

UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* como posible agente causal de la enfermedad llamada “Papa Rayada” en cultivos de papa, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Trabajo de Investigación presentado por
Amalia Rosa López Montiel
para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala

2011

Determinación de la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* como posible agente causal de la enfermedad llamada “Papa Rayada” en cultivos de papa, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* como posible agente causal de la enfermedad llamada “Papa Rayada” en cultivos de papa, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Trabajo de Investigación presentado por
Amalia Rosa López Montiel
para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala
2011

Vo. Bo.



Lic. Andrés Ávalos, asesor

Tribunal examinador:



Lic. Andrés Ávalos



M.Sc. Claudia Toledo



Licda. Margarita Palmieri

Fecha de aprobación: Guatemala, 30 de noviembre de 2011.

PREFACIO

Estudios como éste, en el que no se tiene suficiente información acerca de la enfermedad en cuestión y en el que se intenta hacer un acercamiento a su detección, involucran muchas limitantes que sin el apoyo de expertos en la materia, el desarrollo de este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a Licda. Margarita Palmieri y Licda. Elena Dardón por su asesoría, orientación, paciencia y revisión tanto de la parte experimental como la escrita de este proyecto.

A MSc. Claudia Toledo, por su instrucción y orientación en los inicios del estudio. Gracias por tu amistad, compañía y paciencia durante este tiempo.

Asimismo deseo agradecer a Wilfredo López por su alegría, entusiasmo y apoyo en las giras de campo al interior del país, así como en el trabajo del laboratorio.

A Leyda Hernández por su compañerismo en el laboratorio y por sus innumerables favores. Gracias por sus protocolos y reactivos que hicieron que en varias ocasiones este proyecto pudiera salir adelante.

A Lic. Andrés Ávalos por su orientación en el laboratorio y por prestarme de vez en cuando su tarjeta de memoria para poder guardar las fotos de los geles de agarosa.

A Ph.D. Judith K. Brown por compartir sus conocimientos a este proyecto.

Al departamento de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala por su apoyo económico al proyecto, el cual forma parte de las áreas de investigación del mismo. También gracias a todo el personal del Departamento, en el cual he realizado este estudio.

A mis compañeros y amigos por acompañarme en mis momentos de alegría, tristeza y frustración durante el proyecto. Gracias por sus palabras de ánimo.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, hermanos y hermana por su amor, interés y apoyo incondicional en cada aspecto de mi vida. Gracias a mis padres por educarme valores y principios que me han llevado a buscar no sólo mi propio bien sino también el de los demás. Gracias a mis hermanos por ser mi modelo a seguir y a mi hermana por su compañía y sentido del humor que hizo de aquellos días cansados, días más agradables.

¡Infinitas gracias a todos!

ÍNDICE

PREFACIO	
INDICE GENERAL	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes	2
B. Justificación	11
C. Objetivos	11
II. MÉTODOS	13
III. RESULTADOS	20
A. Pequeño estudio piloto para la determinación de la parte o partes vegetativas de la planta de papa que mejor expresan la presencia del agente causal de la enfermedad	20
B. Optimización de la técnica de PCR convencional para la detección de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en plantas	21
C. Comparación de la eficiencia del método de extracción CTAB en cuanto a la concentración del ADN extraído con respecto al DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen	24
D. Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	26
IV. DISCUSIÓN	33
V. CONCLUSIONES	39
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. LITERATURA CITADA	42
VIII. APÉNDICES	47
1. Extracción de ADN: DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen	47
2. Extracción de ADN: CTAB	49
3. Fotografías de la gira de campo a Quetzaltenango y San Marcos Guatemala	50
4. Fotografías de la gira de campo a Sololá, Guatemala.	53
5. Datos de la localidad, variedad y síntomas de las muestras de tubérculos provenientes de los departamentos de Quetzaltenango y San Marcos, Guatemala	55
6. Integridad de las muestras No. 351H, 351V, 353H, 353V, 354H, 354V, 355V, provenientes de plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en Febrero 2011, H y V corresponden a las partes vegetativas analizadas: Hojas y vena central.	56
7. Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en el Caserío San Isidro, Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011	57

7 .Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011	58
8.Muestra No. 312 T, tubérculo presentando las manchas café características de papa rayada. A. Tubérculo Entero; B Corte transversal del tubérculo para mostrar la sintomatología	58

LISTA DE CUADROS

1 Valores nutricionales para 100 g. de papa	4
2 Producción y exportación de papa durante los años 2005 a 2009	
3 Datos de los cebadores utilizados	17
4 Mezcla de PCR para un volumen total de 25 µl	18
5 Resultados del estudio piloto para determinar las diferentes partes vegetativas de la planta de papa en las que se detecto exitosamente el agente causal de papa rayada	20
6 Comparación de los análisis moleculares de tubérculos de papa, en su mayoría con síntomas para papa rayada, utilizando dos métodos de extracción.	25
7 Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con la presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .	27
8 Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con la presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .	28
9 Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con la presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .	29
10 Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con la presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .	30
11 Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con la presencia de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> .	31

LISTA DE FIGURAS

1	Tubérculos presentando los síntomas de la enfermedad y papalinas provenientes de tubérculos infectados (Mynyanenza ET ak 2007)	8
2	Plantas de papa presentando síntomas	9
3	Diagrama de flujo de cada uno de los procedimientos llevados a cabo para cumplir con los objetivos del estudio	13
4	Optimización de la técnica de PCR para papa rayada utilizando diferentes concentraciones de MGCL2	21
5	Comparación de los productos amplificados utilizando los cebadores	22
6	Rendimiento de cebadores OA2/Oi2c bajo las condiciones: Temperatura de anillamiento 55º	23
7	Rendimiento de cebadores OA2/Oi2c. bajo las condiciones: Temperatura de anillamiento 55º, 1.5 mm mgcl2, 1µl DE adn Y A 0.3 mm, b. 0.2 mm, de cada primer. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 PB. Las muestras amplificadas, T1 y T3, corresponden a tubérculo E. Escalera 1KB NOVAGEN y C: Blanco	23
8	Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a una temperatura de hibridación de 65ºC, amplificando con la pareja de cebadores LIB OA2/lic IOA2C. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 PB. Las muestras utilizadas corresponden a tubérculos de papa provenientes de Sololá, Guatemala. E. Escalera de 1KB Promega; C+: Control positivo y C-: Blanco	24
9	A. Muestras No 351,353,353 y 335 de hojas (H) y vena central (V) con síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con barridos muy fuertes, indicando ADN degradado. B. Control positivo degradado para una mejor visualización de cómo se verían las muestras positivas para Ca. L. solanacearum.	32

LISTA DE IMÁGENES

1	Campo de cultivo de papa de las variedades FL 1867 y Atlantic. Urbina, Quetzaltenango	50
2	Dos plantas de papa mostrando un tallo ya lignificado	
3	Tubérculos de papa recién desenterrados y tubérculo con corte transversal mostrando presencia de papa rayada	50
4	Presencia de tubérculo aéreo en un planta de papa	51
5	Paratiza en un envés de una hoja de la planta de papa	51
6	Campo de cultivo de papa variedad FL 1867. INDECA, Quetzaltenango	51
7	Campo de cultivo de papa de la variedad FL 1867. La Laguna, San Marcos	52
8	Campo de cultivo de papa de la variedad Loman. Cerezos, Serchil, San Marcos	52
9	Flor de la planta de papa	53
10	Planta de papa presentando encartuchamiento, clorosis y quemaduras en las hojas y tubérculos aéreos	53
11	Campo de cultivo de papa de la variedad Loman, Caserío San Isidro, Sololá	54
12	Campo de cultivo de papa, de la variedad Loman, Monte Mercedes, Sololá	54
13	Campo de cultivo de papa de la variedad Loman, Escuela de Formación Agrícola (EFA), Sololá	54
14	Campo de cultivo de papa de la variedad Loman, San José Chacaya, Cantón Shuashek, Sololá	55

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo principal determinar la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*Ca. L. solanacearum*) como posible agente causal de la enfermedad de Papa Rayada en cultivos de papa de Guatemala. La Papa Rayada, denominada así por los síntomas característicos que incluyen presencia de rayas negras necróticas o café obscuras al cortar los tubérculos, es una enfermedad que en poco tiempo ha ocasionado graves problemas a los productores de papa.

Este estudio se llevó a cabo entre diciembre 2009 y julio 2011. En la primera fase, se llevó a cabo un estudio piloto para probar la parte vegetativa de la planta de papa que es consistente en la detección de *Ca. L. solanacearum*. En la segunda fase, se realizaron dos giras de campo. La primera en agosto de 2010 a campos de cultivo de papa de los departamentos de Quetzaltenango y San Marcos, Guatemala; y la segunda en febrero de 2011, al departamento de Sololá, Guatemala. En ambas giras, se recolectaron plantas sintomáticas de las cuales se procesaron partes vegetativas como hojas, vena central y tubérculos y analizados, posteriormente, mediante técnicas moleculares.

Siendo el enfoque del estudio el encontrar un método reproducible y fiable para determinar la presencia de *Ca. L. solanacearum*, se optimizó la técnica de PCR, el cual permitió la visualización de bandas de amplificación claras. Asimismo, se determinó que de los dos métodos utilizados para la extracción de ADN: CTAB y DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, el primero es el que permite llevar a cabo una extracción de ADN rápida y más eficiente. Además, su uso ayuda a reducir los costos del laboratorio ya que el kit de Qiagen hay que importarlo, es muy caro y tarda mucho tiempo en ser recibido desde su origen. Por otro lado, aunque las muestras de plantas de papa analizadas en su mayoría

presentaban los síntomas característicos de la enfermedad, solamente una muestra, un tubérculo manifestando el rayado café, resultó positivo para *Ca. L. solanacearum*.

ABSTRACT

The principal objective of this study was to determine the presence of *Candidatus Liberibacter solanacearum* (*Ca. L. solanacearum*) as the causal agent of the zebra chip (ZC) disease in potato plants crops of Guatemala. Zebra chip, known like this because of its characterized symptoms in tubers defined by the presence of necrotic black or dark brown rays when they are cut, is a disease that in a short length of time has cause severe problems to all potato growers.

This study was carried out from December 2009 to July 2011. In the first phase, a pilot study was performed in order to try which part of the potato plant detected better the presence of *Ca. L. solanacearum*. In the second phase, two field trips were done, the first one on August 2010 in potato fields from Quetzaltenango and San Marcos, Guatemala; and the second one on February 2011 in San Marcos, Guatemala. In both field trips, symptomatic plants were collected from potato fields. Subsequently, plant parts as leaves, midribs and tubers were processed and analyzed through molecular techniques.

Being the approach of the study to find a new reproducible and reliable method for determine the presence of *Ca. L. solanacearum*, the polymerase chain reaction (PCR) was optimize, which permitted the visualization of clear amplification bands. Also, it was determined that for both DNA extraction methods: CTAB and DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), CTAB is the method that allows to carry out a rapid and more efficient DNA extraction. As well, its use helps to reduce the laboratory costs. On the other hand, although the analyzed samples of potato plants were mostly presenting ZC symptoms, only one sample, a tuber with the characterized dark stripes, resulted positive for *Ca. L. solanacearum*.

I. INTRODUCCIÓN

La papa, *Solanum tuberosum*, es un cultivo con una distribución muy amplia que constituye una fuente importante para la economía agraria. Sin embargo, enfermedades como la papa rayada pueden ocasionar serios problemas económicos para todos aquellos que la consideran como fuente de ingresos, no sólo para las grandes empresas productoras de papalinas sino también para los comerciantes locales. En este caso, la enfermedad provoca que la papa no sea apta para su comercialización debido a la formación de un patrón de rayas necróticas en el tubérculo ocasionada por un organismo tipo bacteria (Bacteria Like Organism, BLO por sus siglas en inglés), *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Se denomina Papa Rayada debido a que los tubérculos presentan un patrón de rayas cuando son procesados para producir papas fritas, coloración resultante de la conversión de almidón en azúcares, las cuales al someterse a cocción se vuelven oscuras (Market Access Solutionz 2008). Los síntomas que exhiben las plantas infectadas incluyen: clorosis, tallos torcidos con apariencia en zigzag, nódulos agrandados, tubérculos aéreos, decoloración vascular y, hojas calcinadas y marchitas que llegan prematuramente a la senescencia. Además, los tubérculos presentan estolones hundidos, a menudo de un color rosado (Crosslin y Munyaneza 2009; Lin *et al.* 2009; Secor *et al.* 2009). El síntoma característico y que separa a la enfermedad de otras, lo constituye una coloración café en el aro vascular y rayos medulares, que se extienden a lo largo del tubérculo. Asimismo, éstos muestran una pobre o nula germinación como resultado de la muerte de las lenticelas (Lin *et al.* 2009). La enfermedad induce la necrosis del tubérculo y compromete los vasos del floema (Secor *et al.* 2009) y constituye una condición letal para las plantas de papa (Wen *et al.* 2009).

2009). Según la evidencia, el agente causal de la enfermedad tiene como vector al psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* Sulc (Secor *et al.* 2009). Este psílido es alimentador polífago de floema que posee una amplia variedad de hospederos, incluyendo especies en 20 familias de plantas, pero son las especies de Solanaceae, tomate y papa, sus preferidas.

