

**Presencia de la bacteria *Candidatus
liberibacter solanacearum*, en cuatro cultivos
de *solanaceae*: tomate, chile, papa y berenjena**

Luis Alberto Blandón Zelaya

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCION AGROPECUARIA

**Presencia de la bacteria *Candidatus
liberibacter solanacearum*, en cuatro cultivos
de *solanaceae*: tomate, chile, papa y berenjena**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Luis Alberto Blandón Zelaya

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

Presencia de la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum*, en cuatro cultivos de *solanaceae*: tomate, chile, papa y berenjena

PÁGINA DE FIRMAS

Presentado por:

Luis Alberto Blandón Zelaya

Aprobado:

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y producción
agropecuaria

Edwin Flores, M.Sc.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Estela Aguilar, M.Sc.
Asesor

RESUMEN

Blandón Zelaya, L.A. 2012. Presencia de la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum*, en cuatro cultivos de *solanaceae*: tomate, chile, papa y berenjena. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 16 p.

Bactericera cockerelli Sulc es el vector de la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum* infestando a cultivos como berenjena, chile, tomate y papa. Los productores hortícolas han sido seriamente afectados económicamente por el daño que causa esta bacteria. El objetivo del estudio fue demostrar la presencia de *C. liberibacter solanacearum* en los cultivos de tomate, chile, papa y berenjena en Zamorano, Honduras. Para realizar el estudio se evaluaron 224 plantas durante los meses de marzo a julio del 2012, las plantas fueron expuestas a campo abierto durante dos semanas para que *B. cockerelli* pudiera alimentarse y ovopositar en las plantas, las plantas se ubicaron en tres zonas de Zamorano más el testigo. Las plantas fueron analizadas mediante la técnica molecular de PCR para la determinación de *C. liberibacter solanacearum*. Se utilizó un análisis de varianza usando un modelo factorial con separaciones de medias por Tukey al $P \leq 0.05$. En las zonas no hubo diferencias significativas en el porcentaje de plantas infectadas por *C. liberibacter solanacearum*. Los porcentajes de infección de *C. liberibacter solanacearum* en plantas de tomate, chile y berenjena fue en promedio 37.37% y en papa solo se obtuvo 1.96%. Entre marzo a junio el porcentaje de infección de *C. liberibacter solanacearum* en las plantas de la familia *solanaceae* fue de 34.47%. En julio ninguna planta resulto positiva, posiblemente por la gran cantidad de lluvia

Palabras clave: *Bactericera cockerelli* Sulc, zebra chip.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4. CONCLUSIONES	8
5. RECOMENDACIONES.....	9
6. LITERATURA CITADA	10
7. ANEXOS	12

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Cantidades de plantas por cultivo sembradas y analizadas.....	3
2. Porcentaje de plantas infectadas por <i>C. liberibacter solanacearum</i> en diferentes fechas.....	5
3. Porcentaje de plantas infectadas por <i>C. liberibacter solanacearum</i> por zona.....	6
4. Porcentaje de plantas infectadas por <i>C. liberibacter solanacearum</i> por cultivo	6
Figuras	Página
1. Foto del gel de PCR cuarto lote de muestras, muestras tomate papa y chile.....	7
2. Fotos de plantas de tomate con síntomas presentes con presencia de <i>C. liberibacter solanacearum</i>	15
3. Fotos de plantas de chile con síntomas presentes con presencia de <i>C. liberibacter solanacearum</i>	15
4. Foto de plantas testigos ubicadas en las jaulas con malla antiviral.	16
5. Secuencias de <i>C. liberibacter solanacearum</i> en tomate.....	16
Anexos	Página
1. Protocolo para Extracción de ADN de tejido vegetal para análisis de <i>Candidatus Liberibacter</i> en el laboratorio de Diagnostico Molecular en Zamorano.	12
2. Reactivos utilizados para PCR para determinar <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	14
3. Protocolo para el análisis de PCR.	14
4. Proceso de termociclado para la desnaturalización del ADN, y la alineación de los primers en la cadena de ADN.	15

