



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Trabajo de Graduación

Detección molecular de *Candidatus
liberibacter solanacearum* (Zebra chip) en papa
(*Solanum tuberosum* L,) en Nicaragua 2015-
2016

AUTOR

Br: Jenifer Bermania Ramírez Durán

ASESORES

MSc. Andrea Zamora Jarquín

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

MSc. Isaías Sánchez Gómez

Managua, Nicaragua

Agosto, 2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Trabajo de Graduación

Detección molecular de *Candidatus liberibacter solanacearum* (Zebra chip) en papa (*Solanum tuberosum* L.) en Nicaragua 2015-2016

AUTOR

Br: Jenifer Bermania Ramírez Durán

ASESORES

MSc. Andrea Zamora Jarquín

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

MSc. Isaías Sánchez Gómez

Managua, Nicaragua

Agosto, 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la Decanatura en la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar el título profesional de:

INGENIERO EN SISTEMA DE PROTECCIÓN AGRÍCOLA Y FORESTAL

Miembro del tribunal Examinador:

Dr. Guillermo Reyes Castro
Presidente

Dr. Freddy Miranda Ortiz
Secretario

MSc. Rosario Chavarría
Vocal

Managua, 22 de agosto del 2017

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. Ubicación y fecha del estudio	5
3.2. Recolección de muestras	5
3.3. Extracción de ADN	6
3.4. Determinación de calidad de ADN	7
3.5. Identificación molecular de <i>Candidatus liberibacter solanacearum</i>	7
3.6. Variables evaluadas.....	8
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4.1. Calidad de ADN amplificado con el cebador β -tubulina	9
4.2. Presencia de <i>Candidatus liberibacter solanacearum</i> con los cebadores Lso TX 16/23 y Lso ADK F/R	10
4.3. Distribución geográfica de <i>Candidatus liberibacter solanacearum</i> (CLs)	13
V. CONCLUSIONES	15
VI. RECOMENDACIONES	16
VII. LITERATURA CITADA.....	17
VIII. ANEXOS.....	22

DEDICATORIA

A **Jehová Dios** por concederme sabiduría, fuerza en cada circunstancia que se presentan en el vivir. *“Gracias a Dios por su don inefable” (2 Corintios 9:15).*

A mis padres: **Roger Antonio Ramírez García y Rosa María Durán Martínez**; les dedico este trabajo con mucho amor, por su apoyo y confianza incondicional durante este camino recorrido, por su lucha para forjarme y ser mejor cada día y siempre estar presente en las dificultades de la vida y guiándome hasta este momento de mi vida.

A mi hermano: **Jeffren Ramírez Durán** por tu apoyo moral y el cariño mutuo durante el transcurso de la vida.

A mis abuelos: **Patricia Martínez y Serapio Duran**. Tú, abuelo me has enseñado tantas cosas sobre todo la humildad, que hace mejor a las personas que la poseen y siempre a luchar cada día para cumplir nuestros sueños y metas, eres una persona extraordinaria.

A mis tías: **Josefa Durán, Mercedes Durán**, por su apoyo y cariño durante mi vida, a ti, tía que eres como mi segunda madre **Alba Luz Durán**. Por tus consejos, por apoyarme incondicionalmente durante todo este camino recorrido.

A **Douglas Sebastián Ocón Mendoza**. Por su apoyo y afecto incondicional, por estar en cada momento de flaqueza que se me presentaron en este trabajo y a lo largo del tiempo compartido.

Br. Jenifer Bermania Ramírez Durán

AGRADECIMIENTOS

A **Jehová Dios** por proveerme la fuerza, la salud y los conocimientos para culminar este trabajo. Y a mis padres por estar siempre en cada etapa de mi vida.

A mis asesores **MSc. Andrea Zamora Jarquín, Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz y MSc. Isaías Sánchez Gómez** que me brindaron su apoyo, confianza, tiempo, amistad y compartir sus conocimientos en el transcurso de trabajo.

