex y centrifugar 10 min aproximadamente a 13,000 rpm y observar que se hayan formado dos fases. Separar la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo de 1.5 mL, agregar un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar con vórtex y centrifugar 10 min aproximadamente a 13,000 rpm y observar que se hayan formado dos fases, separar la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo de 1.5 mL. Agregar 2  $\mu$ L de RNAsa 10 mg/mL y mezclar manualmente. Dejar a temperatura ambiente por 20 minutos.

Precipitar el DNA con un volumen igual de isopropanol frío y mezclar por inversión, dejar la muestra en hielo por 5 minutos, centrifugar por 10 min aproximadamente a 13,000 rpm y eliminar el sobrenadante (verterlo en un recipiente). Lavar la pastilla con 300  $\mu$ L de etanol 70%, centrifugar por 5 min a 13,000 rpm y eliminar el etanol, dejar secar a temperatura ambiente invirtiendo los tubos y resuspender con 100  $\mu$ L de agua Milli "Q", cuantificar el ADN obtenido en un espectrofotómetro Noanodrop y almacenar la muestra a -20°C.

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

#### **9.3.1 Amplificación del ADN en termociclador**

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron las condiciones de PCR de (Hansen et al. 2008) utilizando los oligos Lp Frag 4-(1611F) y LP Frag 4-(480R) consecuencias GGTTGATGGGGTCATTTGAGyCACGGTACTGGTTC ACTATC respectivamente (5´-3´), los cuales amplifican en la región 16S rRNA-

ISR-partial 23S RNA de *Ca. L. solanacearum*. Se contará con un control positivo que nos permitirá LANBAMA para validar los ensayos de PCR.

### 9.3.2 Mezcla de reacción de PCR

Reactivo	Concentración final
Buffer de reacción	1X
dNTPs	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Oligo Lp Frag 4-(1611F)	0.25 µM
Oligo LP Frag 4-(480R)	0.25 µM
Taq polimerasae 2 U/µL	1 U
ADN	100 ng

### 9.3.3 Programa en termociclador Applied Biosystems

Pasos	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	35
Hibridación	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	90 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

### 9.3.4 Electroforesis

La electroforesis se realizará para separar las moléculas de ADN a analizar de acuerdo a su peso molecular, la separación de ADN se lleva a cabo en una matriz sólida que es un gel de agarosa. En la cámara de electroforesis se genera un campo eléctrico por una fuente de poder y el ADN está cargado negativamente, entonces el ADN se desplaza hacia el polo positivo. La concentración del gel de agarosa depende del tamaño esperado de la banda, para bandas pequeñas entre



100 y 250 pb se requieren geles a una concentración de 2 al 3 %, para bandas entre 500 y 700 pb con un gel de agarosa a una concentración de 0.8 al 1 % es suficiente. Para la determinación del peso molecular de la muestra se utiliza un marcador de peso molecular estándar de ADN, en este caso se utilizará el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder que es ideal para la separación en geles de agarosa a una concentración de 0.8 – 1%.

Los buffers de carga facilitan la visualización y sedimentación del producto de PCR o de ácidos nucleicos en los pozos del gel, para la preparación de estos se emplean distintos tipos de colorantes, para este trabajo se utilizará un buffer de carga mixto el cual contiene azul de bromofenol, Xilene cianol y glicerol 6X. El gel es teñido con Bromuro de etidio con el cual se intercala la doble cadena de ADN y puede ser visible a través de luz ultravioleta.

#### **9.4. Clonación de muestras positivas a CLPs en PCR**

Los productos de PCR que dieron positivos, se clonaron el mismo día en vector de clonación comercial pGEM-T Easy de marca Promega de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

##### **9.4.1. Reacción de ligación**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>
H <sub>2</sub> O	1 µL
DNA	100 ng
Buffer (2X)	1X
pGEM-T Easy	50 ng
T4 DNA Ligasa	3 U
Volumen final	10 µL

Incubar durante 12 h a 4°C

### **9.5. Transformación por choque térmico de bacterias *E. coli* (Top-10F)**

Para este paso se utilizaron cepas bacterianas calcio competentes proporcionadas por el laboratorio 1 de plantas del IPICYT, donadas por el Biol Salvador Ambriz.

Procedimiento

1. Descongelar las células competentes durante 5 a 10 min en hielo.
2. Adicionar a las células competentes 5  $\mu$ L de la ligación y mezclar
3. Reposar en hielo durante 20 min.
4. Transferir los tubos a 42°C e incubar durante 90 s.
5. Transferir rápidamente a hielo y reposar durante 10 min.
6. Agregar 250  $\mu$ L de medio Luria Bertani (LB) (sin antibiótico).
7. Incubar a 37 °C durante 45 min, en agitación constante a 600 rpm.
8. Preparar cajas Petri con LB/Carbenicilina (Cb) a 1mg/mL, adicionando IPTG 0.952 mg/placa y Xgal a 0.6 mg/placa, distribuir perfectamente en toda la placa, hasta que se seque.
9. Sembrar 290  $\mu$ L de células, distribuir sobre el medio LB perfectamente hasta que se sequen.
10. Incubar a 37°C por 12 h.

### **9.6. Minipreparación de ADN plasmídico método de Birnboim**

- 1.-Incubar una colonia en 3 mL de LB líquido con Cb a 1mg/mL, durante 24 h a 37°C.
- 2.-Centrifugar a 8,000 rpm por 3 min y desechar sobrenadante y secar.
- 4.- Resuspender pastilla en 100  $\mu$ L de solución Birnboim 1 (Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) y mazclar.
- 5.- Agregar 200  $\mu$ L de solución Birnboim 2 (NaOH 0.2 M y SDS 1%) mezclar.
- 6.- Agragar 150  $\mu$ L de solución de Birnboim 3 (acetato de potasio 3 M y ácido acético glacial) mezclar.