1. INTRODUCCIÓN

Las hortalizas de la familia *solanaceae* principalmente tomate y papa son considerados unos de los cultivos hortícolas más consumidos y de los más producidos a nivel de Centro América. Estos cultivos están siendo seriamente afectados por el psilido de la papa conocida como paratrioza, *Bactericera cockerelli* Sulc, (Homoptera:Psyllidae), que es el vector de la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum* causante de la enfermedad conocida como “zebra chip” en papa y punta morada en tomate (Hansen et al. 2008). La papa fue el primer cultivo donde se descubrió por primera vez la enfermedad (Rush et al. 2010). Además existen reportes de grandes pérdidas económicas en los cultivos de papa, tomate y otros cultivos de *solanaceae*s en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Centro América (Munyanza y Henne 2012).

El adulto de *B. cockerelli* es muy pequeño mide 2.5 mm de largo. La vida de este insecto oscila entre 20 a 63 días, la hembra vive dos veces más que el macho. La hembra puede colocar de 300 a 500 huevos en toda su vida (Knowlton y Janes 1931, Pletsch 1947, Abdullah 2008, Yang y Liu 2009). Los huevos de *B. cockerelli* son colocados principalmente en los bordes de las hojas y en la parte baja de la hoja. Los huevos eclosionan después de 3 a 7 días posterior a la ovoposición (Pletsch 1947, Wallis 1955, Capinera 2001, Abdullah 2008). Las ninfas se ubican en el envés de la hoja por protección a la luz, permanecen sedentarias hasta que se convierten en adultos. Existen cinco estadios ninfales de este insecto (Rowe y Knowlton 1935, Pletsch 1947, Wallis 1955), tienen un color verde amarillento y los ojos compuestos son de color rojizo, de esta manera se diferencian de las ninfas de mosca blanca (*Bemisia tabaci*). *B. cockerelli* se desarrolla de una forma más rápida cuando se alimenta de berenjena que cuando lo realiza en chile. La supervivencia de huevo a adulto también fue mayor en berenjena que en chile. Por ende *B. cockerelli* se desempeña mejor cuando se alimenta en berenjena (Yang y Liu 2009).

Candidatus liberibacter es una bacteria Gran negativa, bacterias que no se pueden cultivar, pertenece al grupo alphaproteobacterias (Jagoueix et al. 1994; Bové 2006). El principal vector de estas bacterias son los psilidos (Boven 2006). *Candidatus liberibacter* se detectó en una planta de tomate y cinco especies más de la familia *solanaceae*, incluido chile con síntomas provocados por la bacteria y por medio de la técnica de PCR y posteriormente por la secuenciación del gen se demostró que *C. liberibacter* estaba afectando a estos cultivos, por esto se le atribuye *solanacearum* (Liefing et al. 2009).

En Honduras se registró la presencia de *B. cockerelli* en 2002, en las principales zonas productoras de papas (Espinoza 2010). En el 2010 se realizó un muestreo y solamente en tres zonas del departamento de Intibuca presentaron síntomas foliares y decoloración de tubérculos en asociación con *C. liberibacter* (Espinoza 2010). Estudios realizados demuestran que mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) se puede determinar la presencia de *C. liberibacter*, 2 a 3 semanas después de haber sido inoculada la planta (Levy et al. 2011).

El objetivo del presente estudio fue demostrar la presencia de *C. liberibacter* en los cultivos de tomate, chile, papa y berenjena en Zamorano, Honduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana – Zamorano en tres localidades dentro de la institución: la parcela de Conservación de Suelos y Aguas, Zona II y la parcela de Control Biológico en Zona I, adicionalmente se colocaron plantas en una jaula con malla antiviral para tenerlas aisladas de *B. cockerelli* sirviendo como testigo. Se utilizaron cuatro cultivos de la familia *solanaceas* (Cuadro 1). Se realizaron cinco muestreos en total, iniciando con el primer muestreo en campo el 16 de marzo y realizando el último muestreo el 6 de julio.