Como resultado de la infestación de psílicos y el desarrollo de la enfermedad, uno de los efectos primarios es la reducción en la fotosíntesis que altera el metabolismo del azúcar dentro del tubérculo (Gao *et al.* 2009). Aunque no se ha determinado el agente causal de la enfermedad, recientemente se ha implicado una nueva especie de *Candidatus Liberibacter: Ca. L. solanacearum*; pero su rol en la expresión de la enfermedad es aún confuso (Crosslin y Munyaneza 2009).

Para el diagnóstico del agente causal se han desarrollado un número de sets de cebadores utilizando la técnica de PCR convencional, PCR en tiempo real y PCR múltiplex. Se ha visto que, dependiendo de la muestra, los ensayos de PCR convencional son capaces de detectar *Ca. L. solanacearum* (Wen *et al.* 2009). Sin embargo, en los últimos años el PCR en tiempo real se ha convertido en el método más sensible y preciso para la detección y cuantificación de patógenos de plantas. Asimismo, los ensayos con PCR múltiplex han mostrado potencial como una herramienta muy valiosa para la detección temprana, identificación y cuantificación de *Ca. L. solanacearum* (Wen *et al.* 2009; Li *et al.* 2009).

A. Antecedentes

1. Historia del cultivo de la papa. Estudios indicando la distribución de las primeras papas cultivadas y de las especies silvestres más parecidas a ellas han permitido conocer dónde se comenzó a cultivar esta hortaliza. Siendo la región del lago Titicaca y en las altas mesetas de la cordillera de los Andes las primeras áreas cultivadas. El descubrimiento de la papa por parte de los conquistadores españoles fue hasta el año

1537, en el pueblo andino de Socorota. En 1570 la papa es introducida por primera vez a Europa continental a través del puerto de Sevilla; y en 1600, ya había entrado a Italia, Austria, Bélgica, Holanda, Francia, Suiza, Inglaterra, Alemania, Portugal e Irlanda, gracias al intercambio de tubérculos entre botánicos o nobles (Arce 2002).

En 1596, Luizo Gaspond Baukin, botánico suizo, nombra a la papa como *Solanum tuberosum*, nombre que tuvo implicaciones negativas por la relación que empezó a tener con otras plantas de la familia Solanaceae, que contenían alcaloides. Debido a las guerras y al hambre, la papa se extendió por Europa y el resto del mundo. Llegando a Norteamérica, no por Suramérica, sino por Europa; siendo la primera introducción en 1621 a la capital de Virginia, Jamestown, y la segunda introducción en 1719 a través de New Hampshire (Arce 2002).

2. Sistemática y biología de la papa. La papa pertenece a la familia de las solanáceas y es una planta herbácea que produce tubérculos, los cuales constituyen su parte comestible. Las papas cultivadas, en su mayoría, tienen cuatro juegos de cromosomas (tetraploides), doce cromosomas por cada juego. Sin embargo hay especies que son diploides, triploides, pentaloides y hexaploides (Arce 2002).

La papa es una hierba perenne, robusta, de 0.40 a 1.4 m de alto. Los tallos pueden medir de 30 a 60 cm de largo y pueden ser gruesos o débiles, erectos, alados, pubescentes o glabros, de color verde a púrpura. Las hojas son imparipinnadas y alternas de 10 a 25 cm de largo. Puede haber de 5 a 9 folíolos enteros, agudos, ovalados, peciolados, a menudo con folíolos pequeños en los peciolo. Algunas veces se presentan folíolos intersticiales. Las flores se encuentran en inflorescencias con un cáliz de hasta 8 cm de largo y campanulado. Los pétalos tienen un diámetro de 2 a 4 cm. Están presentes 5 estambres; el ovario es bilocular, los óvulos son numerosos, el estilo es delgado y el estigma es capitado. El color de las flores puede ser blanco, rosa, púrpura o azul y generalmente la planta presenta una sola inflorescencia por tallo y cada inflorescencia concentra entre 4 y 25 flores (CONABIO 2008).

El fruto es una baya carnosa, globosa, cónica u ovoide de 1 a 3 cm de diámetro y de color verde amarillento a pardo rojizo o púrpura. El número de frutos por planta es de 40 a 120. En cuanto a las semillas, éstas son pequeñas, numerosas, ovales y comprimidas de color blanco, amarillo o pardo amarillo. Además, todas las solanáceas contienen un alcaloide tóxico, la solanina, presente en todas las partes verdes de la planta: hojas, tallos, flores, frutos y tubérculos verdes (CONABIO 2008).

La reproducción de la papa es generalmente de manera asexual a través de tubérculos. Otras formas de reproducción asexual incluyen la clonación y estolones, aunque en menor grado. El tubérculo se forma por el hinchamiento de los tallos subterráneos modificados, estolones, en los que se acumulan productos de reserva (CONABIO 2008), entre ellos almidón; así como vitamina C, vitamina del complejo B6, una pequeña porción de proteína y varios minerales. Además, presenta un alto contenido de carbohidratos, lo que la convierte en un alimento de alto valor energético (Borba 2008). La reproducción sexual ocurre a través de la semilla y es utilizada principalmente en programas de mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades (CONABIO 2008).

Cuadro 1
Valores nutricionales para 100 g de papa.

Valor nutricional para 100 g de papa	
Agua	77.00 g
Fibra	1.80 g
Proteína	1.87 g
Carbohidratos	20.13 g
Lípidos	0.10 g
Vitamina C	13 mg
Hierro	0.31 mg
Calcio	5 mg
Fósforo	44 mg
Valor calórico	87 kcal

Fuente: Borba (2008)

3. Cultivo. El cultivo, para su desarrollo, necesita un clima con temperaturas medias entre 15 y 20°C; y una precipitación aproximada de 500 mm, la cual debe distribuirse bien durante el ciclo de cultivo. Otro factor importante es el suelo. Los tubérculos prefieren un suelo franco-arenoso, franco-arcilloso, así como una estructura granular en el primer horizonte del perfil (Miranda y del Valle 1983). De igual manera, el nivel de pH del suelo es otro factor importante, éste debe ser ligeramente ácido, con un buen contenido de arcilla (20%), buen estado de fertilidad y permeabilidad. Además, para obtener un alto rendimiento en el cultivo de la papa, los niveles de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio en el suelo deben de estar dentro de cifras equilibradas. Asimismo cantidades pequeñas pero necesarias de micronutrientes como azufre, hierro, manganeso, boro, cobre, zinc, molibdeno y cloro, deben estar presentes para que la planta los asimile. Otro factor lo constituye la humedad del suelo ya que ésta permite la producción de raíces; la suficiente disponibilidad de agua permite que el cultivo produzca más follaje y empiece a tuberizar (Arce 2002).

La papa en Guatemala se encuentra entre los sistemas de cultivo para consumo interno, que pueden ser en monocultivo y/o en asocio. Este sistema es en su mayoría de subsistencia y se desarrolla en las áreas de topografía accidentada. En el país las zonas de producción comprenden seis departamentos: Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Sololá, Guatemala y Jalapa (Maselli y Cobaquil 2008; Christiansen 1980).

a. Variedades. Se conocen más de 4,000 variedades de papa. En Guatemala, las variedades que más se producen son Loman, Tollocan y Atzimba, siendo la primera la que más se produce y se consume (Maselli y Cobaquil 2008). Otras variedades que se cultivan son Ictafrit, Icta-Mercedes, Atlantic, Floresta e Ictachiquirichapa (de León *et al.* 2002). Además, Guatemala cuenta con especies silvestres de papa, las cuales son: *Solanum agrimonifolium* en Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Totonicapán, Sololá y Chimaltenango; *S. bulbocastanum* ssp. *Partitum* en Huehuetenango y Baja

Verapaz; *S. clarum* en Huehuetenango, San Marcos, Sololá y Totonicapán; y *S. demissum* en Totonicapán (Maselli y Cobaquil 2008). La mayoría de las variedades de papa que existen en el mundo derivan de *Solanum tuberosum* subespecie andígena, aunque las más cultivadas pertenecen a la subespecie *tuberosum* (Arce 2002).

b. Aspectos económicos de la papa en Guatemala. El promedio de área cultivada de papa entre los años 2005-2009 fue de 44.8 mil manzanas, con un rendimiento promedio de 400.42 mil quintales por manzana (Maselli y Cobaquil 2008). Asimismo, el empleo directo en campo (jornales/año 2009) fue de 3,094,000 que es el equivalente a 11,050 empleos permanentes (MAGA 2010). En el Cuadro No. 2 se presentan las cifras correspondientes a la producción y exportación de papa durante los años 2005 al 2009. En estos años Nicaragua ha sido el país que más ha importado papa de Centro América.

Cuadro 2
Producción y exportación de papa en
Guatemala durante los años 2005 a 2009

Año	Producción (miles de quetzales)	Exportación		
		Kilos	Valor \$	País de destino
2005	9,526.80	6,209,609	802,729.00	Nicaragua, El Salvador
2006	9,681.10	5,168,608	673,889.00	Nicaragua, El Salvador
2007	9,957.60	7,294,967	1,009,173.00	Nicaragua, El Salvador
2008	10,106.60	5,559,953	193,994.00	Nicaragua, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Estados Unidos y Bolivia
2009	10,359.7	2,171,645.87	290,223.2	Nicaragua, El Salvador Y Honduras

Fuente: Banco de Guatemala (2009) y AGEXPORT (2009)

4. Enfermedades de la papa. Las enfermedades en la papa, producen pérdidas económicas en el cultivo de la misma y éstas se pueden desarrollar: en el campo, en

almacén, durante el transporte, en el mercado y en la casa del consumidor. Las principales enfermedades y plagas que afectan al cultivo de la papa se pueden clasificar como: producidas por causas ambientales, por bacterias, hongos, virus, viroies, nemátodos, plagas de insectos y malezas o malas hierbas (Arce 2002). Entre las enfermedades más frecuentes en papa se pueden mencionar el tizón tardío, *Phytophthora infestans*; tizón temprano, *Alternaria solani*; rizoctoniasis o sarna negra, *Rhizoctonia solani* (Trujillo y Perera 2009). Además, enfermedades causadas por deficiencia de oxígeno, daños por temperaturas bajas, agentes químicos o contaminación ambiental; enfermedades virales como enrollamiento de las hojas (PLRV) o mosaicos (PVX, PVS, PVM, PVY y PVA) y las causadas por fitoplasmas como la punta morada (Gregory y Andrade 1996).

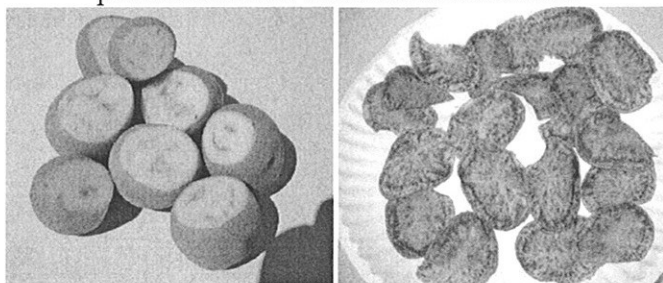
Existen también, vectores como la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* y polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora*; pulgones: *Aphis gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae*, *Aulocartum solani*, moscas blancas y nemátodos: *Meloidogyne* spp., *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (Trujillo y Perera 2009).

a. Papa rayada. Es una enfermedad que en los últimos años ha causado daños a los cultivos de papa en México, Centro América, gran parte de los Estados Unidos: Texas, California, Colorado, Kansas, Nebraska, Nevada y Nuevo México (Lin *et al.* 2009; Secor *et al.* 2009) y recientemente en Nueva Zelanda (Wen *et al.* 2009). Fue primero identificada en 1994 en Texas y México, donde se le conoce como “papa manchada” (Crosslin y Munyaneza 2009).

Su incidencia y severidad varía año con año y está acompañada de serias consecuencias económicas porque reduce la comercialización de papas frescas para frituras (Lin *et al.* 2009); así como estimula el abandono de áreas completas de cultivo (Gao *et al.* 2009). Se le denomina así a la enfermedad, debido a que los tubérculos

presentan galerías muy superficiales en distintas direcciones (Calderoni 1978). La papa rayada se identifica por un patrón de rayas o puntos necróticos que se forman en el tubérculo, específicamente cuando son procesadas para producir papas fritas, esto se debe a la conversión de almidón en azúcares que al someterse a cocción se vuelven oscuras (véase Figura No. 1) (Market Access Solutionz 2008).

Figura 1
Tubérculos presentando los síntomas de la enfermedad y papalinas
provenientes de tubérculos infectados



Fuente: (Munyanenza *et al.* 2007).

Las plantas infectadas exhiben síntomas similares a la enfermedad de punta morada y “psyllid yellows (PY)”. Los síntomas incluyen: clorosis, tallos torcidos con apariencia en zigzag, nódulos agrandados, tubérculos aéreos, decoloración vascular y hojas calcinadas y marchitas que llegan prematuramente a la senescencia (véase Figura No. 2) (Crosslin y Munyanenza 2009; Lin *et al.* 2009; Secor *et al.* 2009). También, los tubérculos de plantas enfermas presentan estolones hundidos, a menudo de un color rosado (Crosslin y Munyanenza 2009). Sin embargo, el síntoma diagnóstico lo constituye la aparición de una coloración café en el aro vascular y rayos medulares que puede afectar todo el tubérculo (véase Figura No. 1). Asimismo, los tubérculos muestran una pobre o nula germinación como resultado de la muerte de las lenticelas (Lin *et al.* 2009). La papa rayada causa necrosis en el tubérculo, compromete los vasos del floema (Secor *et al.* 2009) y ocasiona la muerte de las plantas de papa (Wen *et al.* 2009).

