



**Análisis molecular de plantas de papa de segunda generación provenientes de campo  
con síntomas de punta morada para la identificación de**

***Candidatus Liberibacter solanacearum***

Flores Realpe, Brandon Alexander

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

28 de enero del 2022

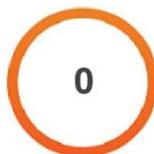


Brandon Flores\_antiplagio (2).pdf

Scanned on: 12:20 January 31, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	0
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Ommited Words	0



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “Análisis molecular de plantas de papa de segunda generación provenientes de campo con síntomas de punta morada para la identificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum*” fue realizado por el señor Flores Realpe, Brandon Alexander, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero de 2022.



Firmado electrónicamente por:  
**ALMA ROSEL  
KOCH KAISER**

Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs

C. C.: 1708880792



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Flores Realpe, Brandon Alexander**, con C.C. 1004235618, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Análisis molecular de plantas de segunda generación provenientes de campo con síntomas de punta morada para la identificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum*"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

Flores Realpe, Brandon Alexander

C.C.: 1004235618



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de publicación**

Yo, **Flores Realpe, Brandon Alexander**, con C.C. 1004235618, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Análisis molecular de plantas de papa de segunda generación provenientes de campo con síntomas de punta morada para la identificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum*"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'BR' or similar initials, positioned above a dotted line.

Flores Realpe, Brandon Alexander

C.C.: 1004235618

### **Dedicatoria**

Dedicado a la memoria de mi abuelita Laura Eliza Realpe Chapi, te extraño mucho.

A mi madre Laura, mi hermana Odalys y a mi abuelito Miguel por ser un pilar importante en mi vida, gracias por su apoyo en todos mis sueños, todos mis logros siempre serán por ustedes.

A mis tíos, Marcelo y Rocío quienes me acompañaron durante toda mi carrera, brindándome su cariño y sabiduría.

Brandon Alexander Flores Realpe

## **Agradecimiento**

Primero quiero agradecer a mi madre Laura, por velar por mi educación, por sus consejos, amor y ejemplo de perseverancia, me ha demostrado que en la vida solo hay tropiezos y que todos los sueños se pueden llegar a cumplir, te amo.

A mi abuelo Miguel y a Jorge gracias a su apoyo, he logrado culminar este viaje.

A mi hermana Odalys, por su amor y apoyo incondicional en cada decisión que tomo, llegaremos lejos estando juntos.

A mi familia adoptiva, Delgado Flores, por acogerme, hacerme sentir parte de ustedes, por su paciencia y tolerancia en todo este proceso, sin duda alguna este logro también es por todos ustedes.

A Carmen Castillo PhD. por confiar en mí y permitirme participar en su proyecto de investigación en las instalaciones de la Estación Santa Catalina. Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), al Departamento Nacional de Protección Vegetal, al Departamento Nacional de Biotecnología y al Centro Internacional de la Papa, por abrirme las puertas de sus laboratorios para ampliar mis conocimientos y desarrollar el presente tema de investigación. En especial al Dr. Morillo, M.Sc Johana, M.Sc Lizeth, Ing. Pablo y Gabriela por su apoyo, guía y consejos brindados para culminar la investigación.

A Alma Koch M.Sc y Valeria Ochoa PhD. del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por su tiempo, guía y consejos durante la elaboración de mi trabajo de titulación.

A mis amigos Camila, Wilmer, Tannya, Alfredo, Michelle y Cecilia, en especial a mis amigas Dome, Gigi y Ale por ser las mejores personas que pude haber conocido, por jamás dejar que decaiga, apoyarme en todas las etapas de mi vida y las

interminables vivencias que tenemos juntos, la vida no me va a alcanzar para agradecerles, espero seguir formando parte de sus logros.

A mis mejores amigas, Dayana y Marcela, por su constante aliento, cariño y consejos, la vida es más tranquila junto a ustedes.

Por último, quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron a crecer mental y académicamente, por ser ese motor que me impulsó en cada paso de esta trayectoria.

## Índice de Contenido

Resultado del Análisis de Copyleaks .....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento .....	7
Índice de Contenido.....	9
Índice de Tablas .....	12
Índice de Figuras.....	13
Abreviaturas .....	15
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Capítulo 1: Introducción.....	19
Planteamiento del Problema .....	19
Justificación del Problema .....	20
Objetivos.....	22
Objetivo General .....	22
Objetivos Específicos .....	22
Capítulo 2: Marco Teórico .....	23
Cultivo de Papa en el Ecuador.....	23

	10
Taxonomía de la Papa.....	23
Principales Enfermedades de la Papa .....	24
Enfermedad Punta Morada de la Papa .....	25
Microorganismos Relacionados con la Enfermedad de la Punta Morada de la Papa .....	26
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	26
Fitoplasma.....	28
Vectores que Transmiten la Enfermedad de la Punta Morada de la Papa .....	29
<i>Bactericera cockerelli</i> Sulc.....	29
Identificación Molecular de Patógenos.....	30
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	31
Polimorfismo de Simple Nucleótido (SNP).....	32
Secuenciación Sanger.....	33
Hipótesis.....	34
Capítulo 3: Materiales y Métodos .....	35
Colaboradores Científicos.....	35
Zona de Estudio.....	35
Metodología.....	35
Material Biológico .....	35
Extracción de ADN .....	36
Cuantificación de ADN y preparación de diluciones .....	36
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	37

Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (CaLso) .....	38
Determinación del Haplotipo de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (CaLso)...	39
Electroforesis.....	42
Secuenciación Sanger.....	42
Análisis Bioinformático .....	42
Capítulo 4: Resultados .....	43
Extracción y Cuantificación de ADN.....	43
Detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (CaLso).....	44
Identificación Molecular del Fragmento Amplificado.....	45
Determinación del Haplotipo de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> (CaLso) .....	46
Capítulo 5: Discusión.....	52
Capítulo 6: Conclusiones.....	55
Capítulo 7: Recomendaciones.....	56
Capítulo 8: Bibliografía .....	57
Capítulo 9: Anexos .....	67

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Clasificación taxonómica de la papa (Solanum tuberosum L.)</i> .....	24
<b>Tabla 2</b> <i>Clasificación taxonómica de Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	27
<b>Tabla 3</b> <i>Cebadores utilizados en ensayos PCR convencional</i> .....	37
<b>Tabla 4</b> <i>Componentes de PCR para la detección de Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	38
<b>Tabla 5</b> <i>Condiciones de amplificación para la detección de Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	39
<b>Tabla 6</b> <i>Componentes de PCR para la amplificación de la región ARNr 16S – 23S</i> .....	40
<b>Tabla 7</b> <i>Condiciones de amplificación para la región ARNr 16S – 23S</i> .....	40
<b>Tabla 8</b> <i>Componentes de PCR para la amplificación de los genes codificantes de proteínas ribosomales rplJ y rplL</i> .....	41
<b>Tabla 9</b> <i>Condiciones de amplificación para los genes codificantes de proteínas ribosomales rplJ y rplL</i> .....	41
<b>Tabla 10</b> <i>Resultados de la identificación molecular de las muestras evaluadas</i> .....	46
<b>Tabla 11</b> <i>Polimorfismos de simple nucleótido de los haplotipos y muestras de Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .....	50

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Electroforesis para analizar la integridad de ADN de las muestras</i> .....	43
<b>Figura 2</b> <i>Sintomatología de PMP presente en plantas de segunda generación</i> .....	44
<b>Figura 3</b> <i>Electroforesis para la detección de CaLso en plantas de papa mediante la amplificación del gen 16S</i> .....	45
<b>Figura 4</b> <i>Electroforesis del fragmento IGS de CaLso</i> .....	47
<b>Figura 5</b> <i>Electroforesis del amplicon que codifica las proteínas ribosomales de CaLso</i> .....	48
<b>Figura 6</b> <i>Secuencia de la muestra AP4T8 alineada con la secuencia parcial de la región intergénica 16S – 23S</i> .....	49
<b>Figura 7</b> <i>Secuencia de la muestra AP4T9 alineada con la secuencia parcial de las proteínas ribosomales rplJ y rplL</i> .....	49



## Abreviaturas

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**bp:** pares de bases

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CaLso:** *Candidatus Liberibacter solanacearum*

**CIA:** Cloroformo – alcohol isoamílico

**ddNTPs:** dideoxinucleótidos

**dNTPs:** Desoxirribonucleótido trifosfato

**EDTA:** Ácido etilen-diamino-tetra-acético (Siglas en inglés)

**Km:** kilómetro

**M:** Molar

**min:** Minuto

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**msnm:** metros sobre el nivel del mar

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**ng:** Nanogramo

**ng/μl:** Nanogramo por microlitro

**nm:** nanómetro

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa (Siglas en inglés)

**PIB:** Producto interno bruto

**pH:** Potencial de hidrogeno

**PMP:** Punta morada de la papa

**RFLPs:** Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

**rpm:** Revoluciones por minuto

**Rx:** Reacción

**s:** Segundo

**SNPs:** Polimorfismo de simple nucleótido (Siglas en inglés)

**TAE:** Tris – Acetato – EDTA

**U:** Unidades

**U/ $\mu$ l:** Unidades por microlitro

**$\mu$ l:** Microlitro

## Resumen

La enfermedad punta morada de la papa (PMP) ha sido reportada en diferentes partes del mundo, en 2013 se dieron los primeros informes sobre la PMP en la región norte de Ecuador. En el país, se ha evidenciado el ataque al 80% de los cultivos de la variedad Superchola de papa provocando pérdidas de hasta el 50%. Se ha determinado que la enfermedad es producida por bacterias ligadas al floema como *Candidatus Liberibacter solanacearum* y fitoplasmas. En la presente investigación se analizaron 123 plantas de papa desarrolladas en invernadero provenientes de tubérculos cosechados de plantas con síntomas de PMP de los sectores de Machachi, La Tola, el Austro y San José de Minas. Se realizaron pruebas de PCR convencional para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) mediante la amplificación del gen 16S, teniendo como resultado cuatro muestras positivas. De igual forma, se realizó un análisis de polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) de la región intergénica 16S – 23S y de la región codificante de proteínas ribosomales para determinar el haplotipo de la bacteria presente en las muestras analizadas, obteniendo CaLso del haplotipo A.