Cuadro 1. Cantidades de plantas por cultivo sembradas y analizadas.

Cultivos	Plantas Sembradas	Plantas Analizadas
	Número	Número
Tomate	100	80
Chile	100	86
Papa	80	51
Berenjena	7	7
Total	287	224

Las plantas se trasplantaron en maceteras de 30×30cm con un medio preparado a base de 2.5 partes de medio estéril Pindstrub[®], 1.5 partes de compost y 1 parte de arena, adicional se le aplicaron a cada macetera 80 gramos de DAP (18:46:0). Las plantas fueron trasplantadas después de 30 a 35 días en el caso del tomate y chile respectivamente, las de berenjena se trasplantaron al igual que el chile después de 35 días, luego del trasplante se mantuvieron una semana en condiciones protegidas en jaulas con malla antiviral, dos semanas de exposición en campo y una semana más en condiciones aisladas con el fin de que los huevos de *B. cockerelli* que estuvieran en las plantas eclosionaran y se convirtieran en ninfas y que estas pudieran hacer la inoculación, además para dar tiempo a que *C. liberibacter* se desarrollara en las plantas y poder ser detectadas mediante PCR. Posterior a la exposición de las plantas se realizó el muestreo de insectos contando la cantidad de huevos y ninfas que estuviesen presentes en las plantas en la hoja más joven completamente desarrollada.

Las plantas debidamente identificadas fueron llevadas al laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana, para recolectar dos piezas de tallo de 2 cm que estuviesen más cercanas a las raíces y dos venas de las hojas más afectadas o más sintomáticas. Se procedió a realizar la extracción del ADN de las piezas recolectada y la purificación del ADN de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio (Anexo 1). Para el PCR se utilizaron dos primers: OA2 y OI2 para poder determinar la presencia de *C. liberibacter solanacearum*. Utilizando el protocolo de reacción y condiciones de termociclado (Anexo 2, Anexo 3).

Para visualizar los resultados del PCR las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1% el cual se corrió durante una hora a 80 voltios, posteriormente fue teñido con bromuro de etidio y se colocó en un transiluminador para verificar la presencia o ausencia de ADN de *C. liberibacter solanacearum* en las muestras. El producto de PCR de las muestras de chile, tomate y berenjena que resultaron positivas, se les realizó un proceso de purificación para enviar a secuenciar el ADN a la Universidad de Texas en Tyler. Una vez obtenido la secuencia, esta se compara en el genbank.

La colecta de los adultos y las ninfas de *B. cockerelli* se realizó en los muestreos donde había presencia de los mismos, se colectaron en tubos eppendorf de 2500 ml, luego fueron llevados al laboratorio y se realizó un protocolo de extracción de ADN similar al utilizado para extracción de ADN de tejido vegetal. De la misma manera el protocolo para PCR y electroforesis fue el utilizado para el tejido vegetal (Anexo 2).

Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza usando un modelo factorial, pero incompleto pues no hay todos los cultivos en todas las localidades y fechas. Por esto solo se puede analizar los efectos principales y no las interacciones. Para analizar se usó un General Linear Model (GLM) que permite tener números de muestras distintas y se realizó la separación de medias por Tukey al $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se muestreó un total de 224 plantas de los cuatro cultivos de *solanaceaes* en estudio. Las cantidades de plantas por cultivos no son iguales por lo tanto no se pueden analizar las interacciones entre los cultivos. Sin embargo hubo diferencia significativa entre las fechas y los cultivos pero no hubo diferencia significativa en cuanto a las zonas.

Cuadro 2. Porcentaje de plantas infectadas por *C. liberibacter solanacearum* en diferentes fecha.

Fechas	Cantidad	Porcentaje de infección
16-Mar-12	38	28.9a
06-Abr-12	57	38.6a
04-May-12	56	30.4a
01-Jun-12	30	40a
06-Jul-12	43	0b
Total	224	27.67

Datos con misma letra no son diferentes estadísticamente por separación de medias por Tukey ($P \leq 0.05$).