Figura 2

Plantas de papa presentando síntomas de papa rayada

Fuente: (Munyanenza *et al.* 2007).

Se ha propuesto que la papa rayada es un complejo de enfermedades que involucra al menos dos patógenos distintos y no menos de dos insectos como vectores (Gao *et al.* 2009). Según la evidencia, se ha sugerido que el agente causal de la enfermedad tiene como vector al psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* Sulc (Secor *et al.* 2009). Este psílido es un alimentador polífago de floema que puede reproducirse exitosamente en una amplia variedad de especies de plantas hospedero, entre ellas papa y tomate. Además, la secreción salivar de este psílido es la causante de un debilitamiento en la planta, produciendo una coloración amarilla (Hansen *et al.* 2008). La asociación de este psílido con la enfermedad, ha sido corroborada tanto en investigación experimental (invernaderos) así como en observaciones en el campo (Secor *et al.* 2009).

Uno de los efectos primarios del mal desarrollo y síntomas de clorosis en las hojas usualmente asociados con la infestación de psílicos y el desarrollo de papa rayada es una reducción en la fotosíntesis, el proceso en el que la energía lumínica es absorbida, convertida en energía química y utilizada para sintetizar azúcares. La interrupción de la producción y transporte de azúcares limita la síntesis de almidón y su deposición en los tubérculos, resultando en una gravedad específica inferior. El contenido de azúcar tiene un importante efecto en la calidad de los productos por su influencia en el color de las papas fritas. La glucosa, un azúcar reductor, en los tubérculos de papa crea la mayoría de problemas durante la fritura porque es químicamente reactivo. La sacarosa contribuye poco al desarrollo en el color oscuro del tubérculo de la papa, pero es igual de importante porque es el sustrato para crear más azúcares reductores bajo ciertas condiciones. Se ha

hipotetizado que el bloqueo del floema provocado por *B. cockerelli*, causa la acumulación de fotoasimilados (especialmente almidón) en las hojas, lo cual lleva a una reducción de la fotosíntesis e inhibe la red transportadora de sacarosa fuera del tejido de la hoja. Además, las alteraciones del metabolismo del azúcar dentro del tubérculo, a través de mecanismos aún desconocidos, puede conducir a la acumulación de azúcares reductores (glucosa y fructosa) y últimamente a la decoloración de productos procesados como papalinas y papas fritas (Gao *et al.* 2009).

Aunque no se ha determinado el agente causal de la enfermedad de papa rayada, recientemente se ha implicado una nueva especie de *Candidatus* Liberibacter. Sin embargo, su rol en la expresión de la enfermedad es aún confuso (Crosslin y Munyaneza 2009). Recientemente, se ha asociado a *Candidatus* Liberibacter solanacearum, un α -proteobacteria considerado como un tipo de organismo bacteriano o BLO (por sus siglas en inglés), con la enfermedad de papa rayada y como la causante de enfermedades similares en otras solanáceas hospederas. Además, por ser *Ca. L. solanacearum* un patógeno limitado al floema, es detectado en altas concentraciones en los tejidos de papa que se encuentran por debajo del suelo como lo son los tubérculos y estolones (Wen *et al.* 2009).

1) Nota taxonómica – Categoría: *Candidatus*. Murray y Stackebrandt (1995) han propuesto la categoría *Candidatus* para ser utilizada en la descripción de entidades procariotas para las que más de una sola secuencia está disponible, pero para las que las características requeridas para una descripción según el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias son carentes. Este es el caso de procariotas que son difíciles de cultivar y que sólo pueden describirse en términos limitados. Por el momento, los candidatos para esta categoría provisional son en su mayoría simbioses, parásitos de células eucariotas, así como cultivos obtenidos de preparaciones con enriquecimiento especial; debido a que tales organismos pueden reconocerse por su estructura molecular pero no pueden ser asignados a un género conocido por la falta de características

suficientes para distinguirlos. La categoría provisional *Candidatus* tiene la intención de registrar los descubrimientos y de proveer una base para reconocer el taxón putativo que es equivalente a género o un rango más alto.

B. Justificación

La papa, planta herbácea que produce tubérculos como su parte comestible, es un cultivo muy importante debido a sus altos rendimientos y rentabilidad. Además, es un alimento con un alto valor nutritivo y es uno de los cultivos alimenticios más importantes del mundo por ser un alimento muy completo. Siendo Guatemala un país económicamente dependiente de la agricultura, la papa es un cultivo primordial para este sector y para la población en general, ya que puede constituir un alimento clave para la dieta de un país con altos índices de desnutrición. Sin embargo, su producción no sólo está limitada debido a la baja tecnología para su siembra y falta de semilla mejorada, sino que se agrava con el ataque de plagas y enfermedades que dañan áreas completas de este cultivo. Muchas de estas enfermedades no han sido estudiadas a detalle por lo que se desconoce sus causas, orígenes y como consecuencia, los medios para erradicarlas o manejarlas. Con este estudio se espera conocer más sobre el cultivo de papa en Guatemala y el impacto que la enfermedad de papa rayada está teniendo en las zonas de producción del país. Además, siendo papa rayada un tema que no sólo atañe a Guatemala, este estudio ayudará al enriquecimiento de información sobre la enfermedad en general. Así como a la búsqueda de un método que permita detectar la enfermedad de papa rayada de manera eficaz.

C. Objetivos

- **General**

Determinación de la presencia de *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* como posible agente causal de la enfermedad de papa rayada en cultivos de papa de localidades de alta producción en Guatemala.

- **Específicos**

Evaluación de la eficiencia del método de extracción CTAB comparado con el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen en cuanto a concentración del ADN presente en ambos casos.

Optimización de la técnica de PCR convencional para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas.

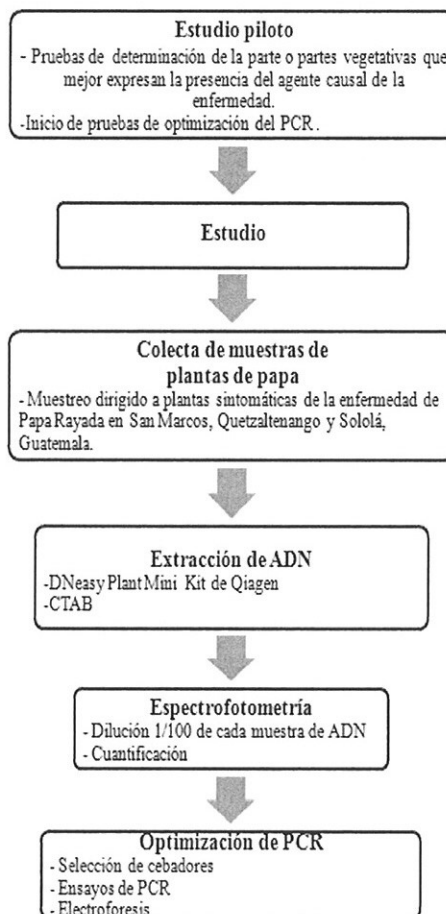
Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

II. MÉTODOS

A. Procedimiento

Para llevar a cabo el presente estudio, se debió cumplir con varias etapas que permitieron alcanzar el objetivo deseado. Entre los diferentes procesos que se debieron seguir a lo largo del estudio se mencionan: la colecta de muestras de plantas de papa, la extracción de ADN, espectrofotometría de las muestras de ADN y la optimización de la técnica de PCR (véase Figura No. 3).

Figura 3
Diagrama de flujo de cada uno de los procedimientos llevados a cabo para cumplir con los objetivos del estudio.



1. Estudio piloto. Se llevó a cabo un pequeño estudio piloto, del 30 noviembre 2009 al 18 de enero de 2010, en el que se analizaron 13 muestras de 4 plantas provenientes de la Aldea Concepción, Palencia. En su mayoría, de cada muestra se obtuvo raíz, tubérculo, hojas y pecíolos y tubérculos aéreos, a excepción de dos muestras de las cuales sólo se trabajó con tres o dos de las partes mencionadas.

Para el análisis molecular, las muestras fueron extraídas utilizando el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen y se aplicó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este también fue el inicio de pruebas para la optimización de esta técnica, para la cual se utilizó los cebadores OA2/OI2c.

2. Obtención de la muestra. Se realizaron muestreos dirigidos a plantas sintomáticas, en campos de cultivo de papa de zonas de alta producción del país, durante agosto 2010 en San Marcos y Quetzaltenango (véase Apéndice 3); y en febrero 2011 en Sololá (véase Apéndice 4). El muestreo fue dirigido a plantas sintomáticas de la enfermedad de papa rayada (clorosis, quemadura en hojas, tubérculos aéreos, tubérculos manchados). Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de plástico con cierre, debidamente etiquetadas con la fecha, lugar de colecta, un número correlativo para cada muestra y fueron transportadas al laboratorio en una hielera con ice packs. Una vez en el laboratorio, las muestras se almacenaron a 4°C por un máximo de 5 días hasta el momento de análisis.

3. Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó a partir de las partes vegetativas de la planta: raíz, tallo, hojas, tubérculos aéreos y tubérculos. Para llevar a cabo la misma, se emplearon dos métodos de extracción: DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen y CTAB. El primero, permite que el procedimiento sea más sencillo y rápido; además se esperaría una pureza del ADN mayor. Sin embargo, su precio es muy alto. Con el segundo método, se extrae una mayor cantidad de ADN, pero la pureza es menor. Asimismo, su empleo no representa mayores costos para el laboratorio.

a. DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen. Previo a la extracción de ADN, cada parte de la planta (hojas, tallo, tubérculo y raíz) se lavó con agua potable y se secó con papel toalla. Se seleccionó hojas sintomáticas, raíz, tallo y tubérculos; los cuales se colocaron por separado en una placa de vidrio o caja Petri estéril. El material vegetativo se cortó en pequeños trozos de tamaño 1-2 mm, utilizando para ello una cuchilla estéril. La cuchilla y pinzas se limpiaron con etanol entre cada muestra. El material vegetativo, 100 mg (6-8 trocitos), se colocó en un tubo de 1.5 ml, debidamente etiquetado. Cada tubo de 1.5 ml se sumergió en nitrógeno líquido y con palillos de madera estériles se pulverizó el material vegetativo. Las muestras pulverizadas con nitrógeno líquido se extrajeron con el kit de extracción de ADN: DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, según las indicaciones del fabricante¹ (véase Apéndice 1).

b. Extracción CTAB. En el método de extracción mediante el buffer CTAB, la parte vegetativa de la cual se extraerá ADN debe de ser lavada, previo a la extracción. La cantidad de material vegetativo a utilizar es lo que equivalente a lo que corta dos veces la tapa de un tubo de 1.5 ml (para este estudio se utilizó aproximadamente 0.10 g) y es en éste en donde se coloca la muestra a extraer, el protocolo detallado se describe en el Apéndice 2. Brevemente, el método consiste en, una solución de homogenización (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA y 0.2% 2-mecaptoetanol) para la liberación de los ácidos nucleicos. Debido a que no se pulverizó la muestra con nitrógeno líquido, se utilizó un macerador mecánico para ayudar a la lisis de las células. Asimismo, cloroformo: alcohol isoamílico para la extracción de ácidos nucleicos; acetato de amonio e isopropanol frío para la precipitación

¹ Observación: antes de iniciar el proceso de extracción de ADN utilizando el Kit de Qiagen, se recomienda encender la incubadora/agitadora a 65°C y revisar que el tampón API no presente una condición turbia, si la presenta debe de colocarse en baño de maría a 65°C por unos minutos hasta que aclare.

del ADN; etanol al 70% para limpiar el ADN y buffer TE para resuspensión del ADN. El protocolo detallado se describe en el Apéndice 2.

4. Espectrofotometría. Para conocer la concentración y la pureza del ADNdh extraído se cuantificaron las muestras utilizando el Biophotometer (Eppendorf). Previo a cuantificar, en un tubo de 0.5 ml se realizó la dilución para cada muestra, colocando 99 μ l de agua destilada y 1 μ l del extracto de ADN y se mezcló bien.

- Al momento de cuantificar, se seleccionó el método de ADNdh.
- Se revisó los parámetros de dilución del equipo, introduciendo: 1 + 99 μ l
- Se colocó la celda en el portaceldas y se “blanqueó” el espectrofotómetro. Luego, se retiró la celda y se descartó el agua.
- Se colocó en la celda la mezcla diluida de extracto de ADN y se midió la muestra.
- Se retiró la celda y se enjuagó tres veces con agua destilada.
- *Cada 5 muestras se “blanqueó” el espectrofotómetro.

5. Optimización de PCR.

a. Cebadores. Se utilizaron diferentes parejas de cebadores: OA2/OI2c, LsoF/OI2c y Lib OA2/ Lib I0A2c. Los datos referentes a la secuencia de cada cebador, el tamaño del fragmento que amplifican y la región de *Candidatus Liberibacter solanacearum* para la que fueron diseñados se presenta en el Cuadro No. 3.

CUADRO 3
Datos de los cebadores utilizados.