- 7.- Incubar en hielo por 3 min
- 8.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min y transferir sobrenadante a tubos nuevos.
- 9.- Agrar 7  $\mu$ L de RNasa (2 mg/ mL) e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- 10.- Agragar 900  $\mu$ L de etanol absoluto y 45  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M
- 11.- Mezclar por inversión.
- 12.- Reposar en hielo durante 3 min.
- 13.- Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min.
- 14.- Lavar con 500  $\mu$ L de etanol al 70% y centrifugar a 13,000 rpm por 3 min.
- 15.- Secar por inversión y resuspender pastilla en 50  $\mu$ L de TE (Tris 1 M pH 8.0 y EDTA (0.5 M pH 8.0).

### 8.7 Digestión del ADN

Reactivo	Concentración
ADN	300 ng
H <sub>2</sub> O	----
Buffer de reacción	1X
<i>Eco RI</i>	10 U
Volumen total	15 $\mu$ l

Incubar a 37°C durante 2 h

### 9.8 Secuenciación

Para la secuenciación se utilizó el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems y el equipo de secuenciación 3500 Series Genetic Analyzers de Applied Biosystems.

Preparación del templado

Reactivo	Concentración
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	8 $\mu$ L
Oligonucleótido	3.2 pmol

DNA	50 ng
Volumen final	20 $\mu$ L

Ciclo de secuenciación

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C	1 min	1
96°C	10 s	25
50°C	5 s	
60°C	4 s	

## 10. Resultados

### 10.1 Colecta de material vegetal e insecto vector

La colecta que se llevó a cabo en diferentes zonas del estado de San Luis Potosí y se contó con el apoyo del personal de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Rioverde y Villa de Arista. En la Tabla 1 se detallan las muestras colectadas tanto por LANBAMA como en la visita a diversos municipios de SLP.

**Tabla 1. Número de muestras procesadas en este trabajo.**

Total de muestras procesadas					
Procedencia	Vector (paratrío)	Muestras de chile	Muestras de jitomate	Huevecillos del insecto vector	Total
<b>LANBAMA colectadas en Villa de Arista, SLP</b>	2	31	0	0	33
<b>Ciudad Fernández, SLP</b>	0	0	3	1	4

<b>Rio verde, SLP</b>	0	0	1	0	1
<b>Moctezuma, SLP</b>	0	0	1	0	1
<b>Villa de Arista, SLP</b>	1	0	1	0	2
<b>Bocas, SLP</b>	0	0	1	0	1

En las Fig. 1 podemos observar la sintomatología de la planta infectada por el vector paratrioza y en la Fig. 2 el insecto colectado.



**Figura 1.** Planta de tomate enferma con sintomatología causada por *Bactericera cockerelli* (Paratrioza).



**Figura 2.** Vector capturado: *Bactericera cockerelli* (Paratrioza). Colectada de trampa para insectos.

Durante la colecta se seleccionaron muestras con síntomas de la enfermedad y que en el cultivo estuviese presente le vector.

## 10.2 Condiciones óptimas para la extracción de ADN

En la Tabla 2 se detallan los componentes utilizados en el tampón de extracción de ADN genómico.

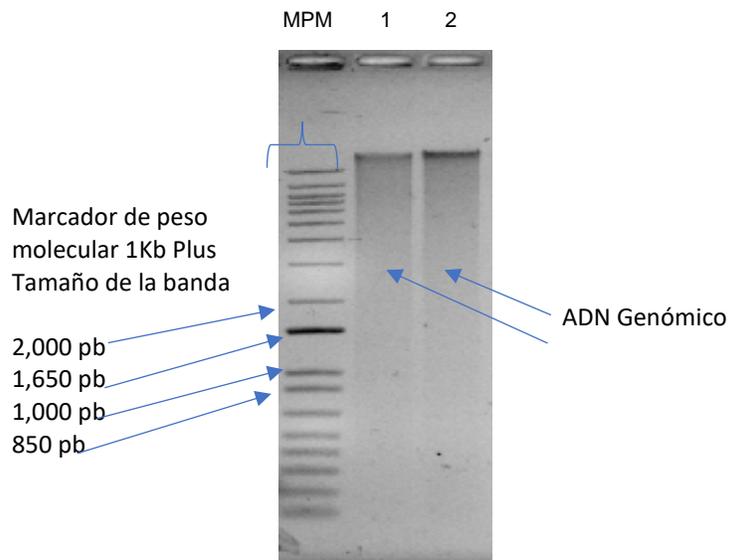
**Tabla 2.** Condiciones óptimas de buffer de extracción de ADN