No se encontró diferencias significativas entre los muestreos de marzo a junio, en el muestreo de julio no hubo infección por lo tanto difiere de los muestreos anteriores. Entre las fechas de muestreo de marzo a junio el promedio de plantas infestadas es de 34.42%.

En el muestreo de mayo la cantidad de huevos de *B. cockerelli* fue de 30 en seis plantas de tomate de las cuales tres plantas resultaron positivas para *C. liberibacter solanacearum*, en la zona donde hubo mayor incidencia de huevos fue en Zona I con un conteo de 19 huevos en tomate y dos plantas positivas para *C. liberibacter solanacearum*.

En junio la cantidad de plantas que se analizaron fue menor a los anteriores debido a que hubo presencia de lluvias fuertes y seguidas, y muchas plantas murieron por presencias de hongos, bacterias y el viento fuerte. Sin embargo fue el único muestreo donde se obtuvo la presencia de *C. liberibacter solanacearum* en berenjena. También se realizó el conteo de ninfas y se obtuvo un total de nueve ninfas presentes en dos plantas de tomate ubicadas en zona I y resultaron positivas para *C. liberibacter solanacearum*. En Chile se obtuvo como resultado ocho ninfas en dos plantas de Chile ubicadas en zona I resultando negativas para *C. liberibacter solanacearum*.

En julio el porcentaje de infección fue de cero, en este muestreo las lluvias fueron más intensas que la de los muestreos anteriores, la incidencia de la plaga fue nula y las plantas no presentaron síntomas, posiblemente las condiciones climáticas disminuyeron la presencia de *B. cockerelli*. Se atribuye a que la incidencia de plagas es más frecuente en la época seca.

Cuadro 3. Porcentaje de plantas infectadas por *C. liberibacter solanacearum* por cultivo.

Cultivos	Cantidad	Porcentaje de infección
Berenjena	7	42.8a
Chile	86	43.0a
Papa	51	1.9b
Tomate	80	26.3a

Datos con misma letra no son diferentes estadísticamente por separación de medias por Tukey ($P < 0.05$).

La papa tiene un bajo porcentaje de infección de 1.96% por lo tanto difiere de los demás cultivos. Posiblemente se atribuye a que el material vegetal de la papa no era el adecuado para la inoculación de *C. liberibacter solanacearum* por *B. cockerelli* por la mala calidad de las plantas. En los cultivos de berenjena, chile y tomate no hubo diferencia significativa, estos cultivos tenían 37.37% de infección promedio. Los síntomas presentes en las plantas de berenjena se vieron marcados en las hojas no desarrolladas completamente, presentaron una coloración morada y las hojas arrugadas. En tomate los síntomas presentes son las nervaduras de color morado, las hojas con un ligero dobles hacia adentro (Anexo 4). En chile las hojas presentaron clorosis entre las venas (Anexo 5).

Cuadro 4. Porcentaje de plantas infectadas por *C. liberibacter solanacearum* por zona.

Zona	Cantidad	Porcentaje de infección
Conserv. Suelos	58	25.9a
Testigo	58	24.1a
Zona I	66	25.8a
Zona II	42	38.1a

Datos con misma letra no son diferentes estadísticamente por separación de medias por Tukey ($P < 0.05$).

En las zonas no hubo diferencias significativas en el porcentaje de plantas infectadas por *C. Liberibacter solanacearum*. Las plantas testigos que se tenían en las jaulas aisladas del vector resultaron con el mismo porcentaje de infección de las expuestas en el campo. Posiblemente al reintroducir las plantas del campo a la jaula el vector contaminó las plantas testigo. Los porcentajes de infección de *C. Liberibacter solanacearum* son dudosos debido a que fueron afectados por contaminación cruzada.

Adicionalmente se analizó una maleza *Nicandra physaloides* presente en el lote de papa cultivada en zona II donde se ubicaban las plantas a estudiar, la maleza tenía presencia de huevos y podía resultar un hospedero alternativo de *B. cockerelli*, sin embargo no tenía presencia de *C. liberibacter solanacearum*.