*Nombre del cebador	Tamaño del fragmento a amplificar (pb)	Secuencia del cebador	Región para la que fueron diseñados de la secuencia <i>Ca. L. solanacearum</i>
OA2	1,168 pb (Wen et al. 2009)	5'- GCG CTT ATT TTT AAT AGG AGC GGC A-3' (nombre del Dr. Quien proveyó los primers)	16S ADNr (Wen et al. 2009)
OI2c		5'- GCC TCG CGA CTT CGA CTT CGC AAC -3' (Nombre del Dr. Quien proveyó los primers)	
LsoF	1,163 pb (Li et al. 2009)	5'-GTC GAG CGC TTA TTT TTA ATA GGA-3' (Li et al. 2009)	16S ARNr (Li et al. 2009).
Lib OA2	1,168 pb (Brown 2010)	5'-GCG CTT ATT TTT AAT AGG AGC GGC A-3' (Brown 2010)	16S ANRr (Brown 2010)
Lib IOA2c		5'- GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T -3' (Brown 2010)	

*Los colores en la columna "nombre del cebador" indican cómo se agruparon los cebadores para las pruebas moleculares.

Para la pareja de cebadores OA2/OI2c, se probó su rendimiento a una concentración de 0.2 mM y 0.3 mM. La pareja de cebadores, OI2c/ LsoF, sólo fue utilizada para pocas pruebas; y la pareja de cebadores Lib OA2/Lib OI2c fue utilizada para las últimas pruebas.

2. Ensayos de PCR. Para la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó en sus inicios diversas partes de la planta de papa: raíz, hojas y pecíolos, tubérculo y tubérculos aéreos, las cuales fueron obtenidas de cuatro diferentes plantas de papa provenientes de la Aldea Concepción, Palencia. A lo largo de la optimización, se fue utilizando solamente el tubérculo y se realizaron modificaciones a la receta de PCR que incluyeron, cambios en la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂): 3, 2.5, 1.5 y 1 mM; temperatura de hibridación: 52°C, 54°C, 55°C, 57°C, 60°C y 65°C. Para llevar a cabo estas pruebas se utilizó el termociclador "PTC-100 Programmable Thermal Controller" MJ Research, Inc.

Una nueva gama de pruebas incluyeron los ensayos con gradientes de temperatura de 55°C a 65°C, utilizando el termociclador “Mastercycler ep gradient” Eppendorf. Se probaron en total 11 temperaturas diferentes con el fin de determinar con cuál de ellas, las parejas de cebadores OA2-OI2c y OI2c/LsoF presentaban una mejor amplificación del fragmento deseado. El programa de PCR utilizado fue: una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Nuevamente, se realizó una prueba utilizando las dos parejas de cebadores anteriores y bajo un gradiente de temperatura, pero modificando los tiempos del programa de PCR previamente utilizado: una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Finalmente, se utilizó el programa de PCR que consistió en: una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 65°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto, y la elongación final con 1 ciclo a 72°C por 5 minutos, finalizando a 4°C constante (Brown 2010).

Los ensayos de PCR se realizaron utilizando una mezcla de PCR para un volumen total de 25 µl. La composición de la mezcla se detalla en el Cuadro No. 4.

Cuadro 4

Mezcla de PCR para un volumen total de 25 µl.

Reactivo	Concentración
PCR buffer	1x
MgCl ₂	1.5 mM
DNTP's	0.15 mM
Cebadores (c/u)	0.3 mM
Taq ADN Polimerasa	1.5 u
ADN	100 ng

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1%. Al inicio del estudio se cargó en cada pozo 5 μ l del producto de PCR. Posteriormente se cargó en cada pozo 7 μ l del producto y 5 μ l de escalera 1kpb. Los geles fueron corridos a 85 voltios por 40 min. y el ADN fue visualizado mediante la tinción con bromuro de etidio.

III. RESULTADOS

A. Pequeño estudio piloto para la determinación de la parte o partes vegetativas de la planta de papa que mejor expresan la presencia del agente causal de la enfermedad

En el pequeño estudio piloto se analizaron 13 muestras de 4 plantas provenientes de la Aldea Concepción, Palencia (véase Cuadro 5). En su mayoría, de las 13 muestras se obtuvo raíz (r), tubérculo (t), hojas y pecíolos (h) y tubérculos aéreos (a), a excepción de dos muestras de las cuales sólo se trabajó con tres o dos de las partes mencionadas. En total, de las 13 muestras analizadas, tres de tubérculo y una de las 4 muestras de hojas y pecíolos resultaron positivas para *Ca. L. solanacearum* (véase Figura 4).

Cuadro 5

Resultados del estudio piloto para determinar las diferentes partes vegetativas de la planta de papa en las que se detectó exitosamente el agente causal de papa rayada.

No. de Muestra	Parte utilizada	Resultados PCR
T1h	Hojas y pecíolo	Positivo
T1r	Raíz	Negativo
T1t	Tubérculo	Positivo
T1a	Tubérculo aéreo	Negativo
T2h	Hojas y pecíolo	Negativo
T2a	Tubérculo aéreo	Negativo
T3h	Hojas y pecíolo	Negativo
T3r	Raíz	Negativo
T3t	Tubérculo	Positivo
T3a	Tubérculo aéreo	Negativo
T4h	Hojas y pecíolo	Negativo
T4r	Raíz	Negativo
T4t	Tubérculo	Positivo

B. Optimización de la técnica de PCR convencional para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas.

La optimización de la técnica de PCR se inició utilizando la pareja de cebadores OA2/OI2c, con la cual se realizaron las primeras pruebas que consistieron en la variación de la concentración del cloruro de magnesio ($MgCl_2$): 3, 2.5, 1.5 y 1 mM a diferentes temperaturas de anillamiento: 52°C, 54°C, 55°C, 57°C, 59°C, 60°C y 62°C y utilizando 1 μ l de ADN. Las condiciones que proporcionaron los mejores resultados fueron la concentración de 1.5 mM $MgCl_2$ y la temperatura de 55°C (véase Figura No. 4). De la misma manera, a modo de comparación, se utilizó la pareja de cebadores OI2c/LsoF, con una concentración de 1.5 mM $MgCl_2$ y 1 μ l de ADN a una temperatura de anillamiento de 52°C y 57°C, donde no se obtuvo resultados positivos. Asimismo, ambas parejas fueron comparadas utilizando 1.5 mM $MgCl_2$, 2 y 3 μ l de ADN a una temperatura de anillamiento de 62°C, siendo la prueba con 3 μ l de ADN la que arrojó resultados positivos para la pareja OI2c/ LsoF (véase Figura No. 5). En cuanto a las pruebas con gradiente de temperatura, 55°C a 65°C, no hubo resultados positivos para ninguna de las parejas (véase Figura No. 6).

Figura 4

Optimización de la técnica de PCR para papa rayada utilizando diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (**negro**: 1.5mM $MgCl_2$; **blanco**: 2.5 mM $MgCl_2$ y **amarillo**: 3 mM $MgCl_2$) a una temperatura de anillamiento de 55°C, utilizando cebadores OA2/OI2c. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 pb. E: escalera 1 kb NOVAGEN; C- : blanco; 1, 2, 3 y 4, corresponden al número de muestra y las letras a hoja y pecíolo (h), raíz, (r), tubérculo aéreo (a) y tubérculo (t). *Pruebas realizadas sin uso de control positivo.

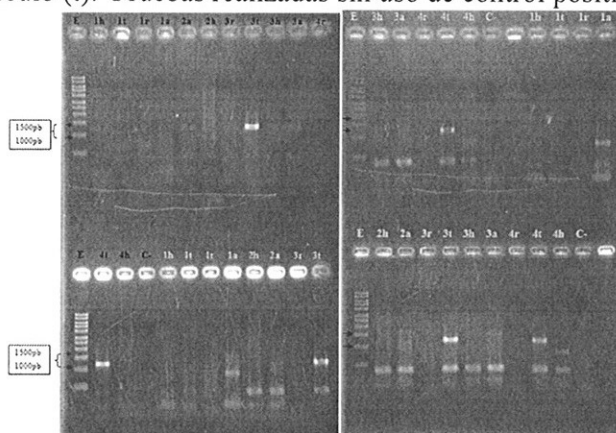


Figura 5

Comparación de los productos amplificados utilizando los cebadores **A.** OA2/OI2c y **B.** OI2c/LsoF, bajo las condiciones: temperatura de anillamiento 62°C, 1.5 mM MgCl₂, 0.3 mM de cada cebador y 3 µl ADN. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 pb. E: escalera 1 kb NOVAGEN; C- : blanco, 1, 2, 3 y 4, corresponden al número de muestra y las letras a hoja y pecíolo (h), raíz, (r), tubérculo aéreo (a) y tubérculo (t). *Pruebas realizadas sin uso de control positivo.

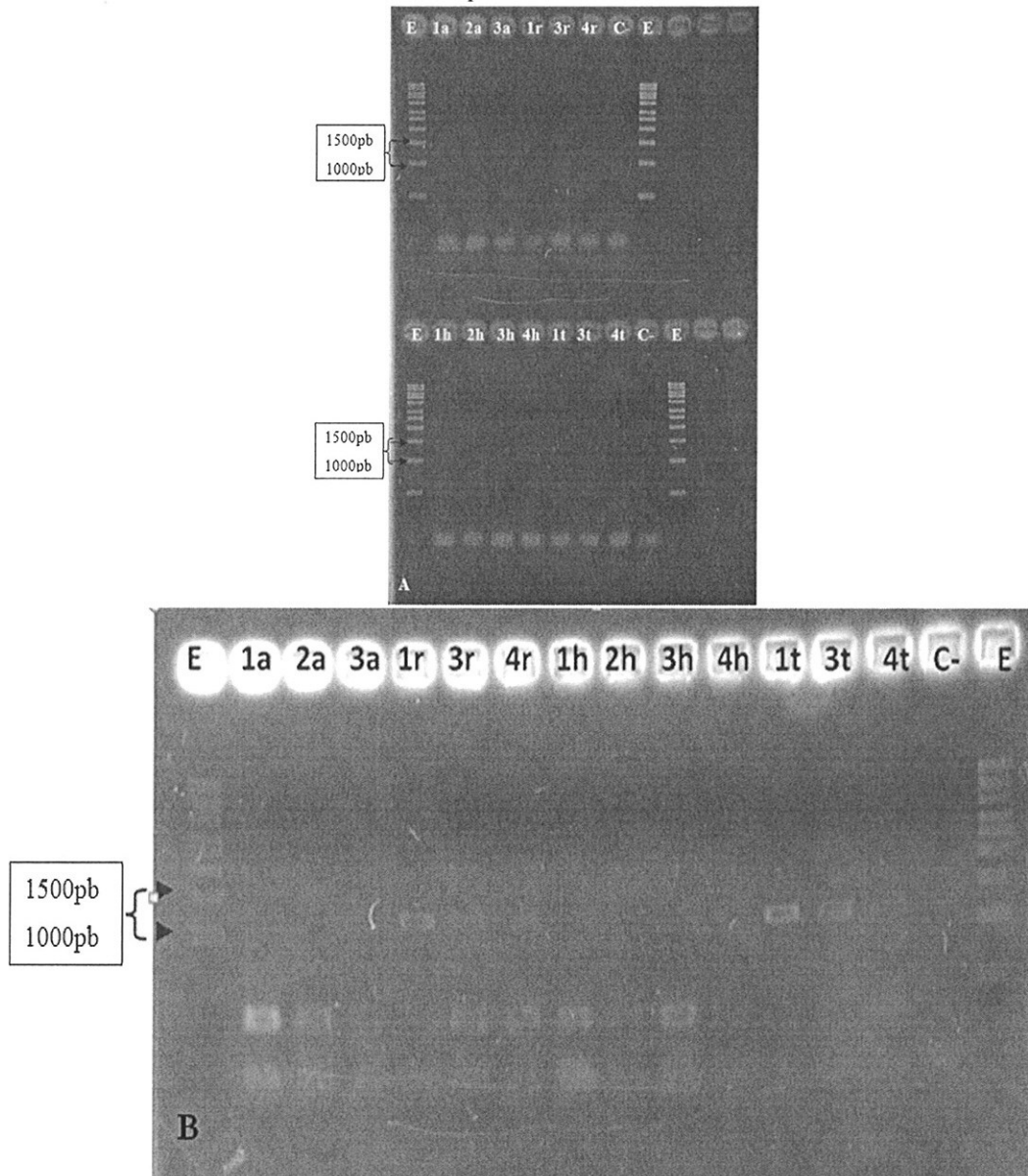
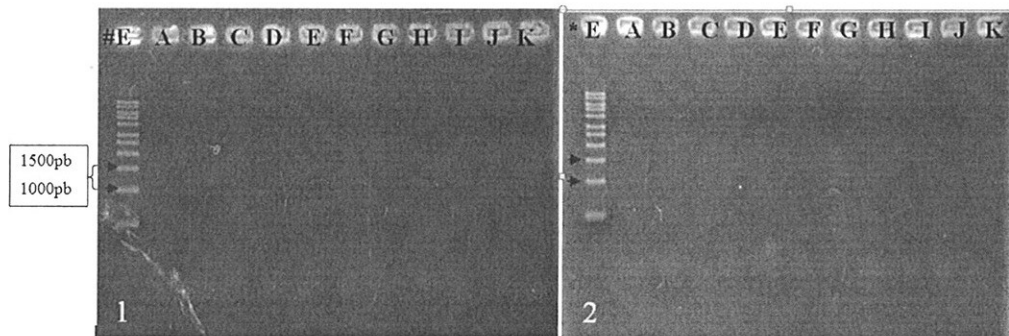


Figura 6

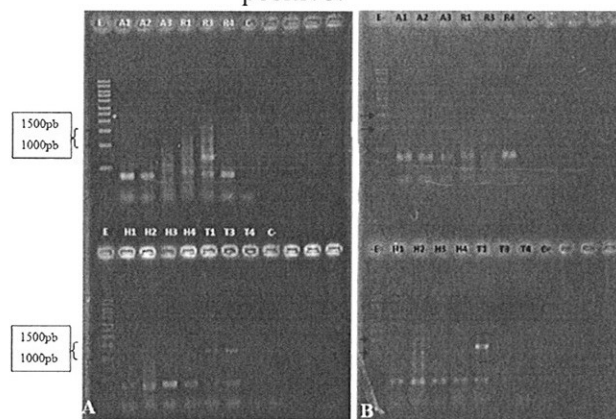
Prueba de programa de PCR con gradiente de temperatura (A: 55°C; B: 56°C; C: 57°C; D: 58°C; E: 59°C; F: 60°C; G: 61°C; H: 62°C; I: 63°C; J: 64°C y K: 65°C), utilizando la pareja de cebadores **1**. OA2/OI2c y **2**. OI2c/ LsoF. Se analizó sólo una muestra de tubérculo (3T), positiva en pruebas anteriores. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 pb. E: escalera 1 kb NOVAGEN.



