

# ASOCIACIÓN MOLECULAR DE *Xylella fastidiosa* EN PLANTAS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CON SÍNTOMAS DE PUNTA MORADA, EN MÉXICO

A. T. Gutiérrez-Ibáñez<sup>1</sup>; A. Laguna-Cerda<sup>1</sup>;  
R. I. Rojas-Martínez<sup>2</sup>; R. González-Garza<sup>3</sup>;  
M. L. Salgado-Siclán<sup>1</sup>; C. Aguilar-Ortigoza<sup>4</sup>;  
C. González-Esquivel<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México (FCA-UAEMex)  
Campus Universitario “El Cerrillo” Carretera Toluca-Ixtlahuaca,  
km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México C. P. 50200. MÉXICO.  
Correo-e: atarini@uaemex.mx (<sup>1</sup>Autor responsable).

<sup>2</sup>Programa de Fitopatología, Colegio de Posgraduados, Carretera México-Texcoco,  
km 36.5 Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

<sup>3</sup>BioCiencia S. A. de C. V. Agustín Melgar Núm. 2317 Nte. Col. Reforma, Monterrey,  
Nuevo León. C. P. 64550. MÉXICO.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México.  
Campus Universitario “El Cerrillo” Carretera Toluca-Ixtlahuaca,  
km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo. de México C. P. 50200. MÉXICO.

<sup>5</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de México,  
km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco, San Cayetano de Morelos,  
Toluca, Edo. México C. P. 50200. MÉXICO.

## RESUMEN

La necrosis de los tubérculos de papa se asocia como parte del síndrome de punta morada (PMP). En el 2005, en Texas, EUA, a esta sintomatología se le denominó “zebra chip” o rayado de la papa y se le ha asociado con la presencia de *Xylella fastidiosa*. El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de esta bacteria en plantas de papa que presentaban punta morada. Durante el ciclo primavera-verano 2006 se hizo un muestreo dirigido en Toluca, Atlacomulco y Valle de Bravo, Estado de México. La detección de *Xylella fastidiosa* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores específicos RST31/RST33, resultando el 25 % de las plantas positivas para este patógeno. La comparación de las secuencias de los fragmentos amplificadas y las registradas en el GENBANK evidenciaron una homología de 97 a 99 %. Estos resultados sugieren que la necrosis y la punta morada encontrados en plantas de papa, en el Estado de México, están asociados con *Xylella fastidiosa*.

**PALABRAS CLAVES ADICIONALES:** PCR, secuenciación, necrosis.

## MOLECULAR ASSOCIATION OF *Xylella fastidiosa* IN POTATO PLANTS (*Solanum tuberosum* L.) WITH PURPLE TOP SYMPTOMS

## ABSTRACT

Tuber necrosis is one of the symptoms associated with potato purple top (PT) disease. In 2005 in Texas, USA, this symptom was named “zebra chip” or striped potato and was associated with the presence of *Xylella fastidiosa*. The aim of this research was to detect the bacterium in plants exhibiting symptoms of PT. The three major regions of potato production in the State of Mexico were selected (Toluca, Atlacomulco and Valle de Bravo). Directed sampling was carried out in the spring-summer season of 2006. Polymerase Chain Reaction (PCR) with the specific primers RST31/RST33 was used to detect *Xylella fastidiosa*; 25 % of the plants tested positive for the pathogen. Sequences of amplified fragments compared with sequences registered in the GENEBANK were 97 and 99 % homologous. The results suggest that necrosis and the symptoms of PT expressed in the potato plants in the State of Mexico are associated with *X. fastidiosa*.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** PCR, sequence, necrosis.