### Palabras clave:

- **CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM**
- **HAPLOTIPOS**
- **PUNTA MORADA DE LA PAPA**
- **TUBÉRCULO AÉREO**
- **PMP**

### **Abstract**

Potato purple top disease (PPT) has been reported in different parts of the world; in 2013, the first reports of PPT were made in the northern region of Ecuador. In Ecuador, the disease has been reported to attack 80% of the Superchola potato variety, causing losses of up to 50%. It has been determined that the disease is caused by phloem-bound bacteria such as *Candidatus Liberibacter solanacearum* and phytoplasmas. In the present investigation, 123 potato plants grown in greenhouses from tubers harvested from plants with PPT symptoms from Machachi, La Tola, El Austro, and San José de Minas were analyzed. Conventional PCR tests were performed for the detection of *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) by amplification of the 16S gene, resulting in four positive samples. Similarly, an analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the 16S - 23S intergenic region and the coding region of ribosomal proteins was carried out to determine the haplotype of the bacterium present in the samples analyzed, obtaining CaLso of haplotype A.

### **Keywords**

- **CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM**
- **HAPLOTYPES**
- **POTATO PURPLE TOP**
- **AIR TUBERCLE**
- **PPT**

## Capítulo 1: Introducción

### Planteamiento del Problema

La enfermedad punta morada de la papa (PMP) ha sido reportada en diferentes partes del mundo, como Canadá, Estados Unidos, México, Rusia y Pakistán ocasionando pérdidas económicas significativas en el sector agrícola (Castillo, Paltrinieri, Buitron, & Bertaccini, 2018). En el caso de México, la PMP fue reportada en el año de 1948 y en los últimos años se ha evidenciado un crecimiento acelerado en el centro del país (Rubio, y otros, 2006).

En ciertos países, se ha informado que la enfermedad está relacionada con al menos cinco grupos filogenéticos diferentes de fitoplasma, como son 16SrI, 16SrII, 16SrVI, 16SrXII y 16SrXVIII ocasionando una reducción del rendimiento y pérdida de la calidad del tubérculo debido a la coloración marrón (Lee & Bottner, 2009).

*Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso), un bacilo Gram-negativo, está relacionado con la enfermedad chip cebrá en países como Estados Unidos, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Nueva Zelanda, pero en el caso de México, esta bacteria también es considerada como uno de los agentes causales de la punta morada (Delgado-Ortiz, y otros, 2019).

En el año 2013 se dieron los primeros reportes sobre la PMP en la región norte de Ecuador. Años más tarde, se evidenció el ataque al 80% de los cultivos de la variedad de papa Superchola provocando pérdidas de hasta el 50% (Castillo, Paltrinieri, Buitron, & Bertaccini, 2018). En investigaciones realizadas por Caicedo et al. (2015), Castillo et al. (2018) y Caicedo et al. (2020), se determinó que la sintomatología estaba relacionada con factores bióticos tales como fitoplasmas de los grupos 16SrII y 16SrIF, así como con CaLso. Además, por primera vez, a finales del año 2017 se observó en el

país la presencia de *Bactericera cockerelli*, insecto reportado como vector de CaLso (Castillo, Fu, & Burckhardt, 2019).

### **Justificación del Problema**

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los principales cultivos en la sierra ecuatoriana; la calidad de los cultivos no está determinada únicamente por la latitud de cada zona, sino que, a su vez, están relacionados con el clima, fisiografía y altura (Pumisacho & Sherwood, 2002). En el Ecuador, el cultivo de papa es la principal manera de generar ingresos en las familias de zonas rurales, representando así el 4% de aporte al Producto Interno Bruto (PIB) agrícola; además, es un rubro de seguridad alimentaria y constituye el 7% de la canasta básica familiar nacional (Mejía, 2017).

Los productores de papa deben luchar contra problemas fitosanitarios del cultivo debido a la reducción del rendimiento o, en cierto punto, a la pérdida total de la plantación (INIAP, 1997).

La PMP es una enfermedad emergente que afecta a cultivos alrededor del mundo, siendo un desafío fitosanitario para los agricultores (Rubio, Cadena, & Vázquez, 2013). En el país se ha registrado una disminución del 30 al 40% de la superficie sembrada de papa en provincias como Pichincha y Cotopaxi, y se ha visto un aumento en los costos de producción porque los agricultores se ven obligados al uso de pesticidas, fungicidas y fertilizantes para combatirla, afectando así el valor de venta al público (Banco Central del Ecuador, 2019).

Desde los primeros reportes sobre la PMP, la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ha priorizado el problema y dedicado sus investigaciones a determinar los agentes causales de la enfermedad y del vector que facilita su propagación (INIAP, 2018). En investigaciones

realizadas en el territorio nacional, Caicedo et al. (2015) y Castillo et al. (2018) han logrado determinar la presencia de fitoplasmas del tipo 16SrII y 16SrIF en plantas con síntomas de PMP. Por otro lado, Caicedo et al. (2020) también encontró relación de la sintomatología con CaLso.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Analizar de forma molecular plantas de papa de segunda generación provenientes de campo con síntomas de punta morada para la identificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum*

### ***Objetivos Específicos***

- Realizar la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de segunda generación.
- Realizar la secuenciación del fragmento amplificado de *Candidatus Liberibacter solanacearum* mediante el método Sanger.
- Determinar el haplotipo de *Candidatus Liberibacter solanacearum* mediante el análisis de polimorfismo de simple nucleótido (SNP).

## Capítulo 2: Marco Teórico

### Cultivo de Papa en el Ecuador

El cultivo de papa en el Ecuador es una actividad tradicional de la región interandina y forma parte de la dieta básica de la población ecuatoriana, teniendo un consumo anual per cápita de 122 kilogramos en Quito, 80 kilogramos en Cuenca y 50 kilogramos en Guayaquil (Pumisacho & Sherwood, 2002). Según el Informe de Rendimientos de Objetivos de la papa del 2019, el rendimiento nacional de este tubérculo fue de 23.41 toneladas por hectárea, siendo la provincia del Carchi la primera (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, 2019).

En el Ecuador, la producción de papa se distribuye en tres zonas geográficas: norte (Carchi e Imbabura), centro (Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Bolívar) y sur (Cañar, Azuay y Loja). Por lo general, se utilizan terrenos irregulares, en laderas y en un rango de altitud de 2400 a 3800 msnm, en la región interandina y subandina (Araujo, y otros, 2021).

### Taxonomía de la Papa

De acuerdo con CONABIO (2008) la clasificación taxonómica para la papa (*Solanum tuberosum* L.) es la presentada en la **¡Error! No se encuentra el origen de a referencia..**

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de la papa (Solanum tuberosum L.).*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Solanum tuberosum</i> L.

Nota: Recuperado de (CONABIO, 2008).

### **Principales Enfermedades de la Papa**

El cultivo de papa puede ser afectado por diferentes organismos, que en grandes proporciones, ocasionan pérdidas económicas significativas para el agricultor. Entre los principales patógenos que afectan la papa se tiene a hongos, bacterias y virus. Por lo general, estos organismos atacan hojas, tallos o tubérculos de la planta provocando pudriciones, malformaciones o afectando la apariencia y calidad de los tubérculos para su distribución comercial (Egúsquiza, 2013).

Normalmente, las enfermedades causadas por hongos se identifican mediante pústulas en las hojas, para manejarlas, se necesita controlar tanto la humedad como la densidad del cultivo. La antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides*) ataca a las hojas y se requieren variedades resistentes, rotación de gramíneas y aplicación de hidrolatos para controlarlo (Noroña & Tipanquiza, 2010).

Existen alrededor de 20 tipos de virus que tienen la capacidad de afectar los órganos de la planta causando diferentes grados de sintomatologías, desde leves hasta la pérdida total de la producción; pueden ser diseminados por tubérculos infectados,

mediante el contacto, a través del uso de herramientas contaminadas o, a su vez, por medio de vectores como insectos, nematodos u hongos (Méndez & Inostroza, 2009).

Las bacterias que provocan enfermedades no son numerosas pero son responsables de la pudrición del tubérculo como es el caso de la pierna negra o pudrición blanda y la marchitez bacteriana (Egúsquiza, 2013).

### **Enfermedad Punta Morada de la Papa**

La enfermedad punta morada de la papa (PMP) afecta a cultivos alrededor del mundo; en el caso del continente Americano, el primer reporte se dio en Estados Unidos en el año de 1935 y en México en 1947 (Rubio, Cadena, & Vázquez, 2013). En el año 2014, un grupo de investigadores del INIAP se trasladaron a la provincia del Carchi – Ecuador, muestrearon plantas con síntomas atípicos y en base a análisis moleculares, PCR, se llegó a conclusiones iniciales de que se trataba de la enfermedad PMP (Rivadeneira, y otros, 2015).

Los síntomas de la PMP son los siguientes: plantas pequeñas, abultamiento del tallo, formación de tubérculos aéreos, decoloración de hojas superiores presentando tonalidad morada, los tubérculos desarrollan pardeamiento interno, generalmente no brotan, pero si llegan a hacerlo, se producen brotes ahilados y plantas débiles (Rubio, y otros, 2006).

Por otro lado, los tubérculos infectados, presentan lenticelas agrandadas en tallos subterráneos, colapso de estolones hasta una coloración oscura, asociada con la oxidación de compuestos fenólicos, mecanismo de defensa usado por las plantas contra enfermedades (Rubio, Cadena, & Vázquez, 2013; Delgado-Ortiz, y otros, 2019).

Se ha visto que tanto CaLso como los fitoplasmas, patógenos relacionados con la enfermedad, presentan la capacidad de transmitirse a partir de los tubérculos semilla

de la papa hacia la próxima generación, es decir, se han encontrado plantas progenie infectadas (Crosslin, Hamlin, Buchman, & Munyaneza, 2011; Pitman, Drayton, Kraberger, Genet, & Scott, 2010). El mecanismo por el cual los fitopatógenos llegan al tubérculo sigue siendo desconocido pero se cree que al encontrarse en el floema de la planta, atraviesan los poros de las células cribosas y así llegan a todos los órganos vegetativos (Reveles-Torres, Velásquez-Valle, & Mauricio-Castillo, 2014).

### **Microorganismos Relacionados con la Enfermedad de la Punta Morada de la Papa**

Se ha logrado determinar que los síntomas se encuentran relacionados con la presencia de fitoplasma (Caicedo et al, 2015; Castillo, Paltrinieri, Buitron, & Bertaccini, 2018). También ha demostrado que la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) está relacionada con dicha enfermedad (Caicedo, Simbaña, Calderón, Lalangui, & Rivera-Vargas, 2020).