El rendimiento de la pareja de cebadores OA2/OI2c a una concentración de a 0.3 mM mostró resultados positivos para 2 de las 13 muestras utilizadas para esta prueba. A una concentración de 0.2 mM, esta pareja amplificó para sólo una de las muestras. Ambas concentraciones estuvieron sujetas a una temperatura de anillamiento de 55°C. También, se realizó una prueba a una temperatura de anillamiento de 59°C, utilizando 2µl de ADN, obteniendo los mismos resultados que en el caso anterior (véase Figura No. 7).

FIGURA 7

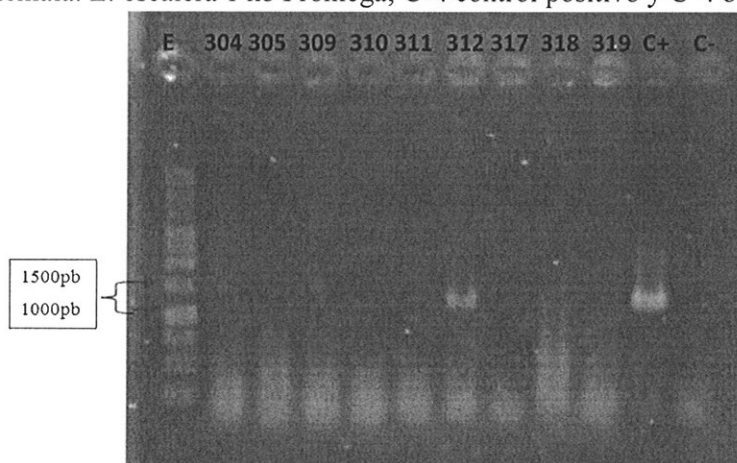
Rendimiento de cebadores OA2/OI2c bajo las condiciones: Temperatura de anillamiento 55°C, 1.5 mM MgCl₂, 1 µl de ADN y A. 0.3 mM; B. 0.2 mM, de cada primer. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 pb. Las muestras amplificadas, T1 y T3, corresponden a tubérculo. E: escalera 1 kb NOVAGEN y C- : blanco. *Pruebas realizadas sin uso de control positivo.



Finalmente se utilizó la pareja de cebadores Lib OA2/ Lib I0A2c debido a que la secuencia del cebador OI2c varía, en los últimos 10 nucleótidos, con la que se propone en la literatura. Esta pareja de cebadores se utilizó a una temperatura de hibridación de 65°C (véase Figura No. 8).

Figura 8

Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a una temperatura de hibridación de 65°C, amplificando con la pareja de cebadores Lib OA2/ Lib I0A2c. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 pb. Las muestras utilizadas corresponden a hojas (muestra no. 304 y 305) y tubérculos de papa (muestra no. 309-319) provenientes de Sololá, Guatemala. E: escalera 1 kb Promega; C+: control positivo y C- : blanco.



C. Comparación de la eficiencia del método de extracción CTAB en cuanto a concentración del ADN extraído con respecto al DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen.

La eficiencia del método de extracción CTAB en cuanto a concentración del ADN extraído usando el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen fue corroborada mediante el uso de 31 muestras de tubérculos provenientes de los departamentos de Quetzaltenango y San Marcos, Guatemala (véase Apéndice 5). La concentración de ADN obtenida para los dos métodos (véase Cuadro 6) revela la diferencia entre ambos, siendo la media resultante para DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen de 76.90 ng/μl y 221.07 ng/μl con el método CTAB.

Entre las concentraciones obtenidas, se observan 7 muestras (No. 35, 37, 44, 45, 46, 47 y 106) extraídas con el Kit de Qiagen, con concentraciones negativas. A diferencia del Kit de Qiagen, con el método CTAB no hubo concentraciones negativas. Sin embargo, la concentración más baja obtenida con este método fue de 15 ng/ul, concentración correspondiente a la muestra no. 93.

Asimismo, al comparar las concentraciones de ADN, se observa que con CTAB en 23 de las 31 muestras (74%) se obtuvo una concentración mayor a la que se obtuvo con el Kit de Qiagen y, éste último presentó en un 26% concentraciones mayores con respecto a CTAB. De igual manera se observa que en el caso de la extracción con CTAB, en 10 de las 31 muestras (32%) ocurrió amplificación del fragmento deseado, mientras que con el Kit de Qiagen solamente ocurrió en 5 muestras (16%). Sin embargo, para ambos métodos hubo amplificación incluso a concentraciones menores a los 100 ng/ul. Es importante mencionar que los tubérculos utilizados para este fin, fueron extraídos mediante el Kit de Qiagen 66 días después de haber sido colectados y con el método de CTAB, 68 días después de realizarse la colecta. Para ambos métodos de extracción, el material de partida fue de 1 g.

Cuadro 6

Comparación de los análisis moleculares de tubérculos de papa, en su mayoría con síntomas para papa rayada, utilizando dos métodos de extracción: DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen y método de CTAB. El material de partida utilizado para ambos métodos de extracción fue de 1 g. La colecta se realizó en Quetzaltenango y San Marcos, Guatemala en agosto 2010.

No. Muestra	Kit Qiagen		CTAB	
	PCR	Concentración de ADN (ng/ul)	PCR	Concentración de ADN (ng/ul)
31	Negativo	40	Negativo	880.4
32	Negativo	40	Negativo	240.2
33	Negativo	5	Negativo	25
35	Negativo	-75.2	Negativo	518.5
37	Negativo	-118.9	Negativo	116.5
44	Negativo	-206.7	Positivo	136.6
45	Negativo	-214	Positivo	222.9
46	Negativo	-177.1	Positivo	196.9
47	Negativo	-251.9	Positivo	320.1
48	Negativo	82.3	Negativo	200.6
49	Negativo	121.5	Negativo	394.5
52	Negativo	92.5	Negativo	374.4

Continuación
Cuadro 6

No. Muestra	Kit Qiagen		CTAB	
	PCR	Concentración de ADN (ng/ul)	PCR	Concentración de ADN (ng/ul)
53	Negativo	163.3	Positivo	276.2
56	Negativo	100.3	Negativo	159.4
69	Positivo	103.6	Negativo	94.7
70	Negativo	248	Positivo	70
71	Positivo	256.4	Positivo	83.6
73	Positivo	256.8	Positivo	45
75	Negativo	158.4	Negativo	181.8
83	Negativo	240.5	Negativo	94.1
84	Negativo	45	Negativo	103
93	Positivo	78.1	Negativo	15
96	Positivo	67.2	Positivo	35
97	Negativo	447.2	Positivo	113.4
98	Negativo	123.1	Negativo	183.5
99	Negativo	109.2	Negativo	256.7
100	Negativo	78	Negativo	307.9
103	Negativo	152.8	Negativo	269.1
104	Negativo	344.4	Negativo	472.6
105	Negativo	79	Negativo	358.6
106	Negativo	-5	Negativo	107.1
Media		76.90		221.07

D. Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

La presencia de síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada en las plantas colectadas, es el primer paso para la detección de la enfermedad. De igual manera, se observó que para todas las muestras los síntomas en hojas incluyeron, en su mayoría: enaciones y/o clorosis, y entre otros: necrosis, coloración, asimetría, enrollamiento hacia arriba y venas distorsionadas de las hojas. Así como, presencia del mosaico amarillo o morado. En el caso de los tallos se observó presencia de necrosis y clorosis; y en las plantas en las que se colectó el tubérculo, éste presentó las características rayas cafés. También, se pudo observar enanismo en las plantas enfermas. Los síntomas anteriores se presentaron tanto en plantas jóvenes (edad de cultivo de 15 días) como en plantas con 30, 65 y más días de edad.

Sin embargo, los análisis moleculares son los que determinan si una planta está o no infectada por el agente causal *Ca. L. solanacearum*. Para este caso en particular, se observó que no necesariamente las plantas que mostraban clorosis, encartuchamiento, tubérculos aéreos y en especial, tubérculos con manchas café eran positivos para *Ca. L. solanacearum* (véase Figura 8; Cuadro 7). Además, al detectar los productos de PCR en los geles de agarosa al 1%, se observó barridos muy fuertes como ocurrió con las muestras no. 351H, 351V, 353H, 353V, 354H, 354V, 355H y 355V (véase Figura No. 9; Apéndice 6). Para estos ensayos se utilizaron muestras provenientes de Sololá, Guatemala (véase Apéndice 7).

Cuadro 7

Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Las partes vegetativas analizadas fueron: hojas (H), vena central (V) y tubérculo (T). Plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en diciembre 2010 y febrero 2011, con una edad del cultivo de 15 días y PCR Negativo

No. de Muestra	Síntomas	Concentración ng/ml	Pureza
266 H	Enaciones en hojas y necrosis leve	231	2.12
266 V		211	1.98
267 H	Clorosis en hojas	60	5.57
267 V		440	1.95
268 H	Enaciones en hojas	5	—
268 V		434	1.91
269 H	En hojas: enaciones, clorosis y necrosis	0	—
269 V		124	1.9
270 H	Clorosis leve y enaciones en hojas	10	—
270 V		227	1.87
271 H	Clorosis en brotes nuevos y enaciones en hojas	0	—
271 V		76	1.85
272 H	Necrosis, puntos en hojas jóvenes, enaciones y clorosis	20	—
272 V		360	1.84
273 H	Coloración morada en hojas, enaciones	15	2.89
273 V		153	1.91
274 H	Enaciones en hojas y venas distorsionadas	44	1.72
274 V		407	1.84
275 H	En hojas: enaciones, asimetría y clorosis leve; venas distorsionadas	423	1.87
275 V		307	1.83

Cuadro 8

Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Las partes vegetativas analizadas fueron: hojas (H), vena central (V) y tubérculo (T). Plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en diciembre 2010 y febrero 2011, con una edad del cultivo de 30 días y PCR Negativo

No. Muestra	Síntomas	Concentración ng/ml	Pureza	
295 T	Necrosis en tubérculo	156	1.84	
295 H		97	1.78	
295 V	Enaciones, necrosis leve y enrollamiento ligero hacia arriba en hojas	80	1.53	
296 T		100	1.73	
296 H		67	2.19	
297 H	En hojas: enaciones, clorosis, necrosis y enrollamiento hacia arriba	102	1.64	
298 T	En hojas: enaciones y clorosis en los bordes	61	2.38	
298 H		121	1.68	
298 V	Clorosis y enaciones leves en hojas	30	1.95	
299 H		Enaciones y bordes irregulares en hojas	83	1.37
300 H			74	1.83
301 H	Enaciones, bordes irregulares y necrosis en hojas jóvenes	107	1.56	
301 V		54	5.07	
302 H	Enaciones, clorosis y necrosis en hojas	30	1.21	
302 V		144	1.78	
303 H	Enaciones en hojas	162	1.71	
304 H	Enaciones, clorosis y necrosis en hojas	197	1.64	
305 H	Enaciones en hojas	230	1.82	

Cuadro 9

Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Las partes vegetativas analizadas fueron: hojas (H), vena central (V) y tubérculo (T). Plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en diciembre 2010 y febrero 2011, con una edad del cultivo de 2 a tres meses

No. Muestra	Síntomas	Concentración ng/ml	Pureza	PCR
309 T	Clorosis y manchas en hojas, papa rayada	96	1.59	Negativo
309 H		54	1.67	Negativo
309 V	Clorosis, manchas, coloración y necrosis en hojas; tubérculos pequeños manchados	45	2.2	Negativo
310 T		92	1.63	Negativo
310 H		54	1.63	Negativo
310 V		62	1.75	Negativo
311 T	SSA en hojas, tubérculos pequeños manchados	116	1.72	Negativo
311 H		60	2.04	Negativo
311 V		57	1.85	Negativo
312 T	Tubérculo pequeño manchado	124	1.78	Positivo

Cuadro 10

Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Las partes vegetativas analizadas fueron: hojas (H), vena central (V) y tubérculo (T). Plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en diciembre 2010 y febrero 2011, con una edad del cultivo de 65 días y PCR Negativo