## INTRODUCCIÓN

La papa es uno de los cultivos principales en México, ocupó el quinto lugar por debajo del trigo, arroz, maíz y cebada. Se calculó que existen 67,000 hectáreas sembradas con este cultivo distribuidas en siete regiones que incluyen 23 estados, con una producción aproximada de 1 millón 350 mil toneladas, mismas que permiten satisfacer las demandas del consumo interno. De esta superficie una primera región está formada por los valles que cuentan con riego o poseen un temporal estable y donde se realiza una agricultura altamente tecnificada, la cual abarca alrededor de 17 mil hectáreas del total sembrado con papa en el país (SIAP, 2005). A partir del año 2003 este cultivo se vio afectado por la enfermedad conocida como Punta Morada (PMP) y brote de hilo de la papa, ambas están relacionadas entre sí pero asociadas a diferentes estados fenológicos del cultivo. Los síntomas conocidos como PMP fueron detectados en México desde 1948, pero estos fueron reportados hasta 1996 por Cadena-Hinojosa., el problema tuvo baja importancia en su inicio, sin embargo se incrementó especialmente en la zona central del país, en la actualidad se estima que afecta al 70 % de la superficie sembrada y es uno de los problemas fitosanitarios prioritarios a nivel nacional. Dependiendo del grado de infección, los daños varían desde un 20 a un 100 % en la pérdida del rendimiento comercial de tubérculos (Cadena-Hinojosa, 1996).

La PMP se asocia principalmente con síndromes en el follaje y brotaciones débiles durante la germinación del tubérculo, los síntomas observados varían dependiendo de ciertos factores como son variedad, órgano de la planta afectada, origen y tiempo de inicio de la infección, estado fenológico del cultivo, así como las condiciones ambientales que lo rodean (Martínez-Soriano *et al.*, 1999).

Las plantas que provienen de tubérculos infectados, pueden manifestar la enfermedad a partir de los 20 días después de que emergen, dependiendo de las condiciones de nutrición y humedad. Entre los síntomas destacan la marchitez prematura de la planta, necrosis vascular en los tallos, entrenudos cortos, brotes axilares que a menudo portan tubérculos aéreos, enrollamiento en las hojas recién emergidas y con folíolos de color morado, lo cual da el nombre a la enfermedad. Los tubérculos procedentes de plantas afectadas son pequeños de baja categoría y pueden presentar diferentes grados de pardeamiento en la parte interna.

Hay una relación de la punta morada de la papa con la producción de brote fino de los tubérculos (Nagaich y Giri, 1973; Martínez-Soriano *et al.*, 1997). Sin embargo, al tiempo de la cosecha, éstos no producen brote fino dando una apariencia normal sólo pueden ser identificados por sus brotes característicos, elongados y débiles después de la brotación, lo cual ocurre semanas posteriores a la cosecha. El síntoma de la enfermedad "bola de hilo", puede ser gradual y va desde la producción de brotes débiles,

hasta la falta total de brotación en los tubérculos, deficientes en clorofila, que dan la apariencia de hilos blancos típicos de la enfermedad, éstos se necrosan y la semilla muere, en algunos casos aunque aparentan estar sanos permiten el desarrollo de una planta que pudiera parecer sana; sin embargo, continuará infectada y servirá como inóculo primario para la dispersión por insectos vectores. Estas plantas aparentemente sanas reeditarán tubérculos infectados otra vez, los cuales no brotarán, o lo harán de forma deficiente si son usados como semilla (Martínez-Soriano *et al.*, 1999). Por otro lado, la necrosis de los tubérculos que por muchos años se asoció como parte de la sintomatología que induce la enfermedad PMP, recientemente en Estados Unidos de Norteamérica se indicó que este desorden es parecido al que se ha dado a conocer como "zebra chip" o rayado de la papa, el cual está asociado con la presencia del insecto *Bactericera cockerelli* (Munyanza *et al.*, 2007). En dicho país también se mencionó que esta enfermedad puede estar relacionada con la presencia de un patógeno diferente a fitoplasmas, así mismo, que el rayado de la papa puede ser inducido por fitoplasmas y por una bacteria del grupo de las fastidiosas (*Xylella fastidiosa*) con el propósito de detectar a ambos patógenos en la sintomatología antes mencionada, en el año 2006 se encontró la presencia de *X. fastidiosa* en un 51.8 % y la detección de fitoplasmas en bajo porcentaje (5.9 %). En ese mismo año, en pruebas de campo el 50 % de las muestras fueron positivas a *X. fastidiosa* y negativas a fitoplasmas (Secor *et al.*, 2006).