PCR Insectos. De las ninfas y adultos recolectados en los muestreos de abril y mayo que fueron analizados por PCR se obtuvo un insecto adulto positivo para la presencia de *C. liberibacter solanacearum* proveniente del muestreo de abril.

El tamaño de las bandas amplificadas por PCR eran las esperadas por lo tanto las muestras que se estaban analizando, si contenían *C. liberibacter solanacearum* (Figura 1). De los productos de PCR que se enviaron a secuenciar se nos informa que al comparar dichas secuencias con el genbank estas tenían 100% de identificación con *C. liberibacter solanacearum* (conversación personal, Blake Bextine, Ph.D. Universidad de Texas en Tyler). A la fecha únicamente hemos recibido solamente la secuencia de ADN de *C. liberibacter solanacearum* en tomate (Anexo 8). Se está en la espera del envío de las secuencias del ADN de Chile y berenjena.

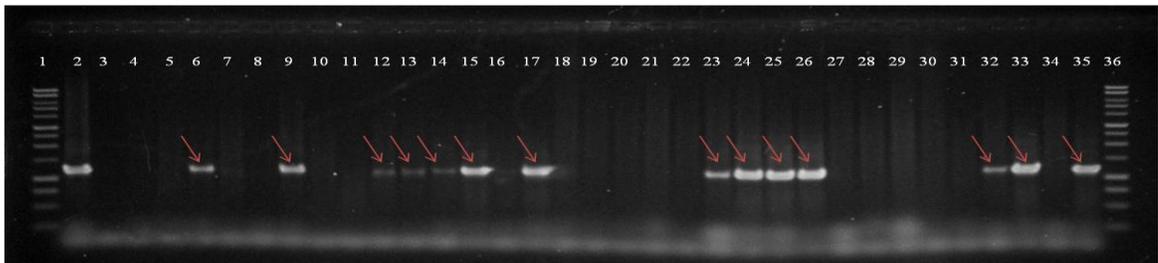


Figura 1. Foto del gel de PCR cuarto lote de muestras. Muestras de tomate, papa, berenjena y Chile. Números: 1 y 36 son escaleras, de 2 a 4 controles, 5 y 6 berenjena de zona II, 7 Chile zona II, 8 papa zona II, de 9 a 13 Chile conservación de suelos, 14 papa de conservación de suelos, de 15 a 17 tomate conservación de suelos, de 18 a 22 testigo, de 22 a 27 tomate zona I, de 28 a 32 Chile zona I y 33 a 35 berenjena zona I.

4. CONCLUSIONES

- Los porcentajes de infección de *C. liberibacter solanacearum* en plantas de tomate, chile y berenjena fue en promedio 37.37% y en papa solo se obtuvo 1.96%, bajo las condiciones del estudio.
- Entre Marzo a Junio el porcentaje de infección de *C. liberibacter solanacearum* en las plantas de la familia *solanaceae* fue de 34.47%. En Julio un mes lluvioso no se encontró plantas infestadas con *C. liberibacter solanacearum*

5. RECOMENDACIONES

- Realizar otro estudio incluyendo Berenjena, Tabaco y otros cultivos de la familia *solanaceae* para tener una certeza más grande del porcentaje de infección.
- Estudiar el comportamiento tanto de *B. cockerelli* como de *C. liberibacter solanacearum* en las malezas más comunes de la familia *solanaceae*.
- Hacer el análisis utilizando primer dirigidos a otras regiones del genoma de *C. liberibacter*.

6. LITERATURA CITADA

Abdullah, N.M.M. 2008. Life history of the potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera:Psyllidae) in controlled environment agriculture in Arizona. African Journal of Agricultural Research 3, 60–67.

Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7–37.