No. Muestra	Síntomas	Concentración ng/ml	Pureza
317 T	Clorosis leve, coloración, puntos necróticos y tubérculo manchado	176	2.6
318 T	Clorosis, coloración y necrosis en hojas; enanismo y producción en la planta; tubérculos aéreos y tubérculo manchado	45	—
318 H		46	1.78
318 V		48	2.35
319 T	Clorosis leve en hojas; necrosis en tallo; papa rayada	45	—
319 H		66	2.27
319 V		81	2.06
320 T	Necrosis en la planta (licuefacción), tubérculos manchados	40	2.58
320 H		54	1.77
320 V		30	—
321 T	Necrosis y producción en la planta; clorosis en hojas y tubérculo manchado	122	1.83
321 H		30	1.95
321 V		58	1.48
322 T	Necrosis en la planta; clorosis en las hojas y tubérculo manchado	92	1.76
322 H		170	1.77
322 V		143	1.69
328 T	Enanismo en la planta; en hojas, lámina foliar reducida, asimetría y clorosis; presencia de mosaico amarillo; clorosis en tallo; tubérculo consistente manchado	78	1.56
328 H		133	1.85
328 V		87	2.41

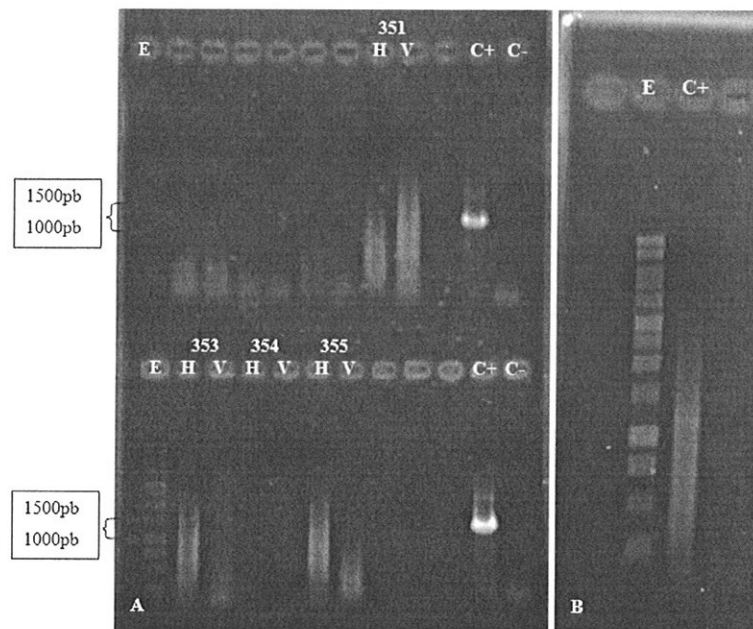
Cuadro 11

Correlación de la presencia de síntomas característicos de la enfermedad papa rayada con la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Las partes vegetativas analizadas fueron: hojas (H), vena central (V) y tubérculo (T). Plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en diciembre 2010 y febrero 2011, con una edad del cultivo de 2-3 meses y PCR Negativo

No. Muestra	Síntomas	Concentración ng/ml	Pureza
329 T	Necrosis en la planta; clorosis en hojas; presencia de mosaico amarillo; tubérculo consistente manchado	92	1.77
329 H		136	1.98
329 V		105	1.98
330 T	Necrosis y producción en planta; clorosis en tallo y tubérculo manchado	72	2.34
330 H		125	2.13
330 V		281	1.9
331 T	Tubérculo manchado	109	1.79
351 T	Clorosis en hojas y en tallo; tubérculo manchado	140	1.79
351 H		766	2
351 V		27	1.71
352 T	Clorosis y coloración en hojas; presencia de mosaico morado; tubérculo manchado	91	1.64
353 T	Clorosis en hojas; presencia de mosaico amarillo; tubérculo manchado	93	1.72
353 H		364	1.96
353 V		236	2.13
354 T	Clorosis en hojas; presencia de mosaico amarillo y tubérculo manchado	239	1.94
354 H		15	—
354 V		42	1.57
355 H	Clorosis en hojas y presencia de mosaico amarillo	73	1.53
355 V		5	—

Figura 9

A. Muestras No. 351, 353, 354 y 355 de hojas (H) y vena central (V) con síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada con barridos muy fuertes, indicando ADN degradado. B. Control positivo degradado para una mejor visualización de cómo se verían las muestras positivas para *Ca. L. solanacearum*. Programa PCR: temperatura de hibridación 65°C, amplificando con la pareja de cebadores Lib OA2/ Lib I0A2c. El tamaño del producto de PCR esperado era de 1,168 pb. Las muestras utilizadas corresponden a tubérculos de papá provenientes de Sololá, Guatemala. E: escalera 1 kb Promega; C+: control positivo y C- : blanco.



IV. DISCUSIÓN

No es un mito que la enfermedad de papa rayada se encuentra ampliamente diseminada en los campos de cultivo de papa de Guatemala. A través de este estudio se ha visto cómo se la enfermedad se ha hecho presente en campos de los departamentos de Sololá, Quetzaltenango y San Marcos, afectando así la actividad económica de los pequeños productores que son los beneficiarios directos de este cultivo.

Al llevar a cabo el pequeño estudio piloto se determinó que es el tubérculo la parte vegetativa en la que es posible detectar con mayor eficiencia el agente causal de la enfermedad. Confirmando lo reportado por Wen *et al.* 2009, quienes afirman que *Ca. L. solanacearum* por ser un patógeno limitado al floema, está altamente concentrado en tejidos que se encuentran por debajo del suelo como lo son los tubérculos y estolones. Además, debido a que los tejidos del tallo pueden volverse altamente lignificados durante el crecimiento de la planta se vuelven más difíciles de procesar que el tejido del tubérculo o estolón. De igual manera, Li *et al.* 2009, ha determinado que las poblaciones de *Ca. L. solanacearum* son más altas en tejidos como la raíz que en aquellos tejidos que están por encima del suelo. No obstante, es necesario un estudio que estadísticamente haga valer la conclusión. A partir de los resultados obtenidos, en el estudio se le dio prioridad al tubérculo para los análisis moleculares.

Para optimizar las condiciones de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en *Ca. L. solanacearum* se modificaron varios parámetros de la mezcla de reacción (master mix) y de las condiciones de amplificación con el fin de obtener el fragmento de ADN deseado y la reproducibilidad de la técnica para futuras investigaciones.

En el caso de concentraciones de $MgCl_2$, se comprobó que a concentraciones mayores a 1.5 mM aparecen otros patrones de bandas que no son los esperados. Por lo

que esta concentración es la que proporciona una mayor especificidad a la reacción. La concentración óptima del cebador se situó en 0.3 mM, probándose con 0.2 mM pero por no haber diferencia en el rendimiento entre estas dos concentraciones se continuó con la concentración original, 0.3 mM.

La etapa de hibridación es muy importante para conseguir la especificidad deseada de los cebadores. En un inicio se probaron distintas temperaturas de hibridación e incluso se realizaron pruebas de gradiente de temperatura que oscilaron entre los 55°C a 65°C, sabiendo de antemano que para las dos parejas de cebadores: OA2/OI2c y OI2c/LsoF, los ensayos de PCR se han realizado a una temperatura de hibridación de 62°C (Li *et al.* 2009; Wen *et al.* 2009). Sin embargo, el estudio en sus inicios consideró 55°C como la temperatura de hibridación que favorecía la especificidad. Lo anterior se corrigió al emplear el protocolo del programa de PCR en el que se utilizó 65°C para la etapa de hibridación y se modificaron los tiempos en cada temperatura y el número de ciclos totales. A diferencia de otras pruebas, con la temperatura de hibridación de 65°C se logró obtener patrones claros e intensos de los productos de PCR, sin la presencia de bandas no deseadas.

Con respecto a los cebadores, la pareja OI2c/LsoF se descartó debido a que se obtenían bandas poco definidas probablemente a que la eficiencia de esta pareja se ha visto que es más alta en PCR de tiempo real (Li *et al.* 2009). La pareja de cebadores OA2/OI2c, se dejó de utilizar debido a que la secuencia del cebador OI2c es diferente a la que se menciona en la literatura, difiriendo en los últimos 10 nucleótidos y siendo más larga por dos nucleótidos. La diferencia en la secuencia de éste pudo haber sido desfavorable en las uniones de los cebadores con la hebra molde. Por lo tanto, no definía a cabalidad la secuencia que se deseaba amplificar. Por lo anterior, se comenzó a utilizar la pareja de cebadores Lib OA2/ Lib IOA2c, que corresponde a la secuencia utilizada en la literatura, pero sólo se utilizó con muestras de ADN que ya llevaban varios meses de haber sido extraídas, muestras almacenadas a -20°C.

Los métodos utilizados para la extracción de ADN se compararon en relación a la concentración de ADN obtenida. La media resultante de la concentración de ADN por el método CTAB, 221.07 ng/ μ l, casi triplica la resultante por el Kit de Qiagen, 76.90 ng/ μ l. Esta diferencia es claramente distinguible en el 74% de muestras, observándose una mayor concentración en las muestras extraídas por el método CTAB, contra un 26% de muestras extraídas por el Kit de Qiagen. La diferencia de estos resultados puede ser consecuencia de varios factores, por ejemplo, el Kit de Qiagen está dirigido para la extracción de ADN en hojas y para esta prueba se utilizaron tubérculos. También, la propiedad detergente del CTAB permite que la extracción por este método sea más fuerte aunque sea poco el material de partida. Otra diferencia entre los dos métodos yace en que para la extracción a partir del Kit de Qiagen se pulveriza el material vegetal con N_2 líquido y un aplicador de madera mientras que con el método CTAB la maceración mecánica a través de un pistilo parece ser más eficiente ya que es muy probable que al utilizar N_2 líquido no se llegue a romper las paredes celulares del tubérculo. Sin embargo, al utilizar cualquiera de los dos métodos de extracción es importante partir de material fresco. Además, se debe probar el método CTAB con N_2 líquido para poder establecer si realmente la eficiencia entre ambos métodos de extracción radica en la maceración mecánica. Por otro lado, el tiempo que toma en llevar a cabo el protocolo CTAB es menor y menos tedioso que al trabajar con el Kit de Qiagen. Al trabajar un número grande de muestras es más fácil realizar la extracción mediante el método CTAB. El uso de CTAB disminuye los costos del laboratorio.

Asimismo, con el método CTAB un 32% de las muestras fueron positivas para *Ca. L. solanacearum*, duplicando el porcentaje de muestras positivas obtenidas con el Kit de Qiagen, método con el cual se obtuvo un rendimiento muy bajo a pesar del uso N_2 líquido en la fase de lisis de las células. Lo anterior no significa que el método sea eficiente para la detección de papa rayada, simplemente demuestra que para el proceso de extracción a partir de este tejido es un método bastante fiable. Sin embargo, es importante

recalcar que al momento de llevar a cabo estos ensayos, las muestras ya tenían meses de haber sido extraídas; como consecuencia el ADN extraído, posiblemente degradado, explicaría las concentraciones negativas y bajas resultantes para un buen número de muestras.

Se esperaría que al coleccionar plantas que presentan los síntomas característicos de la enfermedad de papa rayada, los análisis moleculares en el laboratorio, se realizaran sólo para corroborar la presencia del supuesto agente causal de papa rayada. Sin embargo, el que las plantas exhiban los síntomas característicos de la enfermedad, no implica que al llevar a cabo la extracción de ADN y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se detecte la presencia de *Ca. L. solanacearum*. Lo anterior se debe a que síntomas como clorosis, tallos torcidos o encartuchamientos no son exclusivos para papa rayada, o bien, a que la bacteria se puede encontrar a una concentración muy baja para que pueda ser detectada mediante esta técnica.

Los resultados del laboratorio revelaron que la mayoría de muestras resultaron negativas para *Ca. L. solanacearum*, a pesar de presentar síntomas en hojas y en tubérculos. Se observó que de las 86 muestras analizadas, diferentes partes vegetativas: hojas, vena central y tubérculo, sólo una de las muestras (muestra no. 312 T) correspondiente a un tubérculo que presentaba el manchado café (véase Apéndice 8) resultó ser positiva para *Ca. L. solanacearum* (véase Figura No. 9). Asimismo, en comparación con las demás muestras, puede decirse que corresponde a una planta cercana a cosechar por encontrarse en una edad de cultivo entre los 2 y 3 meses.

Es muy probable que otras de las muestras analizadas pudieran haber confirmado la presencia del agente causal, como es el caso de las muestras no. 351H, 351V, 353H, 353V, 354H, 354V, 355H y 355V, las cuales presentaron ADN degradado (véase Figura No. 10; Apéndice 6). El alto contenido de almidón en los tubérculos pudo afectar en la PCR como un inhibidor, o bien, acelerar el proceso de la degradación del ADN extraído.

Lo anterior reafirma el buen almacenamiento de los extractos de ADN para no tener problemas en los ensayos de PCR.

Por otro lado, se sabe que la concentración de la bacteria en la planta de papa varía grandemente dependiendo de la época del año, la edad de la planta en que ocurre la infección y la parte vegetativa de la planta colectada durante el muestreo (Alwang 2010). Igualmente, se ha comprobado que las poblaciones de *Ca. L. solanacearum* en plantas de papa afectadas con papa rayada son en promedio más bajas que las poblaciones de otros *Candidatus* como el *Ca. L. asiaticus* en la vena central de hojas de cítricos (Wen *et al.* 2009). Esto puede deberse a la corta temporada de crecimiento de las plantas de papa, que es aproximadamente cuatro meses desde la siembra hasta la cosecha. Lo que puede considerarse como un período insuficientemente amplio para que la bacteria fastidiosa alcance su población pico en la planta hospedero. Sin embargo, la bacteria puede colonizar perfectamente la planta entera de papa durante la corta temporada de crecimiento y causar, después de la floración, los síntomas foliares en las plantas de papa (Li *et al.* 2009).