En México no se ha encontrado ningún reporte que haga referencia a la presencia de *X. fastidiosa* como agente asociado a la sintomatología presente de la PMP.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia de *X. fastidiosa* en plantas de papa con síntomas de punta morada, mediante técnicas moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 100 muestras de plantas de papa de la variedad Alpha que presentaban síntomas de PMP en el ciclo primavera-verano 2006, la colecta fue efectuada con base en muestreos previos por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México, 40 de estas muestras fueron procedentes de la localidad de San Miguel Balderas (Tenango del Valle), 40 de San Juan de las Huertas y San José Contadero (Zinacantepec) y para los municipios de Amanalco de Becerra y Donato Guerra 10 muestras en cada uno. Se muestrearon folíolos que presentaban coloración púrpura, tallos aplanados (fasciación), tubérculos aéreos y raíz, los cuales se procesaron en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

La obtención de ADN de la planta se realizó con el kit de extracción comercial Plant DNAzol Reagent® (Invitrogen™). Para observar la integridad del ADN extraído se preparó un gel de agarosa a una concentración de 0.8 % teñido con bromuro de etidio ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{litro}^{-1}$ ). Mediante un transluminador de luz UV GVM20 Syngene se visualizaron las bandas de ADN; la calidad y la concentración de ADN se midió en un biofotómetro de la marca Eppendorf. El ADN obtenido se diluyó en agua destilada esterilizada para obtener una concentración final de  $20 \text{ ng}\cdot\text{litro}^{-1}$  y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  para su uso posterior (Dellaporta *et al.*, 1983).

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

Se tomó el ADN de cada una de las muestras y se sometió a la reacción de PCR utilizando los iniciadores RST 31/RST 33 específicos para *X. fastidiosa*, los cuales amplifican 733 pb (Minsavage *et al.*, 1994). Con el propósito de verificar que el material vegetal estuviese libre de inhibidores, se realizó una reacción de PCR con los iniciadores 16s-1/16s-2 específicos para cloroplasto (gen endógeno) los cuales amplifican una región del gen ribosomal 16S generando un producto de 330 pb (Trejo, 2002). Las concentraciones finales de las reacciones de PCR para el gen endógeno y la detección de *X. fastidiosa* fueron: buffer de PCR 1X, MgCl 2.5 mM, 2.5 mM de cada dNTPs, 10 pmol de cada Iniciador, Taq DNA Polimerasa 1 unidad, cada mezcla de reacción contenía 80 ng de ADN total y se ajustó a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Las muestras se amplificaron en un termociclador automático PTC-100 MJ Research, con el siguiente programa: un ciclo con temperatura de desnaturación de  $94^\circ\text{C}$  por 5 min, 30 ciclos con temperatura de desnaturación de  $95^\circ\text{C}$  por 40 seg, una temperatura de alineamiento de  $52^\circ\text{C}$  por 40 seg, una temperatura de polimerización de  $72^\circ\text{C}$  por 1 min y una extensión final de  $72^\circ\text{C}$  por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron y analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, se tiñeron con bromuro de etidio ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{litro}^{-1}$ ) se observaron mediante un transluminador de luz UV GVM20 Syngene y se documentaron en el software Gene Tools 3.1. La longitud de los fragmentos obtenidos se compararon con el marcador de peso molecular Ladder 100pb (Invitrogen®) (Valadez y Kahl, 2005).

Como testigo positivo se utilizó ADN de *X. fastidiosa* proveniente de una cepa donada por el Dr. Estefano Homedo, (Universidad Autónoma de Baja California). En el caso del testigo positivo para el gen endógeno se utilizó ADN proveniente de coco (*Cocos nucifera* L.) y para el testigo negativo agua destilada esterilizada.