Castillo y sus colaboradores en el 2018 emplearon el método CTAB propuesto por Ferreira & Grattapaglia (1998) para la extracción de ADN de las muestras de plantas.

### ***Candidatus Liberibacter solanacearum***

*Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) es una bacteria que infecta a varios miembros de las familias de plantas Apiaceae y Solanaceae causando grandes pérdidas económicas. Pertenece a la clase alphaproteobacteria (Tang & Tamborindeguy, 2021). Es un bacilo Gram-negativo que se encuentra limitado al floema, mide aproximadamente de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho, no es posible obtener un cultivo *in vitro*. Por lo general, se puede transmitir por injerto, semilla y por el insecto vector de *Bactericera cockerelli* (Delgado-Ortiz, y otros, 2019).

Dentro de su genoma se encuentran tres operones de ARN ribosomal (16s, 23s y 5s), también tiene 45 genes codificantes para ARN de transferencia y aproximadamente 35 pseudogenes (Delgado-Ortiz, y otros, 2019). El tamaño del genoma y el número de genes codificantes son más pequeños que la mayoría de la familia *Rhizobiaceae* teniendo alrededor de 35% de guanina y citosina, en comparación con los demás, que es de aproximadamente del 60% (Lin, y otros, 2011).

En esta bacteria se ha evidenciado la presencia de una pared de peptidoglicano apenas visible, no presenta flagelos o pilis. Si se compara el citoplasma de CaLso con otras bacterias fitopatógenas, es menos denso y, en ciertos casos, muestran plasmólisis (Reveles-Torres, Velásquez-Valle, Mena-Covarrubias, Salas-Muñoz, & Mauricio-Castillo, 2016).

La Secretariat of the International Plant Protection Convention (2017) describe la clasificación taxonómica de CaLso (Ver Tabla 2)

**Tabla 2**

*Clasificación taxonómica de Candidatus Liberibacter solanacearum.*

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>División</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Alphaproteobacteria
<b>Orden</b>	Rhizobiales
<b>Familia</b>	Rhizobiaceae
<b>Género</b>	<i>Candidatus Liberibacter</i>
<b>Especie</b>	<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>

Nota: Recuperado de (Secretariat of the International Plant Protection Convention, 2017).

### ***Fitoplasma***

Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular ubicados en los elementos fibrosos del floema de la planta infectada y son transmitidos hacia otras plantas por medio de insectos, por lo general, del orden Hemiptera. Las plantas infectadas exhiben una variedad de síntomas que van desde el retraso en el crecimiento, follaje amarillento, punta morada y desarrollo de flores verdes hasta la conversión de flores en hojas por las proteínas efectoras secretadas por los patógenos (Crizón, 2017).

Los fitoplasmas se movilizan a través de los poros de las láminas cribosas presentes en el floema, extendiéndose por todo el sistema vascular de la planta logrando invadir raíces, hojas, tallos, ramas, brotes, frutos y, en cierto punto, pueden llegar a infectar las semillas (Reveles-Torres, Velásquez-Valle, & Mauricio-Castillo, 2014).

Por lo general, se clasifican en grupos y subgrupos basados en el análisis de RFLPs del gen 16s utilizando enzimas de restricción *in silico*. Mediante la secuenciación se ha logrado obtener una idea clara de la diversidad de este patógeno. El criterio para reconocer un nuevo subgrupo se fundamenta en el patrón colectivo de RFLP que presenta una similitud de 0.97 con los patrones previamente establecidos dentro de un grupo determinado (Bertaccini, Duduk, Paltrinieri, & Contaldo, 2014).

En Ecuador, se han identificado dos tipos de fitoplasma relacionados con la PMP siendo *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia perteneciente al grupo 16SrII (Caicedo, y otros, 2015) y un fitoplasma del grupo 16SrI subgrupo F (Castillo, Paltrinieri, Buitron, & Bertaccini, 2018).

### **Vectores que Transmiten la Enfermedad de la Punta Morada de la Papa**

Los fitopatógenos responsables de la PMP, en otros países, son transmitidos por diferentes especies de chicharritas como *Macrosteles orientalis*, *M. fascifrons*, y *Scleroracus flavopictus*. En algunos estudios se ha relacionado al psílido de la papa *Bactericera cockerelli* con los síntomas de PMP en la parte aérea de la planta en México (Rubio, y otros, 2006).

#### ***Bactericera cockerelli* Sulc.**

Los psílicos han sido considerados por varios años como plagas secundarias, pero según estudios recientes se ha asociado a *B. cockerelli*, el psílido de la papa, como el vector responsable de la transmisión de fitoplasmas en cultivos de solanáceas en México y también se ha reportado la producción de daños en las plantas debido a su efecto toxinífero en el hospedero (Ramírez, y otros, 2008).

Comúnmente también se lo conoce como pulgón saltador, salerillo o paratrioza, es un insecto originario de América del Norte y se han dado reportes en México, Centroamérica, Nueva Zelanda y Ecuador, causando grandes pérdidas económicas debido a los desórdenes fisiológicos y enfermedades fitoplásmicas y bacterianas (Jirón-Rojas, y otros, 2016; CABI, 2021). *B. cockerelli* tiene un ciclo biológico que comprende las etapas de huevo, ninfa y adulto, determinadas por el efecto de la temperatura y la humedad relativa. Los huevos se adjuntan a la hoja, son de forma oblonga de color amarillo y las hembras generalmente pueden depositar en promedio de 231 (Ontiveros, 2012). Cuando se encuentran en la etapa de ninfa, pasan por cinco subetapas en un total de 21 días, donde su aspecto se va modificando hasta llegar a un color verdoso. Finalmente, en la etapa adulta, sus alas son transparentes y presentan un cuerpo negro con bandas blancas. Para diferenciar entre machos y hembras, se debe contar el

número de segmentos de cada insecto, cinco para hembras y seis para machos; adicionalmente se analiza el segmento genital (Bujanos & Ramos, 2015).

El psílido de la papa puede causar daños directos o tóxicos e indirecto, el primero se basa en la toxina de la saliva del insecto, provoca el daño a las células productoras de clorofila en las hojas de las plantas y, como consecuencia, las plantas se tornan amarillas y raquílicas (Ramírez, y otros, 2008). Por otro lado, los daños indirectos se deben a la transmisión de CaLso y fitoplasma, cuando el insecto introduce su aparato chupador y vierte enzimas digestivas en las células cribosas absorbiendo así los nutrientes juntamente con los patógenos, los cuales anidan en el lumen intestinal y se reproducen en las células epiteliales intestinales facilitando la dispersión hacia otras plantas (Reveles-Torres, Velásquez-Valle, & Mauricio-Castillo, 2014).

### **Identificación Molecular de Patógenos**

El diagnóstico preciso de las enfermedades presentes en las plantas se refiere a la determinación eficaz del agente causal, volviéndose un paso indispensable para el control del patógeno y así evitar pérdidas significativas en los cultivos (Cuervo, Espadas, & Zita, 2005).

Hasta hace algunos años, la detección de los patógenos estaba estrechamente ligada a métodos complejos que requerían de una experiencia amplia, habilidad y conocimiento de la taxonomía de los microorganismos tales como bacterias, hongos, virus y nematodos (Rivas, y otros, 2008). Tradicionalmente, la identificación se basaba en el aislamiento del ser biótico a partir del material vegetal infectado ya sea en medios selectivos o semi-selectivos (*in vitro*), la identificación fenotípica en base a su morfología mediante técnicas microscópicas, ensayos bioquímicos, y finalmente ensayos de patogenicidad sobre el tejido hospedero para confirmar los síntomas evidenciados al principio (Restrepo & Vargas, 2007).

En la actualidad, los avances en la biología molecular han permitido dar otro enfoque en los métodos para el diagnóstico de enfermedades con el uso de técnicas como la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) que presenta resultados más rápidamente, y minimiza tanto las pérdidas de los cultivos por las enfermedades como los costos para el tratamiento de las mismas; de igual forma, los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) han sido empleados para la detección de patógenos pero al ser una técnica costosa y laboriosa ha sido desplazada (Restrepo & Vargas, 2007; Rivas, y otros, 2008).

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

La técnica de PCR convencional fue descubierta en 1983 por Mullis con el propósito de amplificar un segmento de ADN en específico a partir de una cadena molde, este método permite obtener millones de réplicas de un fragmento diana de ADN sin importar la cantidad de ADN matriz que se tenga (Kadri, 2019; Zhu, y otros, 2020). La PCR requiere de cuatro componentes básicos: ADN molde, cebadores que flanquean la región de ADN deseada, polimerasa ADN y cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), como sustrato para la duplicación de las cadenas. Estos elementos son utilizados para la reacción que se somete a ciclos repetitivos para lograr la amplificación (Kadri, 2019).

Cada ciclo consta de tres etapas, la primera es la desnaturalización con el objetivo de separar las dos cadenas de ADN molde al elevar la temperatura a 94°C. La segunda es la hibridación, aquí los cebadores se pegan a la zona complementaria del ADN, por lo general, se usan temperaturas entre 40 y 70°C. La tercera etapa es la extensión, usualmente se realiza a 72°C y permite la síntesis de las nuevas cadenas de ADN mediante la Taq polimerasa de ADN. En teoría, cada ciclo duplica la cadena de

ADN, siendo necesarios entre 20 y 40 ciclos para sintetizar la cantidad necesaria de ADN para su análisis (Rivas, y otros, 2008; Kadri, 2019).

La amplificación del fragmento de ADN se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia y la calidad de los amplicones. Entre las principales aplicaciones de la PCR se destacan la detección de una secuencia de ADN a partir de un fluido biológico, la elaboración de huellas genéticas o para la identificación de variedades de especies animales, vegetales o microbianas; de igual forma se la emplea para control de calidad de alimentos, ensayos de diagnóstico, selección de variedades, entre otros (Zhu, y otros, 2020).

La detección de CaLso se ha visto limitada debido a que es una bacteria estrictamente ligada al floema, por ende, la PCR ha sido la técnica más utilizada para su identificación y, a su vez, para distinguir las especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, la eficiencia depende de la sensibilidad de los cebadores y los protocolos empleados (Delgado-Ortiz, y otros, 2019; Mirmajlessi, y otros, 2019)

### ***Polimorfismo de Simple Nucleótido (SNP)***

Los marcadores de ADN son de mucha ayuda tanto para el análisis filogenético y búsqueda de genes de interés como pruebas de trazabilidad de alimentos. La variación genética entre individuos de una especie es notable y estas son resultado de mutaciones ya sean por sustitución, deleción o inserción de los nucleótido (FAO, 2010).