Bajo condiciones de invernadero, se ha visto que los síntomas foliares de papa rayada se desarrollan en la mayoría de plantas en menos de un mes, después de haber sido inoculadas (Li *et al.* 2009). En este estudio, se observó plantas con una edad de cultivo de 15 días que presentaban ya síntomas foliares: enaciones y clorosis; y las plantas con un crecimiento mayor, edad de cultivo entre 60-90 días, presentaban una mayor cantidad de síntomas característicos de la enfermedad. Sin embargo, esto no fue suficiente para que la bacteria fuera confirmada mediante los análisis moleculares realizados en este estudio. Se ha determinado que *Ca. L. solanacearum* no es consistentemente detectada en plantas infectadas por papa rayada provenientes de invernadero o del campo mediante ensayos de PCR convencional, porque los niveles poblacionales de la bacteria se encuentran en la línea que limita los métodos de detección del PCR convencional, respecto al PCR en tiempo real (Li *et al.* 2009).

A través del pequeño estudio piloto realizado se observó que en el tubérculo se detecta con mayor eficiencia *Ca. L. solanacearum*. A lo largo del estudio, siempre se intentó trabajar solamente con el tubérculo para que los resultados de los análisis moleculares fuesen unificados. Sin embargo, en muchas ocasiones sólo se pudo obtener hojas y vena central de las plantas de papa. De igual manera, durante las colectas se tomó en cuenta la presencia de los síntomas característicos de la enfermedad. No obstante, la presencia de tubérculos aéreos, lignificación o pudrición del tallo y otros tejidos y, principalmente el manchado café en el tubérculo fueron síntomas claves a la hora de la colecta de muestras.

V. CONCLUSIONES

- A. A través del breve estudio piloto se determinó que el tubérculo es la parte vegetativa que permite una detección más puntual de *Ca. L. solanacearum*.
- B. El método de extracción CTAB comparado con DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, constituye un método rápido, fácil y de menor costo para la obtención de ADN genómico de tubérculo de la planta de papa, permitiendo obtener concentraciones de ADN aceptables para posteriores análisis moleculares como la técnica PCR.
- C. La optimización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa permitió obtener patrones de bandas claros, sin embargo para que esta técnica proporcione el resultado deseado es muy importante que en la etapa de extracción de ADN se utilice muestra debidamente almacenada para obtener ADN molde íntegro.
- D. En cuanto a la relación de los síntomas propios de la enfermedad papa rayada con el agente causal de la misma, sólo una muestra: un tubérculo de papa que presentó el manchado café, resultó positivo para *Ca. L. solanacearum*. Esto indica que se necesita una mayor sensibilidad para la detección de la enfermedad.
- E. La media resultante de la concentración de ADN por el método de extracción CTAB fue de 221.07 ng/ μ l y la media obtenida con DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen de 76.90 ng/ μ l, indicando que el método CTAB es más eficiente para la extracción de ADN del tejido del tubérculo.
- F. Para los análisis moleculares, pese a que una planta de papa presente la sintomatología general de la enfermedad de papa rayada y ésta sea evidente, la detección de *Ca. L. solanacearum* va a depender de la edad del cultivo, su

concentración dentro del tejido y la parte vegetativa de la planta de papa de la que se realiza el análisis.

- G.** La técnica de PCR convencional probablemente no tiene suficiente sensibilidad para detectar la presencia de *Ca. L. solanacearum*.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Para evitar problemas en las reacciones de amplificación como la PCR, en la etapa de extracción de ADN, se debe estar seguro que el material vegetal que se utilice sea fresco, o bien, que el extracto de ADN sea recién extraído o esté debidamente almacenado (-20°C).
- B. Es aconsejable probar el método CTAB con nitrógeno líquido para poder establecer si la diferencia con DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen en cuanto a eficiencia, se debe a la maceración mecánica.
- C. Debido a las diferencias de concentración de *Ca. L. solanacearum* en las diferentes partes vegetativas a muestrear, es importante cuantificar las muestras previamente extraídas, luego llevar todas las muestras a una misma concentración y proseguir adecuadamente con los demás análisis moleculares.
- D. Por la gran cantidad de muestras analizadas que resultaron negativas para el agente causal de la enfermedad de papa rayada, es necesario realizar un pool de las diferentes partes vegetativas de la planta cuando la edad de cultivo sea mayor o igual a 45 días porque es a esta edad cuando la enfermedad se encuentra dispersa por toda la planta. Cuando el cultivo es más joven es necesario que sea del tubérculo de donde se extraiga el ADN.
- E. Es importante continuar con la búsqueda de métodos de análisis más sensibles que permitan la confirmación fiable de *Ca. L. solanacearum*. La técnica de PCR en tiempo real, que tiene una mayor sensibilidad, puede ser la solución para la problemática de los falsos negativos resultantes con la técnica de PCR convencional. Otra técnica a probar puede ser la PCR anidada.

VII. LITERATURA CITADA

- Asociación Guatemalteca de Exportadores (AGEXPORT). 2009. *Exportaciones de papa del año 2005 al 2009*. Ventanilla Única para las Exportaciones – VUPE-.
- Alwang, J. 2010. *Integrated pest management: science for agricultural growth in Latin American and the Caribbean*. En: Muniappan, R.; L. Vaughan, M. Rich, M. Ohland y K. Mabry. Integrated pest management collaborative research support program - Annual Report, phase IV – year one: 2009-2010. 5 pp.
- Arce, F. 2002. *El cultivo de la papa*. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa, España. 495 pp.
- Banco de Guatemala. 2008. *Estadísticas de área, producción, rendimiento, importación, exportación y precio medio: 2001-2009*. Departamento de Estadísticas Económicas. Estadísticas de producción. Sección de Cuentas Nacionales.
- Brown, J. Agosto 2010. Department of plant sciences: division of plant pathology and microbiology. University of Arizona.
- Calderoni, A. 1978. *Enfermedades de la papa y su control*. Editorial Hemisferio Sur, Argentina. 143 pp. Christiansen, J. 1980.
- CONABIO. 2008. *Solanum tuberosum*. Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). 27 pp.

- Crosslin, J. M. y J. Munyaneza. 2009. *Evidence that the Zebra Chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and In Vitro*. American Journal of Potato Research (AM. J. Pot Res), 86(3):183-187.
- De León, J.A.; G. A. Chávez y T. Matsumoto. 2002. *Catálogo de variedades de papa*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, Guatemala. 22 pp.
- Gao, F.; J. Jifon, X. Yang y T. Liu. 2009. *Zebra chip disease incidence on potato is influenced by timing of potato psyllid infestation, but not by the host plants on which they were reared*. Insect Science, 16:399-408.
- Hansen, A. K.; J. T. Trumble, R. Stouthamer y T. D. Paine. 2008. *A New Huanglongbing species, "Candidatus Liberibacter psyllaourous," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid Bactericera cockerelli (Sulc)*. Applied and Environmental Microbiology, 74(18):5862-5865.
- I Curso sobre tecnología del cultivo de la papa y técnicas de producción de semilla*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA; Programa Regional Cooperativo de Papa, PRECODEPA. Quetzaltenango, Guatemala. 197 pp.
- Li, R., Salih, S., Hurtt, S., 2004. *Detection of geminiviruses in sweetpotato by polymerase chain reaction*. Plant Dis. 88 (12):1347–1351.
- Li, W.; J. A. Abad, R. D. French-Monar, J. Rascoe, A. Wen, N. C. Gudmestad, G. A. Secor, I. Lee, Y. Duan y L. Levy. 2009. *Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of "Candidatus Liberibacter solanacearum" in potato plants with zebra chip*. Journal of Microbiological Methods, 78:59-65.

- Lin, H.; H. Doddapaneni, J.E. Munyaneza, E. L. Civerolo, V. G. Sengoda, J. L. Buchman y D. C. Stenger. 2009. *Molecular characterization and phylogenetic analysis of 16S rRNA from a new "Candidatus Liberibacter" strain associated with Zebra Chip Disease of potato (Solanum tuberosum L.) and the potato psyllid (Bactericera cockerelli Sulc)*. Journal of Plant Pathology, 91 (1):215-219.
- Liefting, L. W.; P. W. Sutherland, L. I. Ward, K. L. Paice, B. S. Weir y G. R. G. Clover. 2009. *A new "Candidatus Liberibacter" species associated with diseases of solanaceous crops*. Plant Disease, 93(3):208-214.
- Maselli, S. y R. Cobaquil. 2008. *Segundo Informe Nacional: El Estado de los recursos fitogenéticos*. 1ª. Edición. Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA) y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Guatemala. 101 pp.
- Miranda, O. y R. del Valle. 1983. *Recomendaciones agronómicas para el cultivo de la papa en Chimaltenango*. Folleto técnico 24. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), Guatemala. 52 pp.
- Munyanenza, J.; J. Goolsby, J. M. Crosslin y J. E. Upton. 2007. *Further evidence that Zebra Chip Potato Disease in the Lower Rio Grande Valley of Texas is associated with Bactericera cockerelli*. Subtropical Plant Science, 59:30-37.
- Munyaneza, J.; J. Crosslin y G. de la Rosa-Lozano. 2009. *First report of Candidatus Liberibacter psyllaourous in Potato Tubers with Zebra Chip disease in Mexico*. Plant Disease Note, 93 (5): 552.

- Murray, R. G. E. y E. Stackebrandt. 1995. *Taxonomic Note: Implementation of the Provisional Status Candidatus for Incompletely Described Procaryotes*. International Journal of Systematic Bacteriology, 45(1):186-187.
- Palmieri, M. Julio 2010. Dirección del Departamento de Biología, Laboratorio de Patología Vegetal y de Cultivo de Tejidos Vegetales. Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, C.A.
- Secor, G. A.; V. Rivera, J. Abad, I. Lee, G. Clover, L. Liefting, X. Li y S. De Boer. 2009. *Association of "Candidatus Liberibacter solanacearum" with Zebra Chip Disease of Potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR*. Plant Disease, 93(6):574- 583.
- Wen, A., I. Malik, V. Y. Alvarado, J. S. Pasche, X. Wang, H. B. Scholthof, T. E. Mirkov, C. M. Rush, N. C. Gudmestad. 2009. *Detection, distribution, and genetic variability of "Candidatus Liberibacter" species Associated with Zebra Complex disease of potato in North America*. Plant Disease, 93(11):1102-1115.

DOCUMENTOS ELECTRÓNICOS CONSULTADOS:

- Borba, N. 2008. *La papa un alimento básico: posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica*. Red de Acción en Plaguicidas y su Alternativas para América Latina (RAP-AL Uruguay). [Web en línea] en: <http://www.rapaluruway.org/transgenicos/Papa/Papa.pdf>. 10 pp.
- Gregory, P. y H. Andrade. 1996. *Principales enfermedades, nemátodos e insectos de la papa*. Centro Internacional de la Papa, Perú. [Web en línea] En: <http://www.todopapa.com.ar/pdf/ppalesenfermedadesnematodoseinsectosdepapa.pdf>

- Market Access Solutionz. 2008. *Liberibacter, Zebra Chip, & the tomato/potato psyllid*. Potato Product Group of Horticulture New Zealand. [Web en línea] En: http://www.potatoesnz.co.nz/user_files/PDF/Liberibacter_Grower_Update_Sept08.pdf [con acceso el 25 de febrero de 2010].
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGA). 2010. *El Agro en cifras 2010*. 2ª Edición. Unidad de Políticas e Información Estratégica, Guatemala. 42 pp. [Web en línea] En: http://portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/2010/documentos/El%20Agro%20en%20Cifras_octubre2010.pdf
- Trujillo, E. y S. Perera. 2009. *Plagas y enfermedades de la papa. Identificación y control*. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural, Área de Aguas y Agricultura. Cabildo Insular de Tenerife. [Web en línea] En: http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/papa_112_A_Plagenfpapa.pdf
- Yáñez, E.; S. Máttar y A. Durango. 2008. *Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba*. Infectio, 12(4): 246-253. [Web en línea] En: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0123-93922008000400003&script=sci_arttext&tlng=pt

VIII. APÉNDICES

1. Extracción de ADN: DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen

Previo a la extracción de ADN, seguir cuidadosamente las instrucciones del fabricante².