### Secuenciación

Los productos de PCR de *X. fastidiosa* y del positivo se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Biología y Prototipos, FES-Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México, las secuencias obtenidas se compararon con la base de

nucleótidos depositadas en el GenBank. Para su alineación se utilizó el paquete BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) fecha de consulta 8 de julio 2008.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos por el biofotómetro para concentración y pureza, indicaron una buena calidad de ADN, todas las muestras estuvieron dentro del rango de pureza adecuado para realizar la PCR (1.7-2.0) (Sambrook *et al.*, 1989).

La verificación de ausencia de inhibidores de PCR mediante la amplificación del gen endógeno 16S (Figura 1) comprobó la calidad del ADN extraído al amplificar el fragmento esperado de 330 pb, tanto para el control positivo como las muestras problema, lo cual indicó que las muestras estaban libres de sustancias con potencial inhibidor de PCR (etanol, fenoles, nucleasas u otros compuestos degradadores, Ausubel *et al.*, 1999), los controles negativos (agua) no mostraron amplificación.

Se detectó la presencia de *X. fastidiosa* en 25 plantas que presentaban sintomatología de punta morada mediante PCR amplificándose un fragmento de 733 pb. Como se ejemplifica en la Figura 2.

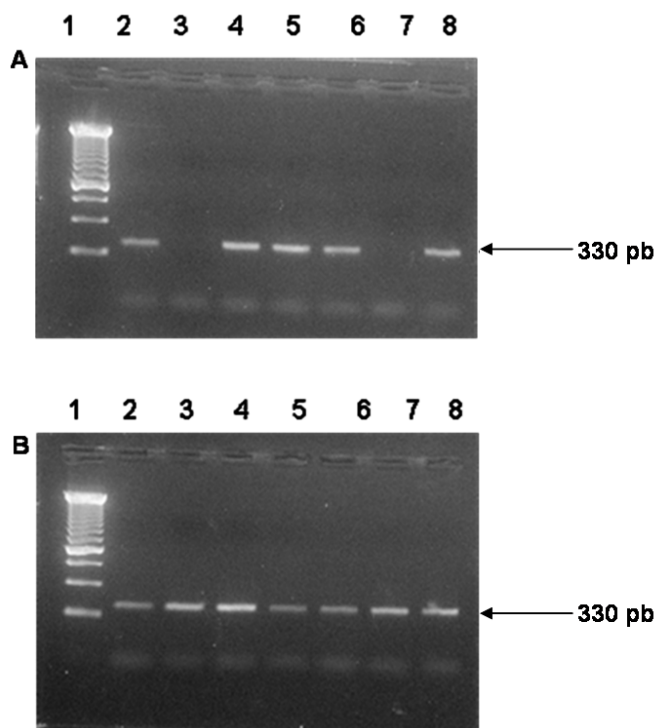
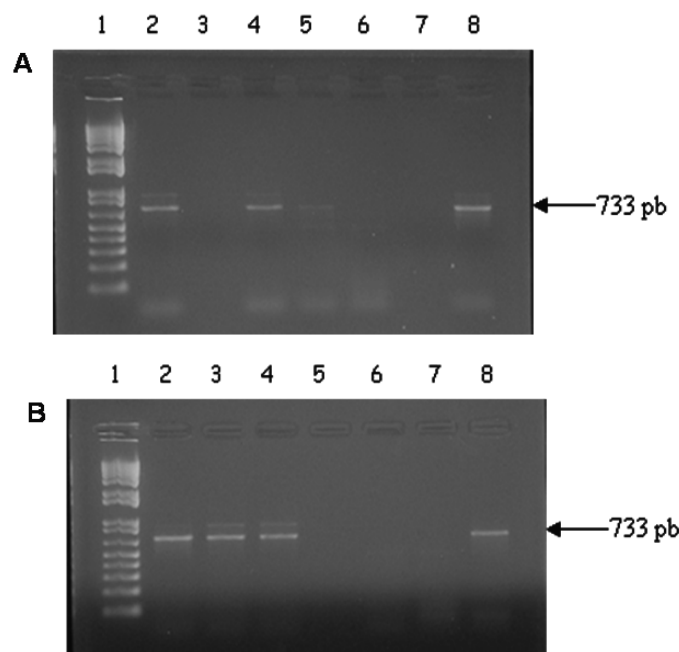