Los polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) se encuentran entre las variaciones más comunes a nivel del genoma, son regiones de ADN en las que se presenta la sustitución de un nucleótido por otro. Es una herramienta utilizada para el análisis de genes de herencia biparental, diseño de mapas genéticos y detección de

variaciones genéticas dentro de una especie (Sherry, y otros, 2001; Cortés-López, Ordóñez-Baquera, & Domínguez-Viveros, 2019).

Se han definido varios haplotipos de CaLso mediante la amplificación y secuenciación de tres regiones genómicas como son el gen 16S, la región intergénica entre los genes 16S – 23S (IGS) y la región 50S que comprende los genes codificantes de proteínas ribosomales *rplJ* – *rplL*. Para determinar el haplotipo de la bacteria se realiza un análisis de SNPs en sitios específicos de estos amplicones (Haapaleinen, y otros, 2018; Secretariat of the International Plant Protection Convention, 2017).

### ***Secuenciación Sanger***

La secuenciación Sanger es un método desarrollado en 1977 con el propósito de determinar secuencias de fragmentos relativamente cortos del genoma. Actualmente, existen técnicas que permiten secuenciar genomas completos de forma rápida y económica, pero a pesar de esto, la secuenciación Sanger sigue siendo empleada para secuenciar fragmentos de amplicones obtenidos a través de una PCR (Franca, Carrilho, & Kist, 2002). La metodología consiste en la combinación del ADN molde con la polimerasa de ADN, cebadores, dNTPs y dideoxinucleótido (ddNTPs), estos últimos están marcados con fluoróforos distintos y provocan que la síntesis de la cadena de ADN se detenga. Para determinar la base respectiva y así conseguir la secuencia de ADN, se utiliza electroforesis capilar donde cada fragmento sintetizado pasa a través de una cámara que excita al fluoróforo correspondiente emitiendo así una fluorescencia con un color determinado revelando el tipo de nucleótido (Valderrama, Ortigosa, & Cañas, 2020; Franca, Carrilho, & Kist, 2002).

Si bien la detección de CaLso por medio de PCR es un paso clave para el control de la PMP, la secuenciación del fragmento 16S es indispensable para

comprobar que se tiene dicho microorganismo provocando la enfermedad (Mirmajlessi, y otros, 2019).

### **Hipótesis**

El análisis molecular permite la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de papa de la segunda generación provenientes de campo.

## Capítulo 3: Materiales y Métodos

### Colaboradores Científicos

- Director del proyecto: MSc. Alma Koch Kaiser, Docente – Investigadora, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.
- Codirector del proyecto: Valeria Ochoa Ph.D., Docente – Investigadora, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.
- Directora externa del proyecto: Carmen Castillo Ph.D., Investigadora, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

### Zona de Estudio

La presente investigación fue financiada por el proyecto “*Managing and Preventing the Spread of Potato Purple Top (PPT) Disease in Colombia, Ecuador and Perú*” del Centro Internacional de la Papa.

Los ensayos se realizaron en el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) bajo la tutela de Carmen Castillo Ph.D. Se trabajó conjuntamente con técnicos del laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB). Dichos laboratorios se encuentran en las instalaciones de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) – INIAP, ubicado en la Panamericana Sur Km 1, vía Tambillo, en el Cantón Mejía, Provincia de Pichincha. En las coordenadas 0°22'11.3"S y 78°33'06.0"W.

### Metodología

#### **Material Biológico**

El Departamento Nacional de Protección Vegetal proporcionó muestras de papa Var. Superchola sembradas en invernadero provenientes de tubérculos cosechados de plantas con síntomas de PMP de localidades de Machachi, San José de Minas, La Tola

y el Austro. Dichas plantas fueron sembradas en los invernaderos del Centro Internacional de la Papa, se les asignó un código de acuerdo a la localidad para su manejo e identificación dentro del laboratorio.

### ***Extracción de ADN***

El ADN de las plantas se extrajo utilizando el protocolo de extracción de ADN propuesta por Ferreira & Grattapaglia (1998).

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregaron peciolas y nervaduras centrales de las hojas de papa junto con 700 µl de *buffer* de extracción 2X CTAB (2g de CTAB, 10 mL de Tris HCl 1M ph 8, 138 mL de NaCl, 20 mL de EDTA 0.5M, 5 g de PVP), 200 µl de β-mercaptoetanol en un volumen final de 100 mL y se trituró la muestra con pistilos previamente estériles. Posteriormente, se incubaron las muestras a 65°C por 1 h invirtiendo cada 30 min para luego centrifugar a velocidad máxima por 15 min.

Se tomó el sobrenadante y se añadió 600 µl de CIA (cloroformo – alcohol isoamílico) en proporción 24:1, se homogeneizó y centrifugó a 13000 r.p.m. por 5 min, se tomó el sobrenadante y se repitió el proceso con la solución CIA. Luego, se añadió 400 µl de isopropanol incubando a -20°C durante 1 h y se centrifugó por 4 min a 13000 r.p.m.

Se retiró el isopropanol y se realizaron dos lavados con 1 mL de etanol al 70% al *pellet*, después se secó a temperatura ambiente por 1 h para luego resuspender el ADN en 100 µl de *buffer* TE 0.1M; las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

### ***Cuantificación de ADN y preparación de diluciones***

El ADN extraído de cada planta se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Epoch de Biotek Instruments© para medir la absorbancia a longitudes de onda de 260 y

280 nm y la concentración de ADN en ng/μl; para la calibración se utilizó como blanco 2 μl buffer TE 0.1 M.

Una vez cuantificada la concentración de ADN de las muestras, se procedió a diluir a una concentración de 10 ng/μl en agua destilada ultrapura.

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

En los ensayos de PCR convencional para la amplificación del gen 16S se utilizó el siguiente juego de cebadores OA2/OI2c, en el caso de la región intergénica 16/23S (IGS) se emplearon Lso TX 16/23F / Lso TX16/23R y los cebadores CL514F/CL514R para amplificar de los genes codificantes de proteínas ribosomales *rplJ* y *rplL* (Ver Tabla 3)

**Tabla 3**

*Cebadores utilizados en ensayos PCR convencional.*

<b>Fragmento</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5' – 3'</b>	<b>Referencia</b>
16S	OA2	GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA	(Liefiting, y otros, 2009)
	OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	
IGS	Lso TX 16/23F	AATTTTAGCAACTTCTAAGGG	(Ravindran, Levy, Pierson , & Gross, 2011)
	Lso TX 16/23R	GGTACCTCCCATATCGC	
	CL514F	CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT	
<i>rplJ</i>	CL514R	TATATCTATCGTTGCACCAG	(Munyanza, Sengoda, Crosslin, Lozano, & Sanchez, 2009)

### ***Detección de Candidatus Liberibacter solanacearum (CaLso)***

Para detectar la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se empleó los cebadores OA2/OI2c mediante una PCR convencional siguiendo las condiciones descritas por Liefiting et al. (2009), esperando obtener bandas de aproximadamente 1160 bp. Los componentes de la reacción se detallan en la Tabla 4 y las condiciones de amplificación en la Tabla 5.

**Tabla 4**

*Componentes de PCR para la detección de Candidatus Liberibacter solanacearum.*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>1 Rx (μl)</b>
Agua	-	-	26.2
Buffer	5x	0.5x	4
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2mM	3.2
dNTPs	10 mM	0.2mM	0.8
OA2	10mM	0.5mM	2
OI2c	10mM	0.5mM	2
Taq	5 U/μl	0.1325 U/μl	0.3
ADN	10 ng/μl	0.375 ng/μl	1.5
Volumen total de la reacción (μl)			40μl

**Tabla 5**

*Condiciones de amplificación para la detección de Candidatus Liberibacter solanacearum.*

<b>Actividad</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Desnaturalización inicial	1x	3 min	94
Desnaturalización		45 s	94
Alineamiento	35x	45 s	66
Extensión		1 min	72
Extensión Final	1x	10 min	72

Nota: Adaptado de (Liefting, y otros, 2009).

***Determinación del Haplotipo de Candidatus Liberibacter solanacearum (CaLso).***

Para determinar el haplotipo de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se utilizan polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) de tres zonas del genoma de la bacteria, el gen 16S, la región intergénica ARNr 16S – 23S y los genes codificantes de proteínas ribosomales *rplJ* y *rplL*. Para analizar el gen 16S se emplearon los cebadores OA2/OI2c descritos en la Tabla 3 y las condiciones de amplificación en la Tabla 5. En el caso de la región intergénica ARNr 16S – 23S se usaron los cebadores Lso TX 16/23F y Lso TX 16/23R descritos en la Tabla 3, los componentes y las condiciones de amplificación en la Tabla 6 y 7, respectivamente. Por último, los cebadores CL514F y CL514R (Ver Tabla 3) se utilizaron para la amplificación de los genes codificantes de proteínas ribosomales *rplJ* y *rplL*, los componentes y las condiciones de amplificación se encuentran descritas en la Tabla 8 y 9, respectivamente.

**Tabla 6**

*Componentes de PCR para la amplificación de la región 16S – 23S.*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>1 Rx (μl)</b>
Agua	-	-	12.4
Buffer	5x	1x	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5mM	2.5
dNTPs	10 mM	0.2mM	0.5
Lso TX 16/23F	10mM	0.5mM	1.25
Lso TX 16/23R	10mM	0.5mM	1.25
Taq	5 U/μl	0.02U/μl	0.1
ADN	10 ng/μl	0.8ng/μl	2
Volumen total de la reacción (μl)			25μl

**Tabla 7**

*Condiciones de amplificación para la región 16S – 23S.*

<b>Actividad</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Desnaturalización inicial	1x	30 s	98
Desnaturalización		10 s	98
Alineamiento	35x	20 s	55
Extensión		30 s	72
Extensión Final	1x	7 min	72

Nota: Adaptado de (Ravindran, Levy, Pierson , & Gross, 2011).