Al **Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIA-INTA)**, por brindarme el apoyo en los materiales y reactivos utilizados durante este trabajo.

A la **Universidad Nacional Agraria** como alma mater por brindarme la oportunidad de formarme como profesional.

A todas aquellas personas que directa e indirectamente se vieron involucrado en la realización de este trabajo.

Br. Jenifer Bermania Ramírez Durán

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Localidades y ciclos de siembra en los departamentos donde se colectaron tejidos con síntomas de <i>Ca l solanacearum</i> .	6
2. Número de muestras positivas con el cebador Lso Tx 16/23 en los diferentes ciclos de siembra del cultivo de papa en los departamentos de Estelí y Jinotega.	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tubérculos y follaje con síntomas de la enfermedad zebra chip recolectadas en los departamentos de Estelí y Jinotega.	6
2. Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa con el par de cebador β -tubulin el cual sirve como control de calidad de la extracción de ADN, las muestras fueron obtenidas de plantas con síntomas de la enfermedad. La letra M indica el marcador molecular de 100 pb, los números del 1 al 27 corresponden a las muestras colectadas.	9
3. Resultados del cebador Lso Tx 16/23 el cual amplifica en la región 383 pb. El control positivo (C+) extraído de las muestras colectadas con síntomas de la enfermedad y el control negativo (C-) es agua libre de nucleasas. Los números del 1 al 9 corresponden a las muestras colectadas con síntomas característicos de la enfermedad y que dieron positivo para la amplificación de β -tubulin.	11
4. Productos PCR amplificados a 770 pb con los cebadores Lso ADK. (C+) indica control positivo, obtenido de tejido vegetal colectado (C-) control negativo es agua libre de nucleasas. Los números del 1 al 13 corresponden a las muestras colectadas con síntomas característicos de la enfermedad y que dieron positivo para la amplificación de β -tubulin.	12
5. Localidades de los departamentos Estelí y Jinotega donde se colectaron las muestras con síntomas característicos de la enfermedad, y mediante la amplificación de la PCR resultaron positivas para <i>Candidatus liberibacter solanacearum</i> (Puntos negros en el mapa).	13

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Datos obtenidos en las colectas realizadas en los departamentos Estelí y Jinotega, número de muestras, coordenadas geográficas, época de siembra y fecha según la colecta.	22
2. Resultados de la amplificación de fragmentos, mediante PCR. Donde se procesaron las muestras colectadas con síntomas característicos de la enfermedad en los departamentos de Jinotega y Estelí en los tres ciclos de siembra del cultivo de papa.	23
3. Guía de entrevista a productores.	24

RESUMEN

En el cultivo de papa se han registrado diversos problemas fitosanitarios importantes por la presencia de virus, bacterias y hongos. En los últimos años, productores de los departamentos de Estelí y Jinotega han reportado plantas con síntomas de la enfermedad Zebra chip ocasionada por la bacteria fastidiosa *Candidatus liberibacter solanacearum*. La enfermedad Zebra chip ha causado grandes pérdidas económicas a los productores de papa del país donde la producción se desarrolla todo el año. Ante esta problemática el Instituto Nicaragüense de tecnología Agropecuaria (INTA) junto con la Universidad Nacional Agraria (UNA) realizó un estudio comprendido entre los meses de Agosto 2015 a Julio 2016 con el objetivo de generar información relacionada a la presencia y distribución de *Ca. L. solanacearum* en los departamentos mencionados. Se colectaron 162 muestras de tejidos con síntomas de la enfermedad en cuatro localidades de Jinotega y tres localidades de Estelí durante los tres ciclos de siembra del cultivo. Las muestras de tejido fueron procesadas y analizadas en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIA-INTA) para detectar el agente causal *Ca.l. solanacearum* utilizando los cebadores moleculares ligados a la bacteria Lso Tx 16/23 y al gen de limpieza Lso adk. 50 muestras resultaron positivas con el cebador Lso Tx 16/23 indicando alta especificidad para la detección de este patógeno, mientras que con los cebadores Lso ADK 42 muestras fueron positivas presentando polimorfismos. Se detectó la bacteria en las zonas de El Tayacán y El Zacatón en el departamento de Estelí y en el departamento de Jinotega El Mojón, La Palmera y San Gregorio. El mayor porcentaje de afectación por *Ca. L. solanacearum* se presentó en Jinotega con un 52.17% en comparación con Estelí que presento un 22.41% de las muestras colectadas.