FIGURA 1. Productos de PCR del Gen ribosomal 16S de cloroplasto. Carril A1 y B1 marcador de peso molecular DNA Ladder 250 pb (Invitrogen®), carril A2 y B2 control positivo, carril A3 control negativo, carriles A(4-8) y B(3-8) muestras de plantas de papa. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio ( $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) en buffer TAE 1X.



**FIGURA 2.** Productos de PCR utilizando los iniciadores RST31/ RST33, específicos para *Xylella fastidiosa*. Carril A1 y B1 marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen®), carril A2 y B2 control positivo *Xylella fastidiosa*, carril A3 control negativo, carriles A(4-8) y B(3-8) muestras de plantas de papa con síntomas de coloración púrpura en los folíolos, tallos aplanados y tubérculos aéreos. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio ( $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) en buffer TAE 1X.

Amanalco de Becerra y 8 % del municipio de Donato Guerra. Se apreció que el patógeno se encontró en todas las áreas muestreadas en porcentajes diferentes.

La comparación de la secuencia de nucleótidos obtenida a partir del fragmento amplificado con los iniciadores específicos para *X. fastidiosa* con las ya registradas en el GENBANK indicó una homología del 96 % para el control positivo (Núm. de Acc. EU334087) y para las muestras problema una homología de entre el 99 al 98 % (Núm. de acceso AE009442, EU334087). (Figura 3).

Consecuentemente es difícil definir si la sintomatología presentada por las plantas de papa con punta morada es atribuible solamente a la presencia de fitoplasmas, o si es el resultado de un efecto sinérgico entre el fitoplasma y el patógeno detectado. Ya que la expresión de síntomas depende de la concentración del patógeno en la planta, de la velocidad de reproducción del mismo y las características inherentes al hospedante (Guthrie *et al.*, 1998).

Aunque no es posible discernir la magnitud del involucramiento de *X. fastidiosa* detectada en este estudio, en la expresión de síntomas observados en plantas enfermas de papa, estos resultados pueden contribuir al establecimiento de una línea de investigación que lleve a un mejor diagnóstico y manejo de la PMP.

La secuencia de nucleótidos de los productos

```
TCCTTGCTCCCATGTAAACCCATTTCACCTACCAAAGATCAGCCCCCTCTTTAA
GGGGAATATTGCTAAAGATTGAAAAGCAACAAACGAACAAAGGCAATGCCG
CATCAACATCGCACCAGATCACATTTGCTTGCCCTACACGTGATTAAGCACGTAT
GGGAAAGATCCATGAGCGCTCTGATTCAGTCAATATCAAGGAATGAGCGCAGTT
GTTGAGAACGGCTTGGATGACGAAGTTTCCGTAATGCTTTGGCTTCAATCTGGC
GAATACGTTACAGAGTGACATCAAATTGTTTACCCACCTCCTCCAGAGTGTGGT
CTGTATTCATGTCAATACCGAAACGCATACGCAGAACCTTCGCCTCTCTTGGTG
TCAAACCAGCCAACACTTCACGCACTGTTTCCGACAAGTTGACATTGGTTGTGG
TATCCACAGGAGACTCAACATTAGGATCCTCAATGAAGTCACCCAGATGAGAAT
CTTCATCATCTCCGATCGGAGTCTCCATTGAGATTGGCTCTTTAGCAATCTTCAT
TACCTTACGGATCTTGTCTCAGGCATGTCCATTTCTTAGCCAATTCTCTGGA
GTCGCCTCGCGACCAAACTGCTGCAACATTTGACGAGAGATACGGTTAAGTTT
GTTGATCGTCTCAATCATATGCACCGGGAATACGAATGGGGAA
```

**FIGURA 3.** Secuencia de nucleótidos obtenida a partir del fragmento amplificado con los iniciadores RST 31/RST 33 específicos para *X. fastidiosa*.