**Tabla 8**

*Componentes de PCR para la amplificación de los genes codificantes de proteínas ribosomales rplJ y rplL.*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	1 Rx ( $\mu$ l)
Agua	-	-	12.8
Buffer	5x	1x	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2mM	2
dNTPs	10 mM	0.4mM	1
CL514F	10mM	0.4mM	1
CL514R	10mM	0.4mM	1
Taq	5 U/ $\mu$ l	0.04 U/ $\mu$ l	0.2
ADN	10 ng/ $\mu$ l	0.8 ng/ $\mu$ l	2
Volumen total de la reacción ( $\mu$ l)			25 $\mu$ l

**Tabla 9**

*Condiciones de amplificación para los genes codificantes de proteínas ribosomales rplJ y rplL.*

Actividad	Repeticiones	Tiempo	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
Desnaturalización inicial	1x	30 s	94
Desnaturalización		30 s	94
Alineamiento	40x	30 s	53
Extensión		30 s	72
Extensión Final	1x	7 min	72

Nota: Adaptado de (Munyanza, Sengoda, Crosslin, Lozano, & Sanchez, 2009).

### ***Electroforesis***

La electroforesis de los ensayos de PCR se realizó en geles de agarosa al 2%, para ello, se disolvió la agarosa en buffer TAE 1x (Tris – Acetato – EDTA) y se agregaron 2  $\mu$ L del colorante de tinción SYBR® Safe DNA Gel Stain de Invitrogen. Una vez solidificado el gel, se cargaron 5  $\mu$ L de los productos PCR, 2  $\mu$ L del marcador de talla y se corrió a 100V por 30 min. El marcado utilizado fue TrackIt™ 100 bp DNA Ladder de Invitrogen (No. Catálogo: 110488058).

### ***Secuenciación Sanger***

Para la secuenciación de los amplicones se seleccionaron en total cuatro muestras positivas. Dos de ellas corresponden al sector de Machachi y las restantes al sector del Austro. La secuenciación Sanger se realizó en la empresa Macrogen (Korea), para ello, se trabajó con la empresa intermediaria IDgen, cuyos servicios incluyen el transporte, purificación y ensamblaje de secuencias. Se enviaron aproximadamente 20  $\mu$ L de cada amplicón y 10  $\mu$ L del respectivo cebador por cada cinco amplicones.

### ***Análisis Bioinformático***

La empresa IDgen proporcionó como resultados secuencias ensambladas que se analizaron en el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de la base de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) para encontrar el organismo homólogo correspondiente. Con el programa BioEdit, para el análisis de SNPs en las secuencias se realizó un alineamiento con secuencias encontradas en el GenBank de la base NCBI.

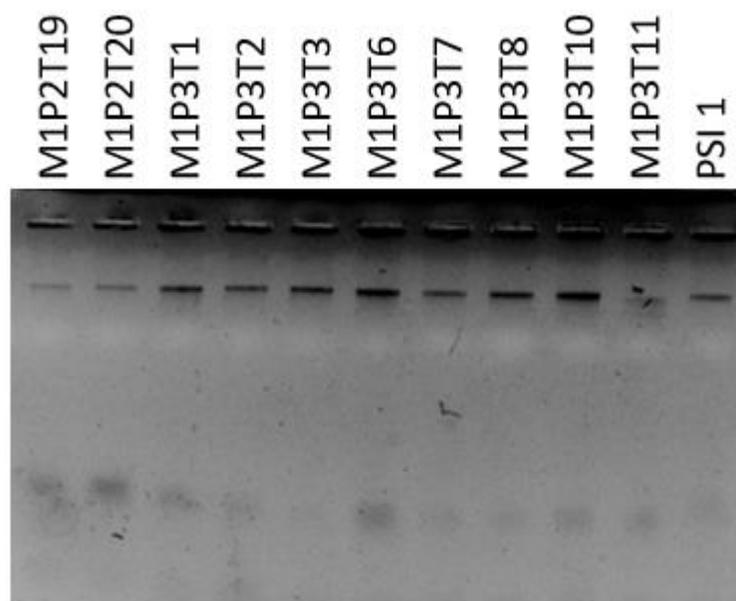
## Capítulo 4: Resultados

### Extracción y Cuantificación de ADN

La extracción del ADN de 123 de plantas de la segunda generación de papa var. Superchola mediante la metodología propuesta por Ferreira y Gratapalia (1998) permitió obtener concentraciones que varían desde los 100.25 hasta los 3988.74 ng/ $\mu$ l (Ver Anexo 1). Por otro lado, la pureza del ADN genómico medida con el radio 260/280 oscilaba entre 1.72 hasta 2.4. Para conocer la integridad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5% (Figura 1).

### Figura 1

*Electroforesis para analizar la integridad de ADN de las muestras.*



Nota: Gel de agarosa 1.5%; PSI 1 corresponde a una muestra de un insecto vector, las demás son muestras de papa.

### Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso)

Fenotípicamente, las plantas al inicio del experimento no presentaban síntomas, pero con el pasar de los meses la sintomatología clásica de la PMP se fue evidenciando (Figura 2).

#### Figura 2

*Sintomatología de PMP presente en plantas de segunda generación sembradas en invernadero.*

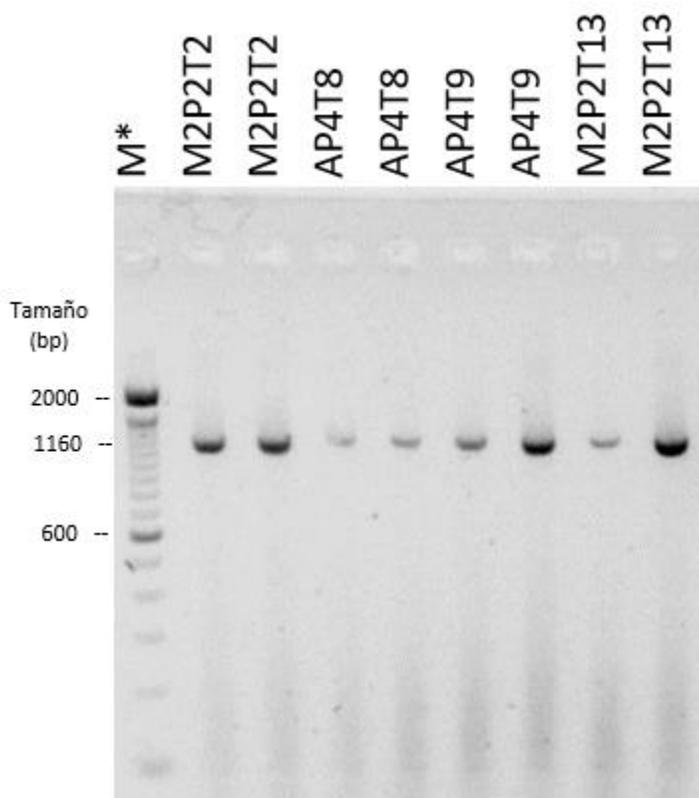


*Nota:* Plantas de papa con síntomas de PMP. A) Presencia de tubérculo aéreo. B) Coloración morada en las nervaduras de las hojas

Para la detección de CaLso mediante PCR se escogieron las muestras que presentaban una mayor concentración de ADN, se obtuvieron como resultado cuatro muestras positivas, dos de ellas pertenecen a la zona de Machachi y las restantes a la zona del Austro, con amplicones de aproximadamente 1160 pb (Ver Figura 3)

### Figura 3

*Electroforesis para la detección de CaLso en plantas de papa mediante la amplificación del gen 16S.*



Nota: Gel de agarosa al 2%. M\*: Marcador molecular de 100 bp; los demás carriles corresponden a las muestras positivas

### Identificación Molecular del Fragmento Amplificado

Mediante el uso de la herramienta BLAST se logró corroborar que las muestras amplificadas en la sección anterior correspondían a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, cada muestra presentó un porcentaje de identidad distinto como se puede evidenciar en la Tabla 10.

**Tabla 10**

*Resultados de la identificación molecular de las muestras evaluadas*

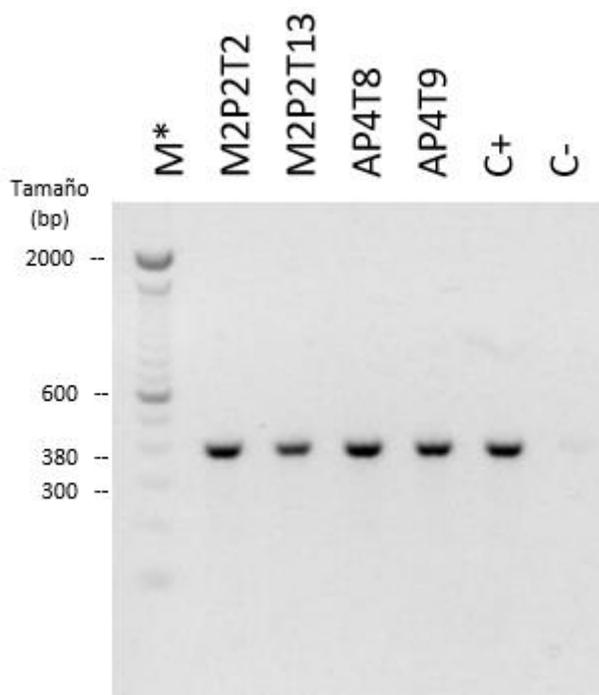
<b>Muestra</b>	<b>Homólogo identificado</b>	<b>Query coverage</b>	<b>E value</b>	<b>% de identidad</b>	<b>Número de accesión</b>
	<i>Candidatus</i>				
AP4T8	Liberibacter solanacearum	100%	0.0	99.21%	MH843709.1
	<i>Candidatus</i>				
AP4T9	Liberibacter solanacearum	100%	0.0	99.89%	MN396641.1
	<i>Candidatus</i>				
M2P2T2	Liberibacter solanacearum	100%	0.0	99.89%	MN396641.1
	<i>Candidatus</i>				
M2P2T13	Liberibacter solanacearum	100%	0.0	99.89%	MN396641.1

#### **Determinación del Haplotipo de *Candidatus* Liberibacter solanacearum (CaLso)**

Primero se realizó la amplificación de las regiones IGS y de los genes codificantes de proteínas ribosomales de CaLso como se puede observar en las Figuras 4 y 5, respectivamente.