Reactivo	Concentración
----------	---------------



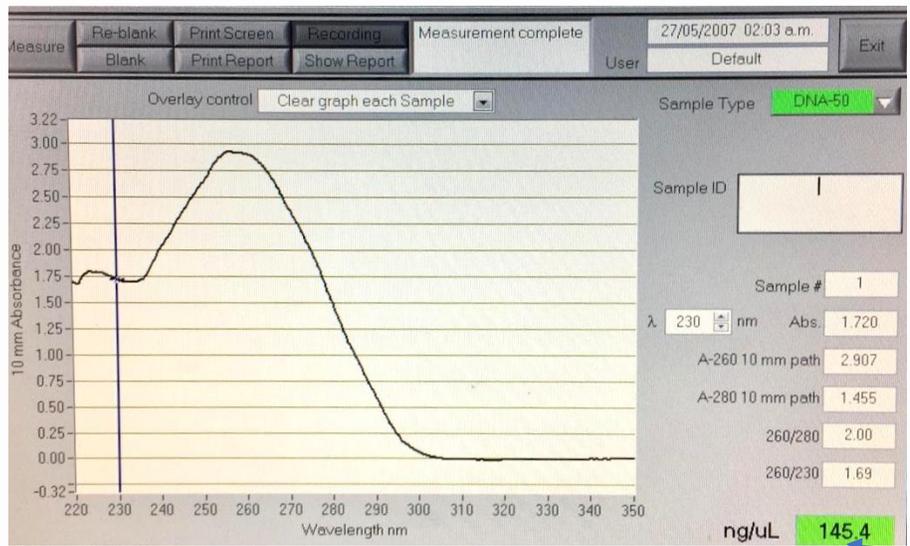
D-sorbitol	0.14 M
Tris HCl pH 8.0	0.22 mM
EDTA pH 8.0	0.022 mM
NaCl	0.8 M
CTAB	0.8%
N-Lauryl Sarcosina	1%
PVP	1%
$\beta$ Mercaptoetanol	0.2%
Lavados con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico	Cantidades de reactivo respectivamente (25:24:1)
RNasa	10 U/ $\mu$ L

En la Fig. 3 vemos un gel de agarosa con 2 muestras de ADN genómico de buena calidad, ya que no se observa un barrido relacionado con degradación, y se ve una banda mayoritaria en la parte superior.



**Figura 3. Gel de agarosa al 1% mostrando la presencia y calidad de ADN genómico de plantas de tomate.** MPM) marcador de peso molecular de 1Kb plus. 1, 2) muestras de ADN genómico extraído de plantas.

En la Fig. 4 observamos el resultado del análisis espectrofotométrico en un equipo Nanodrop, en el cual se grafica la absorbancia en las longitudes de onda 260nm/280nm, que indican cantidad de ácidos nucleicos/ proteína. Los valores cercanos a 2 significan que hay una buena extracción de ácidos nucleicos y poca proteína, la cual pudiera interferir con la amplificación por PCR del gen deseado. Además vemos la cantidad de ng/ $\mu$ L que en este caso fue superior a 140, lo cual es una buena concentración para iniciar reacciones de PCR.



Nos indica la calidad del ADN

Concentración de ADN

**Figura 4. Cuantificación y calidad de ADN en espectrofotómetro Nanodrop 1000.** El ADN genómico se observa de buena calidad ya que la relación de ADN/proteínas (Abs260/280) es cercana a 2.

### 10.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Condiciones iniciales

Oligonucleótidos

Para la PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

sentido: Lp Frag 4-(1611F) con las secuencias 5'GGTTGATGGGGTCATTTG AG3'

antisentido: LP Frag 4-(480R) con la secuencia 5'CACGGTACTGGTTCACTA TC3'

Amplifican en la región 16S rRNA-ISR-partial 23S RNA de *Ca. L. psyllaourous* (Hansen et al., 2008).



Las condiciones del programa de termociclado se muestran en la Tabla 3 y los componentes iniciales de la mezcla de reacción en la Tabla 4.

**Tabla 3. Programa en termociclador para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar *Ca. L. ps.***

Pasos	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	35
Hibridación	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	90 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

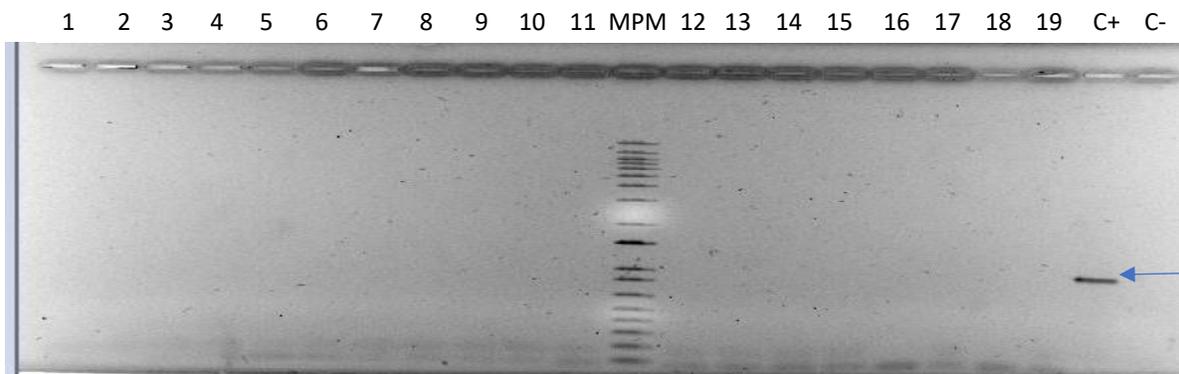
**Tabla 4. Mezcla maestra de reacción de PCR para amplificar *Ca. L. ps.***

Reactivo	Concentración final
Buffer de reacción	1X
dNTPs	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Oligo Lp Frag 4-(1611F)	0.2 μM
Oligo LP Frag 4-(480R)	0.2 μM
Taq polimerasae	2 U/μL
ADN	100 ng

Tomado de Hansen et al. (2007).