Capinera, J.L. 2001. Handbook of vegetable pests. Academic Press, San Diego, CA. p 729

Espinoza, H. R. 2010. Facing the *Bactericera cockerelli*/*Candidatus liberibacter* complex in Honduras. Proceeding of the 10th annual zebra chip reporting session. Departamento de Protección Vegetal, FHIA, La Lima, Cortés, Honduras. p 47-49

Hansen, A.K., Paine, T.P., Stouthamer, R. 2008. Discovery of *Candidatus liberibacter psyllaourous* and its insect vector the tomato psyllid (*Bactericera cockerelli*). IRCHLB Proceedings. Department of Entomology, University of California, Riverside, U.S.A. p 194

Jagoueix, S., Bove, J.M. Garnier. M. 1994. PCR detection of the two ‘*Candidatus Liberibacter*’ species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes 10: 43–50.

Knowlton, G.F., Janes, M.J. 1931. Studies on the biology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Annals of the Entomological Society of America. 24, 283–291.

Liefting, L.W., Sutherland, P.W., Ward, L.I., Paice, K.L., Weir, B.S., Clover, G.R.G. 2009. A new “*Candidatus Liberibacter*” species associated with diseases of *solanaceous* crops. Plant Diseases. 93, 208–214.

Levy, J., Ravindran, A., Gross, D., Tamborindeguy, C., Pierson, E. 2011. Translocation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the Zebra Chip pathogen, in potato and tomato. Phytopathology. 101: 1285- 1291

Munyanza, J.E., Henne, D.C. 2012. Leafhopper and psyllid pests of potato. Biology of major pests. Texas, Estados Unidos. p 81-89.

Pletsch, D.J. 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc) its biology and control. Montana agricultural experiment station. Bulletin. 446.

Rowe, J.A., Knowlton, G.F. 1935. Studies upon the morphology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). J. Utah Academic of Sciences. 12, 233–237.

Rush, Ch., Goolsby, J., Adamczyk, J., Crosslin, J., Munyaneza, J., Troxclair, N., Anciso, J., Villaneuva, R., Porter, P., Bynum, E., Workneh, F., Henne, D., Nansen, C., Sloderbeck, P., Joshi, A., Buschmann, L., Bradshaw, J., Lee, B., Zechmann, B., Bester, G. 2010. Regional monitoring of potato psyllid populations and the associated pathogen, “*Candidatus Liberibacter psyllaourous*”. Proceeding of the 10th annual zebra chip reporting session. Dallas, Tx. p. 1-4

Wallis, R.L. 1955. Ecological studies on the potato psyllid as a pest of potatoes. USDA Technical Bulletin. 1107.

Yang, X.-B., Liu, T.-X. 2009. Life history and life tables of *Bactericera cockerelli* (Homoptera:Psyllidae) on eggplant and bell pepper. J. Environmental Entomology. 38, 1661–1667.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para Extracción de ADN de tejido vegetal para análisis de *Candidatus Liberibacter* en el laboratorio de Diagnostico Molecular en Zamorano.

1. Se enciende el baño María y se calienta hasta alcanzar una temperatura de 65°C.
2. De cada planta a analizar se cortan dos segmentos de tejido de tallo de aprox 0.2 a 0.5 cm de las áreas más cercanas a la raíz o donde se observe daño vascular, además se utilizan tres segmentos de vena media de las hojas donde se encontraban las ninfas y huevos del insecto vector (se debe usar la vena media completa de cada hoja). Recuerde que debe esterilizar con alcohol y flamear en un mechero la tijera o el bisturí que está utilizando para los cortes, entre cada una de las muestras.
3. Colocar los segmentos de tejido (tallo y vena media) en un mortero limpio previamente identificado con un número o nombre que le permita saber que muestra es la que está procesando.
4. Posteriormente adicionar 2.5 ml de buffer CTAB con mercapto etanol. Macerar con un pistilo hasta que el tejido este completamente desintegrado.
5. Una vez macerado el tejido, se toman 700 µl del macerado y se colocan en un tubo eppendorf previamente identificado con el mismo número o nomenclatura del pistilo de donde procede del tejido.
6. Colocar el tubo con el macerado en el baño María durante 1 hora a 65°C.
7. Una vez concluida la hora, sacar los tubos y dejar que se enfríen, luego adicionar 700 µl de cloroformo con alcohol isoamilico (frío) y mezclar en el vortex por 1 minuto. El procedimiento de adición del cloroformo se debe realizar en la cámara de extracción de gases.
8. Centrifugar los tubos durante 10 min a 14,000 rpm.