Palabras claves: *Candidatus liberibacter solanacarum*, Zebra chip, Cebador, Lso TX 16/23, Lso ADK.

ABSTRACT

Several important phytosanitary problems have been recorded in potato cultivation due to the presence of viruses, bacteria and fungi. In recent years, producers in the departments of Estelí and Jinotega have reported plants with symptoms of the Zebra disease chip caused by the fastidious bacterium *Candidatus liberibacter solanacearum*. The Zebra chip disease has caused large economic losses to potato producers in the country where the production is developed all year. Faced with this problem, the Nicaraguan Institute of Agricultural Technology (INTA), together with the National Agrarian University (UNA), conducted a study between August 2015 and July 2016 with the objective of generating information related to the presence and distribution of *Ca. Solanacearum* in the above mentioned departments. A total of 162 tissue samples with disease symptoms were collected from four locations in Jinotega and three locations in Estelí during the three cropping cycles. Tissue samples were processed and analyzed at the National Center for Agricultural Research and Biotechnology (CNIA-INTA) to detect causative agent *Ca.l. Solanacearum* using the molecular primers bound to the bacterium Lso Tx 16/23 and the cleansing gene Lso adk. 50 samples were positive with the Lso Tx 16/23 primer indicating high specificity for the detection of this pathogen, whereas with the Lso ADK primers 42 samples were positive presenting polymorphisms. The bacterium was detected in the areas of El Tayacán and El Zacatón in the department of Estelí and in the department of Jinotega El Mojón, La Palmera and San Gregorio. The highest percentage of affection for *Ca. L. solanacearum* was presented in Jinotega with 52.17% compared to Estelí that presented 22.41% of the samples collected.

Key words: *Candidatus liberibacter solanacarum*, Zebra chip, Primer, Lso TX 16/23, Lso ADK.

I. INTRODUCCIÓN

La papa es el cuarto cultivo sembrado en más de cien países siendo el alimento básico de los países desarrollados (Europa y Estados Unidos), quienes consumen 75 kg per cápita anuales. La importancia de la papa radica en que sus tubérculos son parte de la dieta de millones de personas a nivel mundial ya que contiene 80% de agua y la materia seca está constituida por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A y C que proporcionan una dieta balanceada (INTA, 2004). La papa se cultiva únicamente en elevaciones que oscilan entre 700 a 1,300 msnm con temperaturas promedio de 18°C lo que la hace apta para su buen desarrollo (FUNICA, 2007).

En Nicaragua, la papa representa un cultivo de mucha importancia después de los granos básicos y se cultiva en climas templados de Estelí, Jinotega y Matagalpa. El consumo per cápita en nuestro país es de 8 kg anuales. Se siembran entre 800-1200 ha con una producción que satisface el 35-40% de la demanda nacional (INTA, 2004). El país importa de 30–40% de papa fresca y 100% de tubérculo-semilla para cubrir la demanda del mercado (FUNICA, 2007). Entre los factores que limitan la producción de papa en Nicaragua se pueden citar la escasez de semilla, el alto costo, la baja calidad de tubérculos por la proliferación de enfermedades y el costo de la aplicación obligatoria de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades (INTA, 2004).