**Figura 4**

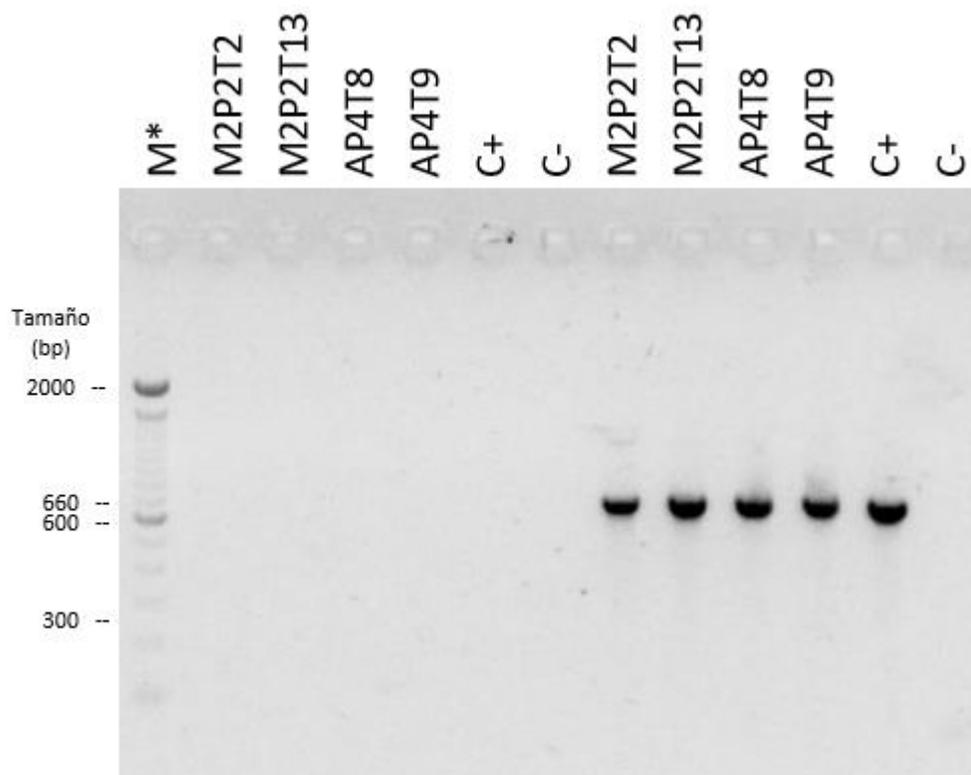
*Electroforesis del fragmento IGS de CaLso*



Nota: Gel de agarosa al 2%. M\*: Marcador molecular de 100bp; C+: control positivo; C-: Control negativo de la PCR.

**Figura 5**

*Electroforesis del amplicón que codifica las proteínas ribosomales de CaLso*

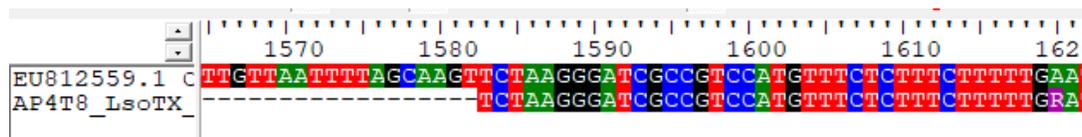


Nota: Gel de agarosa al 2%. M\*: Marcador molecular de 100 bp; C+: Control positivo; C- : control negativo de la PCR.

Para determinar el haplotipo de CaLso presente en las muestras analizadas, se realizó la identificación de SNPs en sitios específicos de los amplicones obtenidos siguiendo la guía descrita por Secretariat of the International Plant Protection Convention (2017). Para conocer la ubicación de los SNPs se realizaron alineamientos, la region IGS se sometió a un alineamiento con la secuencia del *GenBank* con número de accesión EU812559, por otro lado, la región que codifica las proteínas ribosomales se alineó con la secuencia EU834131 (Figura 6 y 7, respectivamente).

### Figura 6

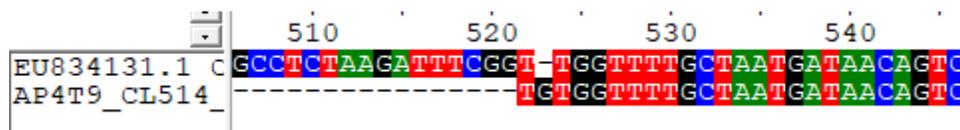
Secuencia de la muestra AP4T8 alineada con la secuencia parcial de la región intergénica 16S – 23S.



Nota: Alineamiento realizado en el programa BioEdit.

### Figura 7

Secuencia de la muestras AP4T9 alineada con la secuencia parcial de las proteínas ribosomales *rplJ* y *rplL*.



Nota: Alineamiento realizado en el programa BioEdit.

Se realizó una matriz para la comparación entre los haplotipos existentes y las muestras analizadas en la presente investigación, ver Tabla 11. La secuencia de la región codificante de las proteínas ribosomales de la muestra M2P2T2 presentó mala calidad y no se la considera en el análisis de SNPs para determinar el haplotipo (Ver Anexo 8).

Tabla 11

*Polimorfismos de simple nucleótido de los haplotipos y muestras de Candidatus*

*Liberibacter solanacearum*

Región	Posición del Nucleótido	Haplotipos de CaLso					Muestras				
		A	B	C	D	E	W	X	Y	Z	
16S	116	C	C	C	T	C	C	C	C	C	
	151	A	A	A	A	G	A	A	A	A	
	212	T	G	T	T	T	T	T	T	T	
	581	T	C	T	T	T	T	T	T	T	
	959	C	C	C	C	T	C	C	C	C	
	1049	A	A	G	G	A	A	A	A	A	
	1620	A	A	A	A	G	A	A	A	A	
	1632	A	A	A	A	G	G	G	G	G	
	1648	G	G	G	G	A	G	G	G	G	
	1742	A	A	A	G	A	A	A	A	A	
IGS	1748	C	C	C	T	C	C	C	C	C	
	1858	-	G	G	-	-	A	A	A	A	
	1859	-	T	-	-	-	T	T	T	T	
	1860	T	T	T	-	T	T	T	T	T	
	1873	A	A	A	A	G	A	A	A	A	
	1920	T	T	C	T	T	T	T	T	T	
	1943	G	A	G	G	NA	G	G	G	G	
	2055	C	T	C	C	NA	C	C	C	C	
	2081	G	G	G	A	NA	G	G	G	G	
	2218	G	A	G	G	NA	G	G	G	G	
<i>rplJ-rplL</i>	2260	C	T	C	C	NA	C	C	C	C	
	583	G	G	C	G	G	G	G	+	G	
	622	A	A	A	G	A	A	A	+	A	
	640	C	C	T	C	C	C	C	+	C	
	669	G	C	G	G	G	G	G	+	G	
	689	C	C	C	T	T	C	C	+	C	
	691	G	T	T	G	G	G	G	+	G	
	700	A	A	A	G	A	A	A	+	A	
	712	G	T	G	G	G	G	G	+	G	
	722	G	G	G	G	A	G	G	+	G	
749	C	C	C	A	C	C	C	+	C		
780	-	-	A	A	A	A	A	+	A		
786	G	A	G	G	G	A	A	+	A		
850	T	T	T	C	C	A	A	+	A		
909	T	C	C	C	C	T	T	+	T		
920	T	C	C	T	T	T	T	+	T		
922	-	-	TGT	-	-	G	G	+	G		
955	G	G	T	G	G	G	G	+	G		
987	T	G	G	G	G	T	T	+	T		
993	A	A	G	A	A	A	A	+	A		

Región	Posición del Nucleótido	Haplotipos de CaLso					Muestras			
		A	B	C	D	E	W	X	Y	Z
<i>rplJ-rplL</i>	1041	G	A	A	G	G	G	G	+	G
	1049	A	G	A	A	A	A	A	+	A
	1072	C	C	C	T	C	G	G	+	G
	1110	-	-	C	-	-	C	C	+	C
	1122	G	A	A	A	A	G	G	+	G
	1143	G	A	G	G	G	-	G	+	G

Nota: W: AP4T8; X: AP4T9; Y: M2P2T2; Z: M2P2T13. NA: no encontrado. "+": No

aplica. "-": gaps. Esta tabla ha sido adaptada de: (Secretariat of the International Plant

Protection Convention, 2017).

En base al análisis de los SNPs en las posiciones de la secuencia, recomendadas por bibliografía, se puede determinar que las muestras AP4T8, AP4T9 Y M2P2T13 corresponden al haplotipo A.

## Capítulo 5: Discusión

En las últimas décadas, la preocupación por la amenaza a la seguridad alimentaria a expensas de las invasiones biológicas ha ido en aumento debido a que existen pérdidas netas de miles de millones de dólares ya sea por alguna plaga o enfermedad que ataca a los cultivos (Wan, Wang, Ren , & McKirdy, 2020). La punta morada de la papa es una enfermedad que se encuentra en varios países del mundo como Estados Unidos y México, en Ecuador se han evidenciado los síntomas de la enfermedad desde el 2014 (Rubio, Cadena, & Vázquez , 2013; Rivadeneira, y otros, 2015).

En la presente investigación, se analizaron 123 plantas de segunda generación proveniente de campo, sembradas en invernadero, se observaron los síntomas característicos de PMP. A pesar de que uno de los síntomas de la enfermedad es tener tubérculos que no brotan, en estudios realizados por Pitman et al. (2010) se logró determinar que aproximadamente el 94% de los tubérculos infectados con CaLso brotan, lo cual indica una supervivencia extremadamente alta de estos aún al poseer el patógeno.

La PCR convencional es el método empleado comúnmente para la detección de patógenos (Mirmajlessi, y otros, 2019). Al realizar la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* mediante PCR, a pesar de tener un 100% de plantas sintomatológicas, se obtuvieron cuatro muestras positivas como se puede observar en la Figura 3. Esto podría deberse a que CaLso es una bacteria limitada al floema y su distribución dentro de la planta es variable lo cual impide un diagnóstico preciso del patógeno debido a que las hojas de las plantas no se infectan de forma uniforme como lo explica Cooper et al. (2015).

Se presume que los tubérculos en presencia de CaLso producen altas concentraciones de compuestos fenólicos como ácido clorogénico y ácido neoclorogénico para así contrarrestar la acción del microorganismo, provocando a su vez el oscurecimiento enzimático en las papas (Rashed, Wallis, Paerzold, Workneh, & Rush, 2012). Los fenoles son considerados como sustancias inhibitoras de la PCR debido a que se oxidan provocando la degradación de la polimerasa de ADN (Sepúlveda, 2014). Estos estudios referenciales podrían sustentar el porcentaje bajo de positividad en las muestras analizadas aún provenientes de plantas con síntomas de PMP en la presente investigación.