9. Posterior a la centrifugación se puede observar la separación de dos fases: la inferior o fase orgánica donde se encuentra toda la materia orgánica y la superior donde se encuentra el ADN en solución. De la fase superior se debe tomar 500µl y colocarlo en tubo eppendorf nuevo previamente identificado. Se debe tener cuidado de no tomar líquido de la fase inferior.
10. Posteriormente se debe adicionar 1/10 del volumen total recolectado de CTAB2 y el mismo volumen final de cloroformo con alcohol isoamílico, mezclar por 30 segundos en el vortex. La proporción de volumen es la siguiente: si usted recolecto 500 µl de la fase superior debe adicionar 50 µl de CTAB2 (1/10) + 550 µl de cloroformo-alcohol isoamilico. El CTAB2 debe estar caliente al momento de adicionarlo ya que es un reactivo muy viscoso y de no estar caliente hay dificultades en el pipeteo. Todo este procedimiento debe realizarse en la campana de extracción de gases.
11. Centrifugar nuevamente los tubos durante 10 minutos a 14,000rpm. Nuevamente se formaran dos fases, debe tener cuidado de no agitar los tubos al sacarlos de la centrífuga.
12. Tomar 400 µl de la fase superior en otro tubo previamente identificado. Y adicionar 266 µl (equivale a 2/3 del volumen recolectado) de isopropanol frío.
13. Agitar invirtiendo los tubos suavemente, se observará la formación de un hilo blanco (ADN). El tubo debe dejarse reposar durante una hora a 4 °C o toda la noche. En caso de no observarse el hilo inmediatamente esto no significa que la extracción no ha sido exitosa es solo que depende del tipo de tejido con el que se trabaja, al final de la incubación usted podrá ver el hilo.
14. Centrifugar los tubos 10 minutos a 14,000 rpm. Observará la formación de un botón en el fondo del tubo. Descartar el exceso de isopropanol con cuidado de no perder el botón.
15. Adicionar 350 µl de etanol al 70% y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
16. Centrifugar nuevamente los tubos durante 10 minutos a 14,000 rpm. Descartar el exceso de etanol con cuidado de no perder el botón. Al invertir el tubo para descartar el etanol debe de mantenerlo invertido y colocarlo sobre un papel toalla para que ayude a retirar los restos de etanol que hayan quedado.

17. Dejar secar el botón a temperatura ambiente hasta que todo el exceso de etanol se haya evaporado.

18. Resuspender el pellet o botón de ADN en 100 µl de agua destilada estéril ultra pura o en buffer TE, según sea su preferencia. Dejar que el botón se disuelva a temperatura ambiente por dos horas.

19. Luego identificar bien los tubos con etiquetas que indiquen el nombre del cultivo del cual se realizó la extracción la procedencia de las muestras y la fecha. Una vez identificados los tubos deben guardarse a 4°C hasta que el ADN sea utilizado.

Anexo 2. Protocolo para el análisis de PCR

- Se prepara la solución de bacterias en 50 ppm, también una solución madre.
- Se colocan 18 µl de solución madre en cada tubo eppendorf de 50 µl, el dnTps son nucleótidos separados (citocinina, guanina, ect)
- La muestra o solución de bacterias colocamos en muestras CB1 y CB2, el ADN de cada muestra se colocan según el número de tubos. Y preparamos una muestra testigo a la cual solo colocamos agua.
- De las muestras de ADN solo se colocan 2 µl de cada una de las muestras para alcanzar un volumen de 20 µl
- Una vez que están los tubitos con el volumen deseado, se colocan en la maquina, se calibra el numero de tubitos en la maquina, de forma que queden todos bien colocados y equilibrados. Luego se le da Iniciar y se deja trabajar por 2 horas.