Desde el comienzo del año 2011 en las plantaciones de papa de Nicaragua se observó sintomatología de la enfermedad zebra chip causada por la bacteria fastidiosa *Ca. l solanacearum* y con ella la presencia prolifera del insecto *Bactericera cockerelli* este insecto al alimentarse de la planta le transmite la bacteria causante de la enfermedad (Toledo, 2011). Para este entonces la enfermedad había sido reportada en otros países tales México (Leyva-Lopez *et al.*, 2002, Martínez-Soriano *et al.*, 1999), Estados Unidos (Banttari *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2009), Canadá (Khadhair *et al.*, 1997; Khadhair & McAllister, 2003), Bolivia (Jones *et al.*, 2005), Rusia (Girsova *et al.*, 2008), Australia (Harding & Teakle, 1985), Korea (Jung *et al.*, 2003), y Nueva Zelanda (Liefiting *et al.*, 2009). En Nicaragua no hay reportes cuantificables de las pérdidas a causa de la enfermedad Zebra chip que está asociada a la papa, pero las plantaciones han sido gravemente infectadas al punto de pérdida total. Según Gutiérrez

et al.; (2013) en México la producción de papa ha sufrido pérdidas económicas de 70% a 90% causado por esta enfermedad.

Ca. l. solanacearum es una bacteria que se aloja en los tubos cribosos del floema y afecta a distintos cultivos pertenecientes a la familia de las rutáceas, solanáceas y apiáceas. A través de estudios filogenéticos de la región 16S rRNA se ha encontrado que *Ca. l. solanacearum* pertenece a las α -proteobacterias y está muy relacionada a 4 especies de *Candidatus liberibacter*: *Ca. l. asiaticus*, *Ca. l. africanus*, *Ca. l. americanus* y *Ca. l. europaeus*. Es una bacteria Gram negativa y logra su desarrollo óptimo entre 27-32°C (Camacho y Tapia *et al.*, 2016). Esta enfermedad está caracterizada por los síntomas de amarillamiento, clorosis con los bordes de las hojas moradas, achaparramiento de la planta, abultamiento del tallos en lugares de inserción, formación de tubérculos aéreos (Hernández, 2012), también numerosos tubérculos pequeños mal formados y de mala calidad, retraso del crecimiento de la planta, rotación ascendentes de hojas, entrenudos acortados y la proliferación de brotes axilares y en los tubérculos se observa decoloración y un ligero rayado oscuro, y cuando se fríen las rayas son más dominantes afectando también el sabor lo que hace que lo hace comercialmente inaceptable (Munyanza, 2012).

En Nicaragua es de vital interés para los productores y gobierno conocer si los síntomas son causados por zebra chip por lo que la detección de este patógeno utilizando herramientas moleculares es de suma importancia para un diagnóstico rápido y específico. La identificación de patógenos se lleva a cabo con el fin de proporcionar información sobre las principales enfermedades que están afectando el cultivo de papa, así como su agente causal. Una adecuada identificación conlleva a un plan de futuras acciones en términos de manejo integrado de la enfermedad, reporte probable de nuevas razas que solo coexisten en nuestro país, búsqueda de genes de resistencia para dicha enfermedad y por último la erradicación de la misma a través de manejo integrado de plaga.

Las técnicas moleculares para la detección de hongos y virus se han venido implementando recientemente en Nicaragua en frijol, tomate, cacao y papa. Sin embargo, la bacteria fastidiosa como patógena no ha sido de mucha importancia en cultivos agrícolas, quedando claro que es

el primer estudio relacionado en la detección de la enfermedad zebra chip en las zonas donde la papa es cultivada utilizando herramientas moleculares.

El objetivo de este estudio es detectar información de la presencia y distribución de *Ca. L. solanacearum* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para la detección de la bacteria utilizando cebadores específicos que amplifican las regiones intergénicas conservadas entre 16S y 23S rADN y que conserve el gene bacterial, adenylate kinase (adk) para *Ca. L. solanacearum*.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Detectar la presencia y distribución de *Candidatus liberibacter solanacearum* agente causal de la enfermedad Zebra chip en el cultivo de papa, en los departamentos de Jinotega y Estelí utilizando técnicas moleculares.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Ca l solanacearum* en tejidos vegetales de papa mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Determinar la distribución geográfica de *Ca l solanacearum* en localidades de Jinotega y Estelí.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación y fecha del estudio

La investigación se realizó en el (CNIA-INTA), ubicado en el departamento de Managua, km 14.1 carretera norte, 3 km hacia el sur. Localizado entre la Latitud: 12°08'36" N y Longitud: 86°09'49" W, con una elevación de 56 msnm en el departamento de Managua. Este trabajo se realizó durante los meses de agosto 2015 a julio 2016.