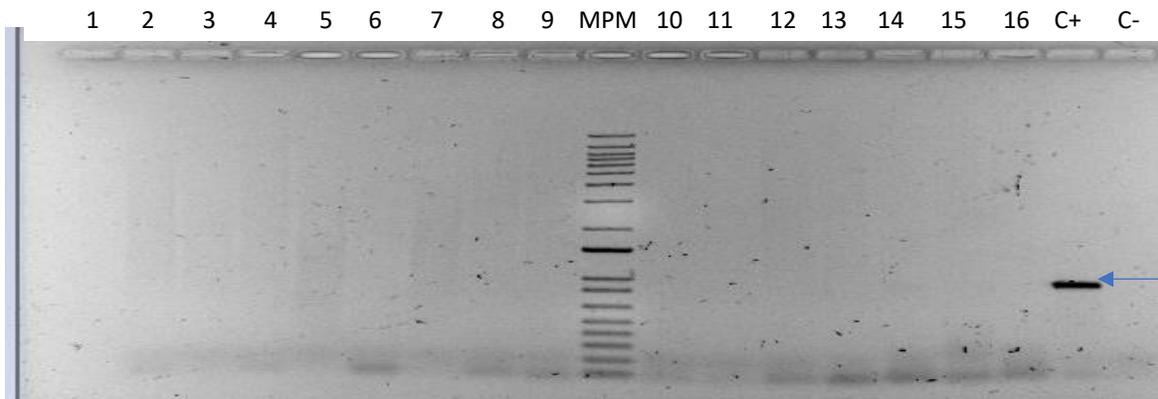
### Estandarización del ensayo de PCR

Con las condiciones iniciales citadas en el trabajo de Hansen et al. (2007), solo se observó amplificación en el control positivo que es una clona de una muestra facilitada por LANBAMA (QFB Elvira Hernández) que contaba con un producto positivo para *Ca. L. ps* de una solanácea.



**Figura 5. Condiciones iniciales de amplificación por PCR basadas en el trabajo de Hansen et al. (2007).** Carriles del 1 al 19 son muestras de Chile, 1) Muestra 1583. 2) Muestra 1584. 3) Muestra 1585. 4) Muestra 1677. 5) Muestra 1678. 6) Muestra 1679. 7) Muestra 1683. 8) Muestra 1712. 9) Muestra 1978. 10) Muestra 1980. 11) Muestra 1996. MPM) Marcador de peso molecular 1 kb plus 12) Muestra 1997. 13) Muestra 1998. 14) Muestra 1999. 15) Muestra 2000. 16) Muestra 2001. 17) Muestra 2002. 18) Muestra 2003. 19) Muestra 2012. C+) control positivo 980 pb. C-) Control negativo.

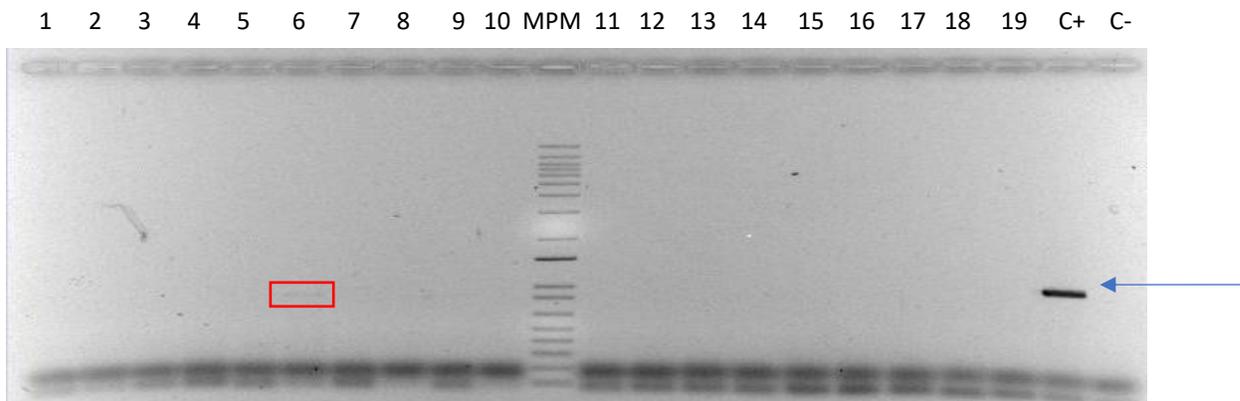
Con base en los resultados anteriores incrementamos 5 veces la cantidad de ADN y en la Fig. 6 podemos observar unos barridos pero no hay amplificación de la banda esperada.



**Figura 6. Amplificación por PCR utilizando oligos específicos para *Ca. L. ps.***  
**Gel de agarosa al 1%.** Carriles del 1 al 16 son muestras de Chile, 1) Muestra 1583. 2) Muestra 1584. 3) Muestra 1585. 4) Muestra 1677. 5) Muestra 1678. 6) Muestra 1679. 7) Muestra 1683. 8) Muestra 1712. 9) Muestra 1978. MPM) Marcador de peso molecular 1 kb plus. 10) Muestra 1980. 11) Muestra 1996. 12) Muestra 1997. 13) Muestra 1998. 14) Muestra 1999. 15) Muestra 2000. 16) Muestra 2001. C+) control positivo 980 pb. C-) Control negativo.

Continuamos con modificaciones de los componentes de reacción para tratar de obtener banda de las muestras problema ahora modificando las concentraciones de los dNTPs a 0.4mM, MgCl<sub>2</sub> a 4mM y los oligonucleótidos a 2.5 μM. Usando 200 ng de ADN.