Anexo 3. Cuadro de reactivos utilizados para PCR para determinar *Candidatus Liberibacter solanacearum*

	Solución madre	
	Concentración	1RX
Buffer	1X	2.5 µl
dnTpis	0.2mm	0.25 µl
MgCl2	1.5mm	1.5 µl
OA2	2.5mm	0.5 µl
OI2	2,5mm	0.5 µl
Tag	50µm	0.2 µl
H2O	---	5.02 µl
ADN	---	2.0 µl

Anexo 4. Proceso de termociclado para la desnaturalización del ADN, y la alineación de los primers en la cadena de ADN.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	40
65	30 seg	
72	1 min	
72	5 min	1
4	Mantenimiento	---



Anexo 5. Fotos de plantas de tomate con síntomas presentes con presencia de *C. liberibacter solanacearum*. **A).** Planta de tomate completa con las hojas dobladas hacia arriba. **B).** Hojas de la planta de tomate con las nervaduras de color morado.



Anexo 6. Fotos de plantas de chile con síntomas presentes con presencia de *C. liberibacter solanacearum*. Las hojas presentaron clorosis entre las venas.



Anexo 7. Foto de plantas testigos ubicadas en las jaulas con malla antiviral.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Secuencia tomate AAGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCACCTTCTCCGGATTATCACCGGCAGTCCCTATAAAGTACCCAAACATCTAG
      90      100     110     120     130     140     150     160
Secuencia tomate ATAAAACTAAACTTGATGGCAACTAGAGTAGGGGTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
      170     180     190     200     210     220     230     240
Secuencia tomate TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTAATAAGGTCTCCGAAAAGAAAAACCATCTCGATATCGTCCCTATATGTCAAGG
      250     260     270     280     290     300     310     320
Secuencia tomate GCTGTAAGGTTCTGCGCTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGGT
      330     340     350     360     370     380     390     400
Secuencia tomate TTTAATCTTGGACCGTACTCCCCAGCGGAGTGCCTAATCGTTAGCTGCCCACTGAATGGTAAACCACCCAACAGCT
      410     420     430     440     450     460     470     480
Secuencia tomate AGCACTCATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTACTTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGGCCCTCAGCGTCAGTA
      490     500     510     520     530     540     550     560
Secuencia tomate TCAGGCCAGTGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTCGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACACTCA
      570     580     590     600     610     620     630     640
Secuencia tomate CCTCTCCTGAACTCTAGATAACCGATTAAAGGCAGTTCCAAGGTTGAGCCTTGGGATTTACCCCTAACCTAATTACC
      650     660     670     680     690     700     710     720
Secuencia tomate CGCCTACCGGCCCTTACGCCAGTTATCCGAACACCGCTCGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTA
      730     740     750     760     770     780     790     800
Secuencia tomate GCCGGACTTCTTCTCCGGATACCGTCATTATCTTCTCCGGCGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCTTCACTCAG
      810     820     830     840     850     860     870     880
Secuencia tomate CCGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCACCTGCTGCCTCCCGTAGGAGCTGGGGCCGTGCTCA
      890     900     910     920     930     940     950     960
Secuencia tomate GTCCCAGTGGCTGATCGTCCCTCTCAGACCAGCTATAGATCGTAGCCTTGGTAGGCCCTTACCCCAACCACTAGCTAAT
      970     980     990     1000  1010  1020  1030  1040
Secuencia tomate CTAAACGGGGCTCATCTCTCCAATAAATCTTTCCCTTCTCAGGGCGTATACGGTATTAGCACAGTTTCCGTGCGTT
      1050
Secuencia tomate ATCCCGTAGAA
    
```

Anexo 8. Secuencias de *C. liberibacter solanacearum* en tomate en Zamorano, proveniente de la universidad de Texas en Tyler, proporcionado por el Blake Bextine Ph.D.