3.2. Recolección de muestras

Se colectaron 162 muestras de tejido con síntomas característicos de la enfermedad en cuatro localidades del departamento de Jinotega y tres en el departamento de Estelí en los periodos de primera, postrera y apante de 2015 (Cuadro 1). Las variedades de papa presentes en las zonas de muestreo fueron: Granola, Desiree, Calwhite, Silvana, Picaso, Provento, Toluca, Punta roja, Ronaldo, Monte carlo. Cada uno de los sitios de donde se recolectaron las muestras fue georeferenciado mediante un dispositivo de Sistema de posicionamiento global (GPS). Se recolectaron muestras que presentaban los síntomas característicos de la enfermedad, los cuales consistían en: amarillamiento, clorosis con los bordes de las hojas moradas, achaparramiento de la planta, abultamiento de los tallos en lugares de inserción, formación de tubérculos aéreos, decoloración en los tubérculos con forma de rayado ligero (Figura 2). Las muestras se colocaron en bolsas de papel y bolsas plásticas con cierre hermético dentro de una hielera para ser trasladadas al laboratorio y fueron almacenadas a -20°C para después proceder a extraer ADN.

Cuadro1. Localidades y ciclos de siembra en los departamentos donde se colectaron tejidos de papa con síntomas de *Ca l solanacearum*.

Departamento	Localidad	Ciclos de siembra			Coordenadas geográficas	
		Primera	Postrera	Apante	Latitud	Longitud
Estelí	El Zacatón	X	X	X	58°20'14"	14°63'38"
	El Tayacán	X	X	-	58°11'77"	14°65'34"
	Cijul	-	-	X	-	-
Jinotega	La Palmera	X	-	-	60°39'50"	14°64'73"
	El Mojón	X	-	x	604306	14°60'93"
	San Gregorio	-	X	-	60°30'15"	14°62'35"
	Los Horcones	-	-	x	60°18'37"	14°61'81"

(X): Colecta de muestra según ciclos de siembra.



Figura 1. Tubérculos y follaje con síntomas de la enfermedad zebra chip – punta morada recolectado en los departamentos de Estelí y Jinotega.

3.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Dallaporta *et al.*, (1983) con algunas modificaciones. Por cada genotipo se tomó 5 mg de tejido vegetal y se colocó en un tubo eppendorf (1.5 ml). Se agregó buffer de extracción Tris- HCL 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM a cada muestra y luego se maceró el tejido usando pistilos plásticos estériles hasta homogenizar las muestras. Seguidamente, se agregó sulfato dodecil sódico (SDS) al 10% y se colocaron las muestras en incubadora tipo baño María a 65°C por 10 minutos agitándola por lo menos tres veces. Se adicionó acetato de potasio (3M) a cada muestra

para incubarse a menos 20°C por 20 minutos, posteriormente las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm por 15 minutos a 5°C. Se extrajo el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se procedió a agregar y mezclar 0.6 volúmenes de 2-propanol helado, se conservaron las muestras a menos 20°C por 20 minutos y las muestras se volvieron a centrifugar a 15,000 rpm por 15 minutos a 5°C. Se procedió a extraer el 2-propanol volteando el tubo rápidamente, luego se lavó dos veces el pellet en etanol al 70% a 15,000 rpm a 5°C por 5 minutos, se secaron los pellets de ADN a temperatura ambiente por 50 minutos. Los pellets de ADN se re disolvieron en buffer TE 1 X (conteniendo Tris- HCL (100 mM) pH 8.0 y EDTA (1 mM) y se conservaron las muestras a menos 20°C para su posterior utilización.