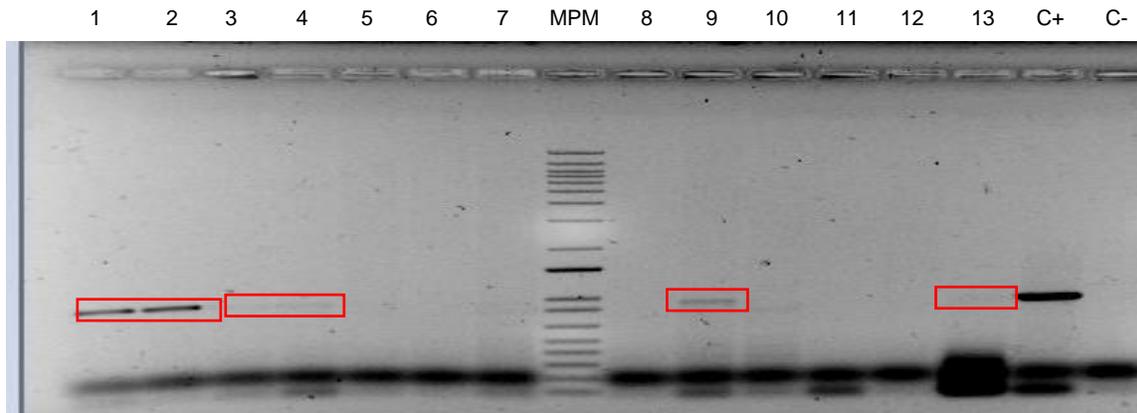
En la Fig. 7 podemos observar ahora una banda tenue en una de las muestras la 1679, pero también un exceso de oligonucleótidos.



**Figura 7. Amplificación por PCR utilizando oligos específicos para *Ca. L. ps.* Gel de agarosa al 1%. Carriles del 1 al 19 son muestras de Chile, 1) Muestra 1583. 2) Muestra 1584. 3) Muestra 1585. 4) Muestra 1677. 5) Muestra 1678. 6) Muestra 1679. 7) Muestra 1683. 8) Muestra 1712. 9) Muestra 1978. 10) Muestra 1980. MPM) Marcador de peso molecular 1 kb plus. 11) Muestra 1996. 12) Muestra 1997. 13) Muestra 1998. 14) Muestra 1999. 15) Muestra 2000. 16) Muestra 2001. 17) Muestra 2002. 18) Muestra 2003 19) Muestra 2012. C+) Control positivo 980 pb. C-) Control negativo.**

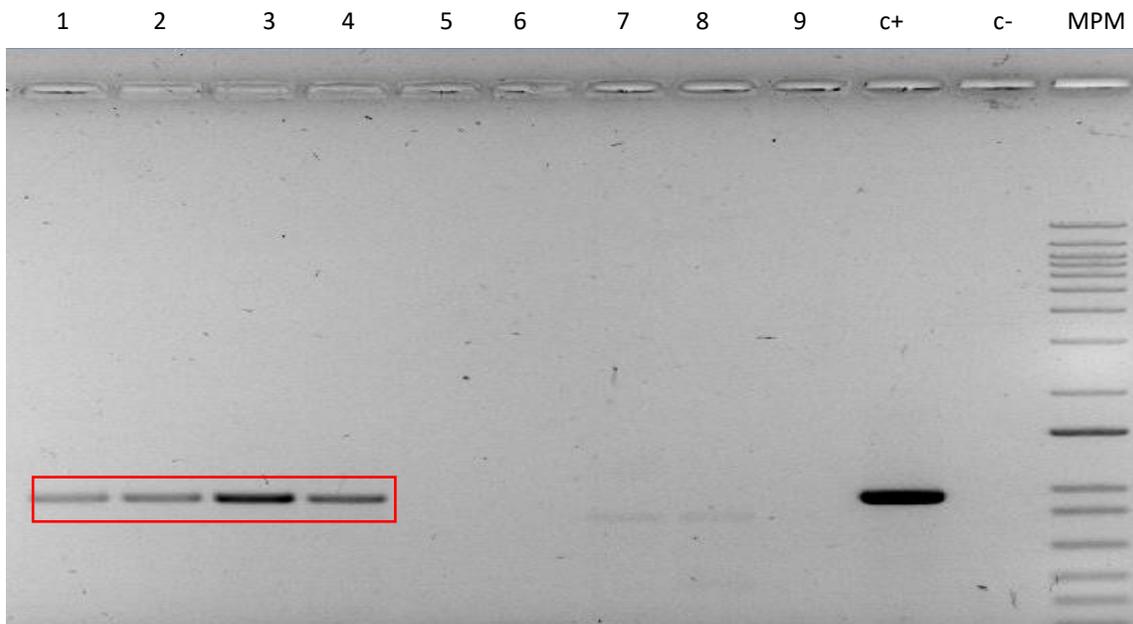
Basados en los resultados de la Fig. 7, probamos estas condiciones con ADN de otras muestras y vectores y pudimos observar más resultados positivos (Fig. 8). Se seguía observando un exceso de oligonucleótidos y de dNTPs por lo que redujimos las concentraciones a 0.2 mM de dNTPs y a 0.4  $\mu$ M de los oligos (ver Fig. 9).

Con estas condiciones obtuvimos una buena amplificación sin excesos en el gel de dNTPs y oligonucleótidos (Fig. 9)



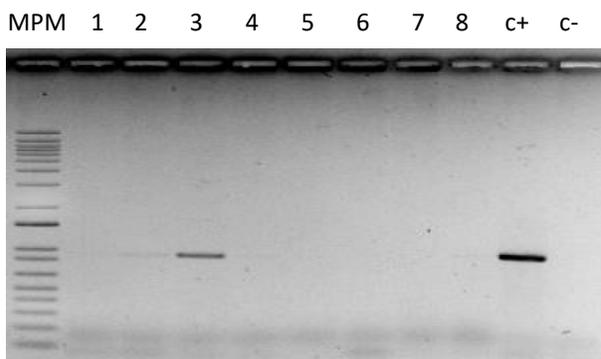
**Figura 8. Amplificación por PCR utilizando oligos específicos para *Ca. L. ps.* Gel de agarosa al 1%.** 1) Muestra de insecto vector 1560. 2) Muestra de insecto vector 1561. 3) Muestra de chile 1563. 4) Muestra de chile 1564. 5) Muestra de chile 1565. 6) Muestra de chile 1567. 7) Muestra de chile 1568. MPM) Marcador de peso molecular 1 kb plus. 8) Muestra de chile 1569. 9) Muestra de chile 1570. 10) Muestra de chile 1571. 11) Muestra de chile 1573. 12) Muestra de chile 1679 reamplificada. 13) Muestra de chile 1679 reamplificada. C+) control positivo 980 pb. C-) Control negativo.