1. A la muestra ya pulverizada, inmediatamente se le debe añadir 400 μ l de tampón AP1 y 4 μ l de RNasa A a cada tubo y mezclarlo por agitación utilizando un vortex.
2. El tubo conteniendo AP1 y RNasa debe incubarse a 65°C por 10 min. en la incubadora/agitadora. Los tampones AP1 y RNasa A no deben mezclarse antes de su uso.
3. Sacar las muestras de la incubadora/agitadora y centrifugarlas rápidamente antes de abrir el tubo para evitar la contaminación cruzada.
4. Añadir 130 μ l de buffer AP2 a cada muestra. Mezclarlo en el agitador (vortex) e incubar en hielo durante 5 minutos.
5. Centrifugar la muestra durante 5 min. a máxima velocidad (14,000 rpm).
6. Trasladar el sobrenadante hacia la columna minispin QIA desfibadora (tubos color lila) y centrifugar durante 2 min. a 14,000 rpm.
7. El sobrenadante resultante, usualmente 350 μ l a 400 μ l, debe trasladarse a un nuevo tubo de 1.5 μ l. Es importante tomar en cuenta el volumen transferido.
8. Añadir 1.5 volúmenes del buffer AP3/E y mezclar inmediatamente (pipeteando).
9. Pipetear hasta 650 μ l de la muestra en una columna DNeasy (tubos de color

² Observación: antes de iniciar el proceso de extracción de ADN utilizando el Kit de Qiagen, se recomienda encender la incubadora/agitadora a 65°C y revisar que el tampón AP1 no presente una condición turbia, si la presenta debe de colocarse en baño de maría a 65°C por unos minutos hasta que aclare.

blanco)

10. Centrifugar durante un minuto a 8,000 rpm.
11. Descartar el líquido obtenido, el resto del sobrenadante se agrega a la columna y se centrifuga por 1 min. a 8,000 rpm, descartando el líquido y el tubo colector.
12. Colocar la columna DNeasy en un nuevo tubo de 2 ml (parte del kit de extracción).
13. Añadir 500 µl de tampón AW a la columna y centrifugar por 1 min. a 8,000 rpm.
Descartar el líquido y re-usar los tubos colectores.
14. Añadir 500 µl de tampón AW a la columna y centrifugar por 2 min. a 14,000 rpm. asegurándose que la membrana esté seca.
15. Descartar el flujo y volver a centrifugar durante un minuto adicional.
16. Trasladar la columna DNeasy a un tubo nuevo de 1.5 ml con la tapa cortada (guardar la tapa), añadir a la columna 50 µl de buffer de elusión a temperatura ambiente.
17. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 5 min.
18. Centrifugar durante 1 min. a 8,000 rpm.
19. Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml y el tubo que quedó con la elusión, taparlo y rotularlo. Las muestras, debidamente rotuladas, deben ser almacenadas a -20°C.
20. Si se desea una segunda elusión, copia de seguridad o para nuevas pruebas, la columna DNeasy que ya se encuentra en un tubo nuevo de 1.5 ml con la tapa cortada (guardar la tapa), se le debe añadir 200 µl de buffer de elusión a temperatura ambiente. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 5 min., centrifugar durante 1 min. a 8,000 rpm. Retirar la columna y el tubo con la elusión, taparlo y rotularlo. Al igual que la primera elusión, las muestras deben estar rotuladas y almacenarse a -20°C.

2. Extracción de ADN: CTAB

1. Colocar en un tubo de 1.5 ml lo que corta dos veces la tapadera del tubo. Se obtiene mejores resultados si se congela la muestra con nitrógeno líquido y se pulveriza inmediatamente.
2. Si no se utiliza nitrógeno líquido, agregar rápidamente 600µl de buffer CTAB precalentado a 65°C (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA y 0.2% 2-mecaptoetanol) macerar con la ayuda de un macerador mecánico. Asegurarse siempre, después de cada muestra, de desinfectar el pistilo del macerador con cloro al 10% y agua destilada.
3. Incubar las muestras a 65°C durante 20 minutos con agitación constante.
4. Agregar 600µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y agitar vigorosamente. Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos.
5. La capa superior (acuosa) formada en el paso anterior, transferirla cuidadosamente a un nuevo tubo de 1.5 ml. Agregar 60µl de acetato de amonio 7.5M y 400µl de isopropanol frío. Agitar por inversión hasta que no se vea turbia la solución.
6. Dejar los tubos a -20°C por un mínimo de 30 min o toda la noche.
7. Centrifugar las muestras a 14,000 rpm por 15 minutos. Decantar el sobrenadante.
8. Lavar el sedimento con 250 µl de etanol al 70% frío por 10 minutos, sin agitar el pellet.
9. Decantar el sobrenadante y colocar los tubos boca abajo sobre una servilleta de papel durante 10 minutos, voltear los tubos y dejarlos secar por 10 minutos a temperatura ambiente o a 65°C por 5 minutos. Es importante que el pellet esté seco.
10. Resuspender el pellet en 25µl ó 60 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) previamente calentado a 65°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente y agitar suavemente hasta que se disuelva el precipitado.
11. Almacenar el ADN resuspendido a 4°C (Li *et al.* 2004).

3. Fotografías de la gira de campo a Quetzaltenango y San Marcos, Guatemala.

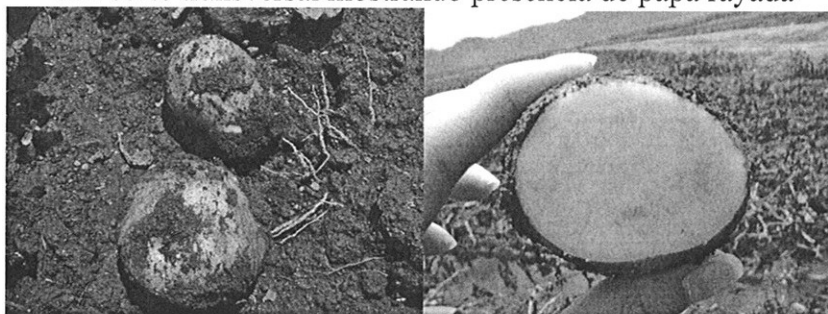
Imagen
Campo de cultivo de papa variedades:
FL 1867 y Atlantic. Urbina, Quetzaltenango



Imagen
Dos plantas de papa mostrando un tallo ya lignificado



Imagen
Tubérculos de papa recién desenterrados y tubérculo
con corte transversal mostrando presencia de papa rayada



Imagen

Presencia de tubérculo aéreo en una planta de papa



Imagen

Paratíozia en un envés de una hoja de la planta de papa



Imagen

Campo de cultivo de papa variedad FL 1867.
INDECA, Quetzaltenango



Imagen

Campo de cultivo de papa variedad FL1867. La Laguna, San Marcos



Imagen

Campo de cultivo de papa variedad Loman.
Cerezos, Serchil, San Marcos



Imagen

Flor de la planta de papa, el color lila corresponde a la variedad Atlantic y el color blanco a la variedad Tollocan.



4. Fotografías de la gira de campo a Sololá, Guatemala.

Imagen

Planta de papa presentando encartuchamiento, clorosis y quemaduras en las hojas y tubérculos aéreos.

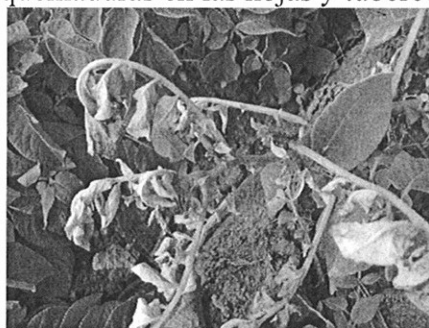


Imagen
Campo de cultivo de papa variedad Loman,
Caserío San Isidro, Sololá



Imagen
Campo de cultivo de papa variedad Loman,
Monte Mercedes, Sololá



Imagen
Campo de cultivo de papa variedad Loman,
Escuela de Formación Agrícola (EFA), Sololá



Imagen

Campo de cultivo de papa variedad Loman,
San José Chacayá, Cantón Shuashek, Sololá



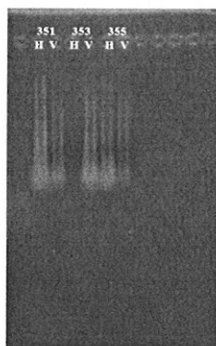
5. Datos de la localidad, variedad y síntomas de las 31 muestras de tubérculos colectados en el departamentos de Quetzaltenango, Guatemala.

No. Muestra	Localidad	Variedad	Síntomas
31	Urbina	Atlantic	Punta morada, tubérculos aéreos
32	Urbina	Atlantic	Sana
33	Urbina	Atlantic	Tubérculos aéreos, papa rayada
35	Urbina	Atlantic	Hojas marchitas, tubérculos café y estolón morado
37	Urbina	Atlantic	Hojas marchitas, tubérculos café
44	120 cuerdas	FL 1867	Tubérculos con mancha
45	121 cuerdas	FL 1867	Posible enferma: tubérculos aéreos. Tubérculo lignificado por dentro
46	122 cuerdas	FL 1867	Clorosis, tubérculos aéreos y tubérculos manchados
47	123 cuerdas	FL 1867	Clorosis, tubérculos manchados y lignificado por dentro
48	124 cuerdas	FL 1867	Sana
49	125 cuerdas	FL 1867	Hojas marchitas, tubérculos aéreos y tubérculos manchados
52	100 cuerdas	FL 1867	Tubérculo enfermo
53	100 cuerdas	FL 1867	Tubérculo enfermo
56	100 cuerdas	FL 1867	Sana
69	INDECA	FL 1867	Tubérculos manchados; presencia de huevos de paratarioza
70	INDECA	FL 1867	Tubérculos aéreos, estolón lignificado y tubérculos manchados.
71	INDECA	FL 1867	Tubérculo manchado
73	INDECA	FL 1867	Clorosis, hojas marchitas, tubérculos manchados y lignificados
75	INDECA	FL 1867	Tubérculo manchado

6. Datos de la localidad, variedad y síntomas de las 31 muestras de tubérculos colectados en San Marcos, Guatemala.

No. Muestra	Localidad	Variedad	
	San Marcos		
83	La Laguna	FL 1867	Aparentemente sana: clorosis
84	La Laguna	FL 1867	Aparentemente sana: clorosis
93	Cerezos, Serchil	Loman	Clorosis, deformación de brotes, tubérculo manchado
96	Cerezos, Serchil	Tollocan	Encartuchamiento de hojas, tubérculos aéreos y tubérculos manchados
97	Cerezos, Serchil	Tollocan	Encartuchamiento de hojas, tubérculos aéreos
98	Cerezos, Serchil	Soloma	Encartuchamiento de hojas, tubérculos aéreos
99	Cerezos, Serchil	Soloma	Encartuchamiento de hojas, tubérculos aéreos
100	Cerezos, Serchil	Tolimán	Encartuchamiento de hojas, tubérculos aéreos, tubérculos manchados
103	Cerezos, Serchil	Loman	Problema en semilla
104	Cerezos, Serchil	Loman	Problema en semilla
105	Cerezos, Serchil	Loman	Problema en semilla
106	Cerezos, Serchil	Loman	Problema en semilla

6. Integridad de las muestras no. 351H, 351V, 353H, 353V, 354H, 354V, 355H y 355V, provenientes de plantas de papa colectadas en Sololá, Guatemala, en febrero 2011. H y V corresponden a las partes vegetativas analizadas: hojas y vena central.



7. Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011. *Las iniciales refieren a la parte vegetativa de la que se obtuvo ADN: hoja (H) y vena central (V). En el caserío Peña Blanca, Sololá

*No. Muestra	Fecha del muestreo
266 H	dic-10
266 V	dic-10
267 H	dic-10
267 V	dic-10
268 H	dic-10
268 V	dic-10
269 H	dic-10
269 V	dic-10
270 H	dic-10
270 V	dic-10
271 H	dic-10
271 V	dic-10
272 H	dic-10
272 V	dic-10
273 H	dic-10
273 V	dic-10
274 H	dic-10
274 V	dic-10
275 H	dic-10
275 V	dic-10
295 T	dic-10
295 H	dic-10
295 V	dic-10
296 T	dic-10
296 H	dic-10
297 H	dic-10
298 T	dic-10
298 H	dic-10
298 V	dic-10
299 H	dic-10
300 H	dic-10

8. Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011. *Las iniciales refieren a la parte vegetativa de la que se obtuvo ADN: hoja (H) y vena central (V). En el caserío San Isidro, Sololá.

309 T	feb-11
309 H	feb-11
309 V	feb-11
310 T	feb-11
310 H	feb-11
310 V	feb-11
311 T	feb-11
311 H	feb-11
311 V	feb-11
312 T	feb-11

9. Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011. *Las iniciales refieren a la parte vegetativa de la que se obtuvo ADN: hoja (H) y vena central (V). EFA, Sololá.

317 T	feb-11
318 T	feb-11
318 H	feb-11
318 V	feb-11
319 T	feb-11
319 H	feb-11
319 V	feb-11
320 T	feb-11
320 H	feb-11
320 V	feb-11
321 T	feb-11
321 H	feb-11
321 V	feb-11
322 T	feb-11
322 H	feb-11
322 V	feb-11

10. Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011. *Las iniciales refieren a la parte vegetativa de la que se obtuvo ADN: hoja (H) y vena central (V). Monte Mercedes, Sololá

328 T	feb-11
328 H	feb-11
328 V	feb-11
329 T	feb-11
329 H	feb-11
329 V	feb-11
330 T	feb-11
330 H	feb-11
330 V	feb-11
331 T	feb-11

11. Datos de la localidad exacta del muestreo realizado en Sololá, Guatemala, durante diciembre 2010 y febrero 2011. *Las iniciales refieren a la parte vegetativa de la que se obtuvo ADN: hoja (H) y vena central (V). San José Chacayá, Sololá

351 H	feb-11
351 V	feb-11
352 T	feb-11
353 T	feb-11
353 H	feb-11
353 V	feb-11
354 T	feb-11
354 H	feb-11
354 V	feb-11
355 H	feb-11
355 V	feb-11

12. Muestra no. 312 T, tubérculo presentando las manchas café características de papa rayada. **A.** tubérculo entero; **B.** corte transversal del tubérculo para mostrar la sintomatología.