Se detectó a *X. fastidiosa* en un 72 % en folíolos, 52 % en tubérculos aéreos y 40 % en tallos aplanados; la bacteria fue localizada indistintamente en los diferentes órganos analizados excepto en la raíz, siendo los folíolos en donde se detectó con frecuencia mayor. Considerando los diferentes municipios muestreados se observó que el 32 % provenían de Tenango del Valle, 40 % de Zinacantepec, 20 % de

amplificados se encuentra en proceso de registro en la base de datos del GENBANK (bankit 1112155).

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos del análisis molecular se confirmó la presencia de *Xylella fastidiosa* en



plantas que presentaron síntomas de punta morada en papa (foliolo púrpura, tubérculos aéreos y fasciación) hasta ahora asociados sólo con fitoplasmas en México.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), a la Universidad Autónoma del Estado de México, por el apoyo económico mediante el proyecto con clave 2550/2007U., así también a la Facultad de Ciencias Agrícolas y el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF) de la UAEMex. Los autores agradecen al Dr. José L. Estefano-Hornedo por la donación de la cepa bacteriana utilizada en este estudio. Este artículo es parte de la tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales del primer autor.

### LITERATURA CITADA

- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. 1999. Polymerase Chain Reaction. In: Current Protocols in Molecular Biology. ALBRIGHT L. M.; COEN D. M.; VARKI A. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. pp. 740.
- CADENA-HINOJOSA, M. A. 1996. La punta morada de la papa en México: II Efecto de cubiertas flotantes, cultivares y productos químicos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14: 20-24.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD J.; HICKS, J. B. 1983. A plan DNA mini-preparation: version II. *Plant. Mol. Biol. Reporter*. 1:19-21.
- GUTHRIE, J. N.; WHITE, D. T.; WALSH, K. B.; SCOTT, P. T. 1998. Epidemiology of phytoplasma-associated to papaya diseases in Queensland, Australia. *Plant Disease* 82: 1107-1111.
- MARTÍNEZ-SORIANO, J. P.; RÍOS-BOCANEGRA, M.; ZAVALA-SOTO, M. E.; ROBLES-MURGUÍA, C.; ALMEIDA-LEÓN, I. H. 1997. Detección de organismos tipo micoplasma. Congreso Nacional de Productores de Papa; Chihuahua, Chihuahua, México. pp.17-19.
- MARTÍNEZ-SORIANO, J. P.; LEYVA-LÓPEZ, N. E.; ZAVALA-SOTO, M. E.; BERES, M.; LEAL, KLEVEZAS D. S. 1999. Detección molecular del agente causal de la "bola de hilo" de la papa en semilla infectada y asintomático. *Biotecnología Aplicada*. 16: 93-96.
- MINSAVAGE, G. C.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE R, M.; STALL, R. E. 1994. Development of a polimerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- MUNYANEZA, J. E.; CROSSLIN, J. M.; UPTON, J. E. 2007. The beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. *Journal of Economy Entomology*. 99: 268-272.
- NAGAICH, B. B.; GIRI, K. B. 1973. Purple top roll disease of potato. *American Potato Journal* 50: 79-85.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory. New York. USA. pp. 16-59.
- SECOR, G. A.; LEE, I. M.; BOTHER, K. D.; RIVERA-VARGAS, V.; GUDMESTAD, N. C. 2006. First report of a defect of processing potatoes in Texas and Nebraska associated with a new phytoplasma. *Plant Disease*. 90:377.
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2005. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. (En línea)([http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comdeanuadin.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeanuadin.html))
- TREJO SAAVEDRA, D. L. 2002. Desarrollo y validación de metodología para la detección de transgenes en organismos genéticamente modificados y sus subproductos. Tesis CINVESTAV-I. Gto. Depto. de Ing. Genética., pp.35-51.
- VALADEZ M. E.; KAHL G. 2005. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-Prensa – UCh. pp.11-15.