3.4.Determinación de calidad de ADN

La calidad de ADN se determinó mediante la amplificación del gen β -tubulin con el par de cebadores: delantero Btub 1F (5'- TGATTTCCAAGGTAAGGGAGGA-3') y la del cebador reverso Btub 1R (5'- CATGTTGCTCTCGGCTTCAG-3'). La mezcla consistió 10 pmol del cebador delantero y reverso, Go taq colorless master mix 2X, agua libre de nucleasas y ADN, para un volumen final de 20 μ l. El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 3 minutos a 95°C 40 ciclos a 95°C por 40segundos, 58 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Se visualizaron los resultados colocando las muestras con 6X loading Dye en una gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidium y se corrió durante una hora a 90 voltios, colocándose en un transluminador para verificar los resultados y registrar mediante fotografía.

3.5. Identificación molecular de *Candidatus liberibacter solanacearum*

La amplificación PCR realizada para Lso adk fue a un volumen final de 20 μ l utilizando 5 μ M del cebador delantero y reverso (Lso adk F 5'-GCGCCACACTAACATCTCCTTCC-3'y Lso adk R 5'-CGCAGCAGTATGAGGGCC-3'), 1X de buffer, 200 μ M de cada dNTPs (10 Mm) y 0.02 U/ μ l de Taq polimerasa, agua libre de nucleasas y ADN. El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 30 segundos a 98°C, seguido de 40 ciclos a 98°C por 10 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

La amplificación PCR que se realizó para Lso TX 16/23 fue a un volumen final de 20 μ l utilizando 10 pmol del cebador delantero y reverso (Lso TX 16/23 F (5'-AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG-3' y R Lso TX 16/23 5'-GGTACCTCCCATACGC-3'), Go taq colorless master mix 2X, agua libre de nucleasas y ADN. El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 30 segundos a 98°C, seguido de 40 ciclos a 98°C por 10 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72 °C por 7 minutos (Ravindran *et al.*, 2011)

En ambos productos PCR, se visualizaron los resultados colocando 20 μ l de las muestras con 4 μ l de 6X loading Dye en un gel de agarosa al 1.2% que fue teñida con bromuro de etidium antes de solidificar, el gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TBE 0.5X se corrió durante 90 min a 90 voltios, y se colocó en un transluminador para verificar la presencia o ausencia de la bacteria en las muestras y se registró mediante fotografía.

3.6. Variables evaluadas

- Números de muestras positivas (Laboratorio)
- Distribución geográfica de *Candidatus liberibacter solanacearum*.(campo)

Se consideraron muestras positivas a las que tuvieron una amplificación de fragmentos de acuerdo a los cebadores utilizados Lso TX 16/23 que amplifica a 383 pb y Lso adk que amplifica a 770 pb.

Para la determinación de la distribución geográfica, se geo referencio mediante un dispositivo de sistema de posicionamiento global (GPS). Tomando los puntos en las plantas con síntomas característicos de la enfermedad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Calidad de ADN amplificado con el cebador β -tubulina

A partir de 162 muestras colectadas (primera, postrera y apante) del cultivo de la papa en los departamentos de Estelí y Jinotega se obtuvo 127 muestras positivas al realizar la PCR con el par de cebadores β -Tubulin. Se identificó un fragmento de 881 pb de el gen de la β -tubulina en solanáceas, el resultado positivo indicó buena calidad del ADN extraído (Figura 2). El par de cebadores tiene capacidad para amplificar en la misma región en huéspedes de la familia de las solanáceas y se utiliza como control positivo para indicar la calidad del ADN extraído. Los resultados de este estudio fueron similares a los obtenidos por Ravindran *et al.*, (2011) Ravindran *et al.*, (2012), quienes utilizaron este cebador para la comprobación de calidad de ADN extraído en las muestras colectadas.