Las condiciones óptimas para la reacción de PCR finalmente quedaron definidas como sigue: dNTPs 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Oligonucleótidos 0.4 μM, ADN 100 ng, Taq Polimerasa 1U.



**Figura 9. Condiciones óptimas para la reacción de PCR. utilizando oligos específicos para *Ca. L. ps.*** Gel de agarosa al 1%. 1) Muestra de chile 1679. 2) Muestra de insecto vector 1560. 3) Muestra de insecto vector 1561. 4) Muestra de chile 1563. 5) Muestra de chile 1564. 6) Muestra de chile 1571. 7) Muestra de chile 2013. 8) Muestra de chile 2053. 9) Muestra de chile 2056. C+) control positivo 980 pb. C-) Control negativo. MPM) Marcador de peso molecular 1 kb plus.

Utilizando las condiciones de PCR ya estandarizadas se procedió a procesar las muestras de tomate obteniendo dos de estas positivas a *Ca. L. ps.*





**Figura 10. Condiciones óptimas para la reacción de PCR. utilizando oligos específicos para *Ca. L. ps.*** Gel de agarosa al 1%. MPM) Marcador de peso molecular 1 kb plus. Los carriles del 1-8 son muestras de tomate, 1) Muestra M1T. 2) Muestra M2T. 3) Muestra M3T. 4) Muestra M4T. 5) Muestra M5T. 6) Muestra e M6T. 7) Muestra M7T 8) Muestra M8T C+) Control positivo 980 pb. C-) Control negativo.

### 10.4 Resultados de secuenciación

Los productos de PCR se secuenciaron ya sea clonados en un vector pGEM T-Easy o bien directamente, mediante electroforesis capilar método de Sanger en un equipo Applied Biosystems 3500. Se confirma en la base de datos de NCBI-BLASTn que la secuencia que se obtuvo de los productos de PCR tiene identidad con la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllauros*.

Del insecto vector se obtuvo un 91% de identidad con la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllauros*.

descriptions

Sequences producing significant alignments:  
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 8 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	939	939	74%	0.0	91.80%	<a href="#">GQ926924.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 06TX55 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	939	939	74%	0.0	91.80%	<a href="#">FJ830696.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter sp. Graden-City-KS-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, and tRNA-Lle, tRNA-Ala, and 23S ribosomal RNA genes, cell wall-associated f</a>	935	935	73%	0.0	92.11%	<a href="#">FJ914619.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum CLso-ZC1, complete genome</a>	935	2753	73%	0.0	92.11%	<a href="#">CP002371.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone OR-psyllids-1 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	917	917	74%	0.0	91.22%	<a href="#">JX624235.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 9 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	917	917	74%	0.0	91.22%	<a href="#">GQ926925.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 05TX12 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	917	917	74%	0.0	91.22%	<a href="#">FJ830690.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter psyllauros clone LP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence, and 23S rib</a>	915	915	70%	0.0	92.45%	<a href="#">FJ871061.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum strain FI 15-12 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">MG701020.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum strain FI 15-167 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">MG701019.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 28_302 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">KJ584931.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 28_301 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">KJ584930.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 7_17 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">KJ584928.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 7_117 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">KJ584927.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 9 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">JX308304.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum isolate FI_lab_09 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	74%	0.0	91.07%	<a href="#">HM067833.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum isolate 16sR 16S ribosomal RNA, tRNA-Lle, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA, and tRNA-Met genes, complete se</a>	007	007	73%	0.0	01.27%	<a href="#">KY434890.1</a>

**Figura. 10. Resultado de secuenciación del producto de PCR del ADN de insecto vector, dando positivo a *Ca. L. ps.***

Por otro parte, se obtuvieron las secuencias de cuatro muestras de Chile a partir de producto de PCR de ADN las cuales se analizaron en la base de datos de NCBI-BLASTn y se observó que la secuencia de la muestra (1560) tiene un 97.67 (Fig.11) de identidad con la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae*. Y otra muestra (1679) nos dio una identidad de 98.98 (Fig 12).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone OR 06/04/04_1 165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1179	1179	74%	0.0	97.67%	<a href="#">D5624235.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 9_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1179	1179	74%	0.0	97.67%	<a href="#">G5202925.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 25TX12_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1179	1179	74%	0.0	97.67%	<a href="#">FJ830698.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum CLso-ZC1, complete genome</a>	1177	3497	73%	0.0	98.08%	<a href="#">D5902271.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum strain FI 15-12_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1173	1173	74%	0.0	97.53%	<a href="#">MG701020.1</a>

**Figura 11. Resultados de secuenciación de muestra de Chile positiva a *Ca. L. ps.***

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum strain FI 15-12_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1050	1050	64%	0.0	98.98%	<a href="#">MG701020.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum strain FI 15-167_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1050	1050	64%	0.0	98.98%	<a href="#">MG701019.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 28_302_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1050	1050	64%	0.0	98.98%	<a href="#">KJ584931.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum clone 28_301_165-235 ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1050	1050	64%	0.0	98.98%	<a href="#">KJ584930.1</a>