Las muestras correspondientes a los sectores de Machachi y el Austro fueron secuenciadas y posteriormente se realizó el análisis de homología mediante la herramienta de BLAST como se puede observar en la Tabla 10. La muestra AP4T8 presenta una homología con la secuencia descrita por Henrickson et al. (2019) con número de accesoión MH843709.1, donde los autores realizan el reporte de CaLso relacionado con la enfermedad *Zebra Chip* en Canadá. Por otro lado, las muestras AP4T9, M2P2T2 y M2P2T13 se alinearon con la secuencia reportada por Caicedo et al (2020) con número de accesoión MN396641.1, siendo el primer reporte del patógeno en el país y a nivel de Latinoamérica.

Para la identificación de haplotipos de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, se ha sugerido el análisis de polimorfismos presentes en la secuencia de tres regiones del genoma de la bacteria. Con base en la guía proporcionada por la Secretariat of the International Plant Protection Convention (2017) se determinó que las muestras AP4T8, AP4T9 y M2P2T13 corresponden aproximadamente el 90% al haplotipo A (Tabla 11). En el caso de la muestra M2P2T2, la secuencia correspondiente a la región codificante

de proteínas ribosomales *rpIJ* y *rpIL* presentaba pésima calidad lo cual impidió el análisis de los SNPs en los sitios descritos.

CaLso es una bacteria muy versátil al momento de infectar una planta, debido a que no solamente ataca a los cultivos de papa, sino que a su vez se la puede encontrar en zanahoria, apio, perejil, tomate de árbol y pimiento, entre otras; y pueden ser transmitidas por diferentes insectos vectores (Haapaleinen, y otros, 2018; Swisher & Garczynski, 2019). Se han definido algunos haplotipos de este patógeno basándose en SPNs en la región *rpIJ/rpIL* del gen de la proteína ribosoma 50S, la región intergénica 16S – 23S y el ARNr 16S y la versatilidad de la bacteria permite tener un haplotipo en diferentes zonas geográficas (Nelson, y otros, 2013).

Los haplotipos A y B son característicos de la región de América del Norte, Central, Nueva Zelanda, estos son transmitidos por *B. cockerelli* en papa, principalmente. El haplotipo C en el norte de Europa, y los Haplotipos D y E en el sur de Europa y en el sur de la región del Mediterráneo en cultivos de Apiáceas (Haapaleinen, y otros, 2018). Los haplotipos A y B son específicos de la familia solanácea, siendo los responsables de enfermedades como la PMP y *Zebra Chip* (Mora, y otros, 2021; Swisher & Garczynski, 2019). En Ecuador, se ha evidenciado la presencia de CaLso del haplotipo A según la investigación realizada por Caicedo y sus colaboradores en 2020, estos datos ayudan a comprobar la identificación del haplotipo en la presente investigación.

## Capítulo 6: Conclusiones

Mediante ensayos moleculares se detectó la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en cuatro muestras de plantas de papa de segunda generación, a pesar de que el 100% (123) de las plantas presentaron los signos de la enfermedad.

El uso de herramientas bioinformáticas confirmaron que los amplicones obtenidos mediante PCR convencional correspondían a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, la muestra AP4T8 corresponde a la secuencia con número de accesión MH843709.1 mientras que las muestras AP4T9, M2P2T2 y M2P2T13 a la secuencia MN396641.1, previamente reportadas en el GenBank.

El análisis de polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) determinó el haplotipo A de *Candidatus Liberibacter solanacearum* presente en las muestras AP4T8, AP4T9 y M2P2T2. Por otro lado, el haplotipo de la muestra M2P2T2 no se logró determinar debido a problemas de secuenciación.

## Capítulo 7: Recomendaciones

Mediante un análisis exhaustivo, determinar en diferentes niveles de la planta la muestra más representativa a estudiar para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Realizar ensayos con PCR en tiempo real debido a la complejidad de detección con los ensayos convencionales.

## Capítulo 8: Bibliografía

- Araujo, M., Catagena, Y., Castillo, C., Cuesta, X., Monteros, C., Paula, N., . . . Piedra, J. (2021). Manual del cultivo de papa para pequeños productores. *INIAP(78)*, 120.
- Banco Central del Ecuador. (octubre de 2019). *REPORTE DE COYUNTURA SECTOR AGROPECUARIO* . Obtenido de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201902.pdf>
- Bertaccini, A., Duduk , B., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5(12).
- Bujanos, R., & Ramos, C. (2015). *El psílido de la papa y tomate Bactericera (=Paratrioza) cockerelli (Sulc) (Himeptera: Triozidae): ciclo biológico; la relación con las enfermedades de las plantas y la estrategia del manejo integrado de plagas en la región del OIRSA*. Obtenido de <https://www.oirsa.org/contenido/Manual%20Bactericera%20Cockerelli%20version%201.3.pdf>
- CABI. (2021). *Invasi Species Compendium*. Obtenido de Bactericera cockerelli (tomato/potato psyllid): <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45643>
- Caicedo, J., Crizón, M., Pozo, A., Cevallos, A., Simbaña, L., Rivera, L., & Arahana, V. (2015). First repor of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' (16SrII) associated with potato purple top in San Gabriel-Carchi, Ecuador. *New Disease Reports*.

- Caicedo, J., Simbaña, L., Calderón, D., Lalangui, K., & Rivera-Vargas, L. (2020). First report of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' In Ecuador and in South America. *Australasian Plant Disease Notes*, 15(6). Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s13314-020-0375-0>
- Castillo, C., Fu, Z., & Burckhardt, D. (2019). First record of the tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli* from South America. *Bulletin of Insectology*, 85-91. Obtenido de <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol72-2019-085-091castillo-carrillo.pdf>
- Castillo, C., Paltrinieri, S., Buitron, J., & Bertaccini, A. (2018). Detection and molecular characterization of a 16Srl-F phytoplasma in potato showing purple top disease in Ecuador. *Australasian Plant Pathology*, 311-315.
- CONABIO. (2008). *Solanum tuberosum*. Obtenido de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914\\_sg7.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914_sg7.pdf)
- Cooper, W., Alcalá, P., & Barcenás, N. (2015). Relationship Between Plant Vascular Architecture and Within-Plant Distribution of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in Potato. *Springerlink*, 92, 91-99. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12230-014-9416-6>
- Cortés-López, N., Ordóñez-Baquera, P., & Domínguez-Viveros, J. (2019). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150-1173. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v11n4/2448-6698-rmcp-11-04-1150.pdf>
- Crizón, M. (2017). *IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL FITOPLASMA CAUSANTE DE LA PUNTA MORADA DE LA PAPA Y ENSAYOS DE RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA*. Obtenido de

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13057/1/T-UCE-0004-43-2017.pdf>

- Crosslin, J., Hamlin , L., Buchman , J., & Munyaneza, J. (2011). Transmission of Potato Purple Top Phytoplasma to Potato Tubers and Daughter Plants. *Springer*, 339-345. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Launa-Hamlin/publication/225680013\\_Transmission\\_of\\_Potato\\_Purple\\_Top\\_Phytoplasma\\_to\\_Potato\\_Tubers\\_and\\_Daughter\\_Plants/links/580a6adf08ae74852b5303f1/Transmission-of-Potato-Purple-Top-Phytoplasma-to-Potato-Tubers-and-Da](https://www.researchgate.net/profile/Launa-Hamlin/publication/225680013_Transmission_of_Potato_Purple_Top_Phytoplasma_to_Potato_Tubers_and_Daughter_Plants/links/580a6adf08ae74852b5303f1/Transmission-of-Potato-Purple-Top-Phytoplasma-to-Potato-Tubers-and-Da)
- Cuervo, Y., Espadas, M., & Zita, G. (2005). *Fitopatología*. Obtenido de Manual de prácticas de Ingeniería Agrícola:  
<http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/Fitopatologia.pdf>
- Delgado-Ortiz, J., Beltrán-Beache, M., Cerna-Chávez, E., Aguirre-Uribe, L., Landero-Flores, J., Rodríguez-Pagaza, Y., & Ochoa-Fuentes, Y. (2019). Candidatus Liberibacter solanacearum patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y control. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 1-12.
- Egúsquiza, R. (2013). *MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE PAPA*. Obtenido de <https://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/032-d-papa.pdf>
- FAO. (2010). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. Obtenido de <https://www.fao.org/3/a1250s/a1250s.pdf>
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción a uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético*. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN.

Franca, L., Carrilho, E., & Kist, T. (2002). A review of DNA sequencing techniques.

*Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(2), 169-200.

doi:10.1017/S0033583502003797

Haapaleinen, M., Wang, J., Latvala, S., Lehtonen, M., Pirhonen, M., & Nissinen, A.

(2018). Genetic Variation of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' Haplotype C and Identification of a Novel Haplotype form *Trioza urticae* and Stinging Nettle.

*Phytopathology*, 925-934. Obtenido de

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-12-17-0410->

[R?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-](https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-12-17-0410-R?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-)

[2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-12-17-0410-R?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)

Henrickson, A., Kalischuk, M., Lynn, J., Meers, S., Johnson, D., & Kawchuk, L. (2019).

First Report of Zebra Chip on Potato in Canada. *Plant Disease*, 103(5). Obtenido

de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-09-18-1576-PDN>

INIAP. (1997). *Memorias del curso: "Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades del cultivo de papa"*.

INIAP. (2018). *INIAP ejecuta un plan emergente frente a la presencia de Punta Morada*

*de la Papa en Ecuador*. Obtenido de <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/iniap->

[ejecuta-un-plan-emergente-frente-a-la-presencia-de-punta-morada-de-la-papa-en-ecuador/](http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/iniap-ejecuta-un-plan-emergente-frente-a-la-presencia-de-punta-morada-de-la-papa-en-ecuador/)

Jirón-Rojas, R., Nava-Camberos, U., Jiménez-Díaz, F., Alvarado-Gómez, O., Ávila-

Rodríguez, V., & García-Hernández, J. (2016). Densidades de *Bactericera*

*cockerelli* (Sulc) e Incidencia del "Permanente del Tomate" en Diferentes

Condiciones de Producción del Tomate. *Southwestern Entomologist*.

- Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Obtenido de <https://www.intechopen.com/chapters/67558>
- Lee, M., & Bottner, K. (2009). An Emerging Potato Purple Top Disease Associated with a New 16SrII Group Phytoplasma in Montana. *The American Phytopathological Society*, 93(9). Obtenido de [https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2009/September/Pages/93\\_9\\_970.2.aspx](https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2009/September/Pages/93_9_970.2.aspx)
- Liefting, L., Sutherland, P., Ward, L., Paice, K., Weir, B., & Clover, G. (2009). A new "Candidatus Liberibacter" species associated with diseases of solanaceous crop. *Plant Disease*, 208-214.
- Lin, H., Lou, B., Glynn, J., Doddapaneni, H., Civerolo, E., Chen, C., . . . Vahling, C. (2011). The Complete Genome Sequence of 'Candidatus Liberibacter solanacearum', the Bacterium Associated with Potato Zebra Chip Disease. *PLoS ONE*, 6(4). Obtenido de <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0019135&type=printable>
- Mejía, D. (2017). *Pérdidas poscosecha en la cadena de valor del rubro papa, un estudio de caso en la provincia del Carchi*. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14224/Tesis%20Pos%20cosecha%20Alejandro%20Mej%c3%ada%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Méndez, P., & Inostroza, J. (noviembre de 2009). *Manual de Papa para La Araucanía: Manejo de Cultivo, Enfermedades y Almacenaje*. Obtenido de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR36493.pdf>

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA. (2019). *Informe de Rendimientos*

*Objetivos: Papa 2019*. Obtenido de

<http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/informe-de-rendimientos-objetivos/rendimiento-de-papa>

Mirmajlessi, S., Sjolund , M., Mänd , M., Loiseau, M., Ilardi , V., Heasaert, G., . . .

Bertaccini, A. (2019). PCR-based diagnostic methods for 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' - Review. *Plant Protection Science*, 55(4), 229-242.

Obtenido de [https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/145\\_2018-PPS.pdf](https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/145_2018-PPS.pdf)

Mora, V., Ramasamy, M., Damaj, M., Irigoyen, S., Ancona, V., Ibanez, F., . . . Mandadi,

K. (2021). Potato Zebra Chip: An Overview of the Disease, Control Strategies, and Prospects. *frontiers in Microbiology*, 12. Obtenido de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8339554/pdf/fmicb-12-700663.pdf>

Munyanenza, J., Sengoda, V., Crosslin, J., Lozano, G., & Sanchez, A. (2009). First

Report of 'Candidatus *Liberibacter psyllae*' in Potato Tubers with Zebra Chip Disease in Mexico. *APS Publications*. Obtenido de

[https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-93-5-0552A?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-93-5-0552A?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)

Nelson, W., Sengoda , V., Alfaro, A., Font , M., Crosslin , M., & Munyanenza, J. (2013). A

new haplotype of "Candidatus *Liberibacter solanacearum*" identified in the Mediterranean region. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 633-639.

Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0121-3?shared-article-renderer>

Noroña, J., & Tipanquiza, J. (2010). *EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO EN EL CULTIVO DE PAPA (Solanum tuberosum) VARIEDADES "INIAP-NATIVIDAD;*

*INIAP-ESTELA"; VERSUS UN TESTIGO, LA VARIEDAD TRADICIONAL "BOLONA" EN EL CANTÓN PAUTE PROVINCIA DEL AZUAY.*

Ontiveros, G. (2012). *DETECCIÓN DE 'Candidatus Liberibacter solanacearum' EN PAPA Y TOMATE EN LOS ESTADOS DE NUEVO LEÓN Y SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO.* Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/3115/1/1080256471.pdf>

Paspuezán, M. (2019). *Daños de Bactericera cockerelli en el cultivo de papa (Solanum tuberosum), en el barrio Elloy Alfaro, Parroquia La Libertad.* Obtenido de <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/7190/E-UTB-FACIAG-ING%20AGRON-000198.pdf;jsessionid=F8C63471DAE064DB7890DBD242F313C8?sequence=1>

Pitman, A., Drayton, G., Krabberger, S., Genet, R., & Scott, I. (2010). Tuber transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' and its association with zebra chip on potato in New Zealand. *Springer*, 389-398. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Ian-Scott-11/publication/226211052\\_Tuber\\_transmission\\_of\\_%27Candidatus\\_Liberibacter\\_solanacearum%27\\_and\\_its\\_association\\_with\\_zebra\\_chip\\_on\\_potato\\_in\\_New\\_Zealand/links/5676108908ae0ad265c0df77/Tuber-transmission-of-Cand](https://www.researchgate.net/profile/Ian-Scott-11/publication/226211052_Tuber_transmission_of_%27Candidatus_Liberibacter_solanacearum%27_and_its_association_with_zebra_chip_on_potato_in_New_Zealand/links/5676108908ae0ad265c0df77/Tuber-transmission-of-Cand)

Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2002). *EL CULTIVO DE LA PAPA EN ECUADOR.*

Ramírez, M., Santamaría, C., Méndez, J., Ríos, J., Hernández, J., & Pedro, J. (2008). *EVALUACIÓN DE INSECTICIDAS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DE PARATRIOZA (Bactericera cockerelli B. y L.) (HOMOPTERA: TRIOZIDAE) EN EL CULTIVO DE CHILE JALAPEÑO (Capsicum annum L.).* *Chapingo Serie Zonas Áridas*, 7(1), 47-56. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4555/455545066007.pdf>

- Rashed, A., Wallis, M., Paerzold, L., Workneh, F., & Rush, C. (2012). Zebra Chip Disease and Potato Biochemistry: Tuber Physiological Changes in Response to 'Candidatus Liberibacter solanacearum' Infection Over Time. *Bacteriology*, 103(5), 419-426. Obtenido de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-09-12-0244-R>
- Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., & Gross, D. (2011). Development of Primers for Improved PCR Detection of the Potato Zebra Chip Pathogen, 'Candidatus Liberibacter solanacearum'. *Plant Disease*, 95(12), 1542-1546. Obtenido de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-05-11-0386>
- Restrepo, S., & Vargas, Á. (2007). Biotecnología: Herramienta de diagnóstico de enfermedades de plantas. *PALMAS*, 28, 366-372. Obtenido de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1272/1272>
- Reveles-Torres, L., Velásquez-Valle, R., & Mauricio-Castillo, J. (octubre de 2014). *FITOPLASMAS: OTROS AGENTES FITOPATÓGENOS*. Obtenido de <http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/aFitopatogenos.pdf>
- Reveles-Torres, L., Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., Salas-Muñoz, S., & Mauricio-Castillo, J. (diciembre de 2016). *CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM: UN NUEVO FITOPATOGENO EN EL CULTIVO DE CHILE EN EL NORTE CENTRO DE MÉXICO*. Obtenido de <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/LiberibacterSolanacearum.pdf>
- Rivadeneira, J., Bolaños, C., Garcés, S., Tello, C., Bonilla, V., Ochoa, J., . . . Cuesta, X. (2015). ¿La Punata Morada de la Papa en la Sierra Norte del Ecuador? *Memorias del VI congreso Ecuatoriano de la papa*, 79-81.

- Rivas, E., de Armas, Y., Barreto, R., Hernández, L., Ramírez, M., Espinosa, L., & Medina, R. (2008). El diagnóstico y su papel en la fitoprotección. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 12(35), 47-54. Obtenido de [https://www.utm.mx/edi\\_anteriores/temas035/3%20nota-35.pdf](https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas035/3%20nota-35.pdf)
- Rubio, O., Almeyda, I., Ireta, J., Sánchez, J., Fernández, R., Barbón, J., . . . Cadena, M. (2006). DISTRIBUCIÓN DE LA PUNTA MORADA Y *Bactericera cockerelli* Sulc. EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE PAPA EN MÉXICO. *Agricultura Técnica en México*, 32(2), 201-2011. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/agritm/v32n2/v32n2a8.pdf>
- Rubio, O., Cadena, M., & Vázquez, G. (Diciembre de 2013). *Manejo integrado de la punta morada de la papa en el Estado de México*. Obtenido de [https://www.academia.edu/18293662/Manejo\\_integrado\\_de\\_la\\_punta\\_morada\\_de\\_la\\_papa\\_en\\_el\\_estado\\_de\\_Mexico](https://www.academia.edu/18293662/Manejo_integrado_de_la_punta_morada_de_la_papa_en_el_estado_de_Mexico)
- Secretariat of the International Plant Protection Convention. (2017). DP 21: 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*'. *Diagnostic Protocols*. Obtenido de [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2017/04/DP\\_21\\_2017\\_En\\_2017-03-31.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2017/04/DP_21_2017_En_2017-03-31.pdf)
- Sepúlveda, C. (2014). *Comparación de la inhibición de la reacción en cadena de la polimerasa según la extracción de DNA de *Cryptosporidium* spp.* Obtenido de <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132082/Comparacion-de-la-inhibicion-de-la-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-segun-la-extraccion-de-DNA-de-Cryptosporidium-spp.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Los%20inhibidor>

- Sherry, S., Ward, M., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29, 308-311. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>
- Swisher, K., & Garczynski, S. (2019). Identification of a New Haplotype of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in *Solanum tuberosum*. *Plant Disease*, 103, 468-474. Obtenido de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-06-18-0937-RE>
- Tang, X.-T., & Tamborindeguy, C. (2021). Identification of Autophagy-Related Genes in the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* and Their Expression Profile in Response to 'Candidatus Liberibacter Solanacearum' in the Gut. *Insects*, 12. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8708441/pdf/insects-12-01073.pdf>
- Valderrama, J., Ortigosa, F., & Cañas, R. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera Generación. *Encuentros en la Biología*, 8(173), 19-25. Obtenido de [http://www.encuentros.uma.es/assets/journals/13/173singles/173.7\\_secuenciacion.pdf](http://www.encuentros.uma.es/assets/journals/13/173singles/173.7_secuenciacion.pdf)
- Wan, J., Wang, R., Ren, Y., & McKirdy, S. (2020). Potencial Distribution and the Risk of *Bactericera cockerelli* and Its Associated Plant Pathogen *Candidatus Liberibacter Solanacearum* for Global Potato Production. *Insects*, 11(5), 298. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291056/>
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Lassaková, S., Korabecná, M., & Neuzil, P. (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 69(4). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7439763/>

## Capítulo 9: Anexos