**Figura 12. Resultados de secuenciación de muestra de Chile positiva a *Ca. L. ps.***

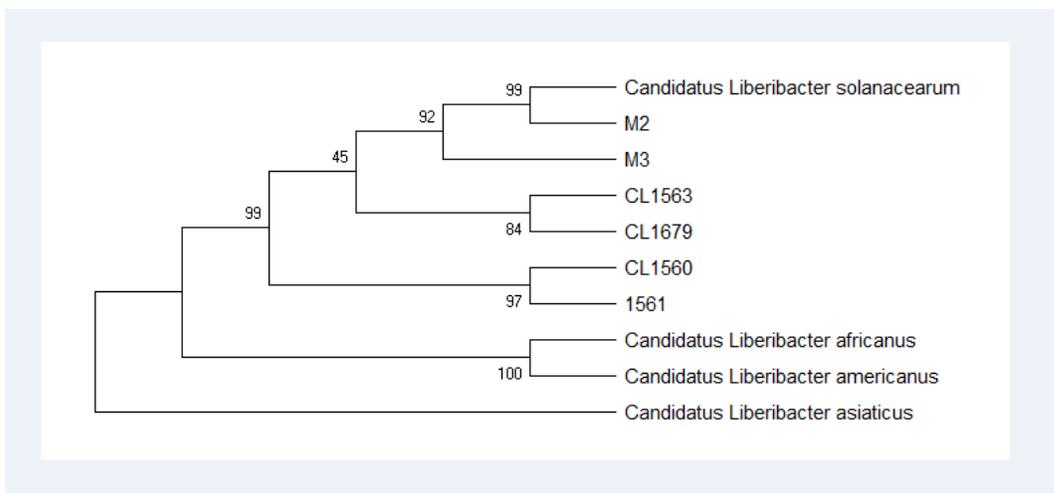
En lo que respecta a los productos de PCR de jitomate la muestra (ZZZ) nos dio una identidad en una de las muestras de 93% (Fig.13) de identidad con la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Candidatus Liberibacter sp. Graden-City-KS-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, and tRNA-Ile, tRNA-Ala, and 23S ribosomal RNA genes, cell wall-associated hydrolase pseud</a>	1179	1179	91%	0.0	93.24%	<a href="#">FJ914619.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 06TX55_16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1179	1179	91%	0.0	93.24%	<a href="#">FJ830698.1</a>
<a href="#">Candidatus Liberibacter solanacearum CLso-ZC1, complete genome</a>	1168	3451	91%	0.0	93.00%	<a href="#">CP002371.1</a>
<a href="#">Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone 8_16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1166	1166	91%	0.0	93.00%	<a href="#">GQ926924.1</a>

**Figura13. Resultados de secuenciación de muestra de jitomate positiva a *Ca. L. ps.***

**Análisis Filogenético.**

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor-Joining [1]. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.97901831. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados agrupados en la prueba de bootstrap (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas [2]. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood [3] y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Este análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1,510 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X [4].



**Figura14. Árbol filogenético con secuencias de chile, jitomate y vector. M2) Muestra de tomate 2. M3) Muestra de tomate 3. CL1563) Muestra de chile CL1679) Muestra de chile CL1560) Muestra de insecto vector 1561) Muestra de**



insecto vector. Métodos usados: Mega X, Neighbor-Joining, Maximum Composite Likelihood.

## 11. Análisis de resultados

Logramos detectar 4 muestras positivas de Chile de 31 analizadas de las cuales 2 secuenciamos y dieron alta identidad a *Ca. L. ps.* Dos de tomate dieron positivas por PCR y secuenciación, de ocho analizadas. Dos del vector dieron positivas por PCR y secuenciación, de tres muestras. La muestra de huevecillo no dio positivo a *Ca. L.*, posiblemente por no estar infectados, los cuales son datos similares a lo reportado por Melgoza-Villagómez et al. (2018), en muestras tomadas en Gto. y Zacatecas, donde es más frecuente encontrar en el adulto la bacteria. También es más frecuente encontrar muestras positivas en tomate que en Chile.

Existen reportes donde detectan *Ca. L. asiaticus* causante de HLB en cítricos con fotografía satelital, pero los síntomas del permanente del tomate y los brotes cloróticos de Chile pueden confundirse con otras enfermedades, por lo que lo recomendable es usar un método molecular de diagnóstico.

Las técnicas utilizadas en este trabajo como fueron, la técnica de PCR, clonación y secuenciación para la detección de *Ca. L. ps.* hasta el momento son unas de las más fiables lo cual concuerda con el trabajo de Reveles-Torres et al. (2016).

Por otro lado, se reportó que la enfermedad “permanente del tomate” causada por *Ca. L. ps.* es la que más daños ocasiona en cultivos de tomate sobre todo en regiones donde este cultivo se siembra en el ciclo primavera-verano con daños anuales del 45 % (INTAGRI, 2017), para este trabajo se realizó la colecta en dicho ciclo, así como asegurar la presencia del insecto vector (Fig. 2) y observar sintomatología en las plantas (Fig. 1) ya que los síntomas pueden ser una herramienta de primera mano para el apoyo de los técnicos en campo pero la confirmación y certeza de la identidad de la bacteria sólo puede realizarse en laboratorio Melgoza-Villagómez et al. (2018).



## 12. Perspectivas de alcance del proyecto a nivel nacional o estado

Este trabajo proporciona una metodología optimizada para la detección oportuna de *Candidatus Liberibacter psyllae* y prevención de enfermedades en cultivos de jitomate y chile por métodos moleculares, y puede usarse en LANBAMA para dar servicio a los agricultores no solo del estado sino de zonas productoras de solanáceas. Se pretende conseguir recursos para monitorear la huasteca potosina e implementar una campaña de control del vector en conjunto con la JLSV.

## 13. Conclusiones

- Es posible detectar los síntomas relacionados con la enfermedad causada por *Candidatus Liberibacter psyllae* en regiones agrícolas de SLP y al insecto vector *Bactericera cockerelli* en tomate y chile.
- Se cuenta con un método de extracción de ADN adecuado para obtener muestras de buena calidad y cantidad para realizar los ensayos de detección por PCR.
- Se cuenta con condiciones optimizadas de PCR, con las que se observan productos de amplificación esperados en muestras de tomate y chile con sintomatología de la enfermedad.
- Con base en los datos obtenidos de secuenciación se confirma la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter psyllae* en el insecto vector *Bactericera cockerelli* y en muestras de chile y jitomate.
- El dendrograma asocia las secuencias de tomate, las de chile y las de vector, separándolas filogenéticamente de otras especies de *Candidatus Liberibacter psyllae*.

#### 14. Bibliografía

- Casteel, C; Hansen, A; Walling, L; y Paine, T. (2012). Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericerca cockerelli*) and its associated endosymbiont *Candidatus Liberibacter psyllae*. *Plos one*, 7, 6.
- Dellaporta, S; Wood, J; y Hicks, J. (1983). A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1, 19-21.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Flores, J; Mora, G; Loeza, E; López, J; Domínguez, S; Aceverdo, G; y Robles, P. (2015). Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33, 195-210.
- Guzmán, O; Castaño, J; y Villegas, B. (2009). Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. *Agron*, 17, 2-24.
- Hansen, A; Trumble, J; Stouthamer, R; y Paine, T. (2008). A new Huanglongbing species *Candidatus Liberibacter psyllae* found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericerca cockerelli* (Sulc). *Appl and Environm Microbiol.*, 74, 5862–5865.
- Hansen, A; Jeong, G; Paine, T; y Stouthamer, R. (2007). Frequency of Secondary Symbiont Infection in an Invasive Psyllid Relates to Parasitism Pressure on a Geographic Scale in California. *Appl and Environm Microbiol.*, 73, 7531-7535.
- Henson, J; y French, R. (1993). The Polymerase Chain Reaction and plant disease diagnosis. *Phytopathology*, 31, 81-109.
- Hernández -Rico E. (2004) *Diagnóstico de Enfermedades en Jitomate en el Estado de San Luis Potosí, Utilizando Metodologías Microbiológicas, Bioquímicas, Inmunológicas y Moleculares*. Tesis de licenciatura. UASLP. San Luis Potosí, México.

- INTAGRI. 2017. La Enfermedad del “Permanente del Tomate”. Serie Fitosanidad. Núm. 83. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 p.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549*
- Melgoza-Villagómez, CM, León-Sicairos, CR; López-Valnzuela, JA; Hernández-Espinal, LA; Velarde-Félix, S; Garzón-Tiznado, JA. (2018). Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa. *Rev Mex Cienc Agric*, 9 (3), 499-509.
- Monreal-Vargas, C.T. (2015). *Desarrollo de Métodos de Diagnóstico Molecular de Enfermedades Virales, Bacterianas y Fúngicas en Hortalizas*. Tesis de maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. San Luis Potosí, México.
- Munyanza, J; Sengoda, V; Crosslin, J; De la Rosa, G; y Sánchez, A. (2009). First report of *Candidatus Liberibacter psyllauros* in potato tubers with zebra chip disease in Mexico. *Plant Dis* 93, 552.
- Palomo, J; Cubero, J; y Siveri, F. (2017). *Candidatus Liberibacter* agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. *Researchgate*, 15-21.
- Reguero-Reza M. (2014). La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16, 5-8.
- Restrepo, S. y Vargas, A. (2007) Biotecnología: Herramienta de diagnóstico de enfermedades en plantas. *Palmas*, 28, 367- 372.
- Reveles-Torres L.R., Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., Salas-Muñoz S. y Mauricio-Castillo J.A. 2016. *Candidatus Liberibacter solanacearum*: Un nuevo fitopatógeno en el cultivo de chile en el norte centro de México. Folleto Técnico Núm75.Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC –INIFAP, 34páginas.
- Sanger, F; Nicklen, S; y Coulson, A. (1977). Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry*, 74, 5463- 5467.



- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. (2005). “México líder mundial en exportación de chile”. Recuperado de <https://www.gob.mx/sagarpa/sanluispotosi/articulos/mexico-lider-mundial-en-exportacion-de-chile-140581?idiom=es>
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. (2018). “México se consolida como proveedor de jitomate a nivel mundial”. Recuperado de <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/mexico-se-consolida-como-proveedor-de-jitomate-a-nivel-mundial>.
- Sechler, A; Schuenzel, E; Cooke, P; Donnua, S; Thaveechai, N; Postnikova, E; Stone, A; Schneider, W; Damsteegt, V; y Schaad, N. (2009). Cultivation of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’, ‘Ca. L. africanus’, and ‘Ca. L. americanus’ Associated with Huanglongbing. *Phytopathology*, 99, 480-486.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Vega, M; Rodríguez, J; Díaz, Concepción; Bujanos, R; Mota, D; Martínez, J.L; Lagunes, Á; y Garzón, J.A. (2008). Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Agrociencia*, 42, 463-471.