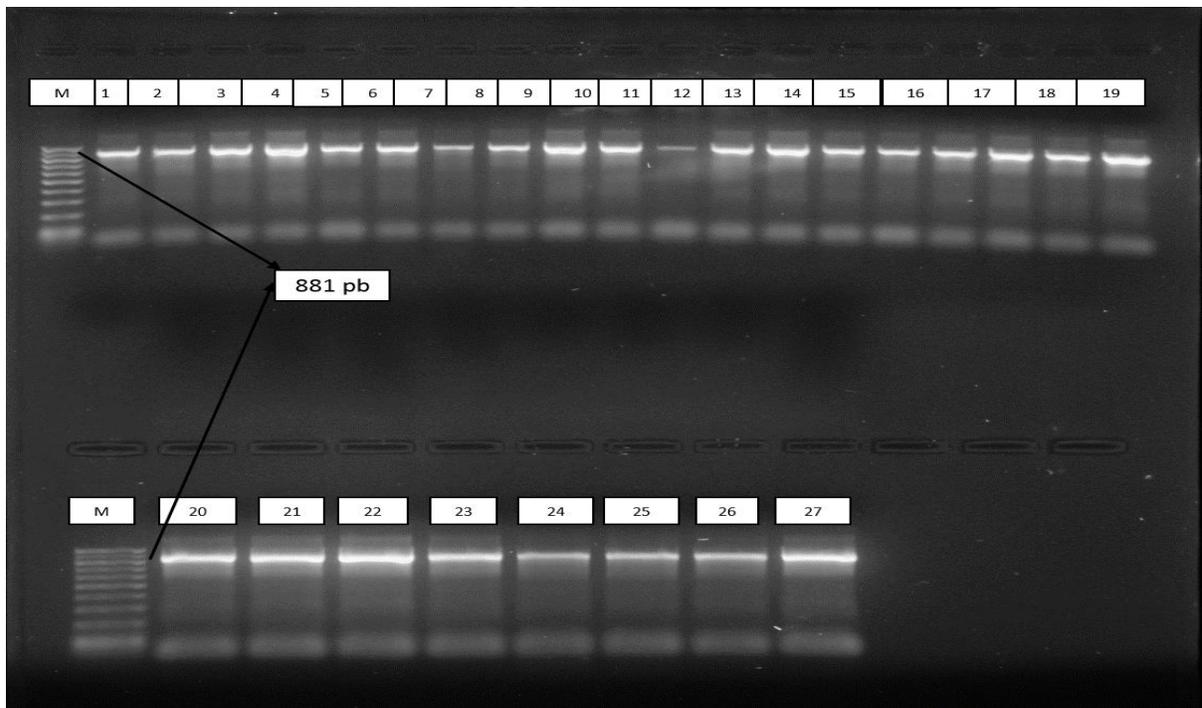


Figura 2. Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa con el par de cebador β -tubulin el cual sirve como control de calidad de la extracción de ADN, las muestras fueron obtenidas de plantas con síntomas de la enfermedad. La letra M indica el marcador molecular de 100 pb, los números del 1 al 27 corresponden a las muestras colectadas.

4.2. Presencia de *Candidatus liberibacter solanacearum* con los cebadores Lso TX 16/23 y Lso ADK F/R

Mediante la PCR se detectaron 50 muestras infectadas con *Ca l solanacearum* con el cebador Lso Tx 16/23, representando el 30.88% de muestras colectadas en los dos departamentos y en los tres ciclos del cultivo. Los mayores porcentaje de muestras positivas se observaron en postrera (9.25%) en el departamento de Estelí y 8.02% en primera en el departamento de Jinotega (cuadro 2). El cultivo de papa también se ve afectado por diversos virus los cuales poseen sintomatología parecida a las ocasionadas por otro tipo de patógeno, como es el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) el cual tiene síntomas similares a los ocasionados por zebra chip como es: clorosis, enrollamiento de las hojas y enrojecimiento de los márgenes de las hojas. (González *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Número de muestras positivas con el cebador Lso Tx 16/23 en los diferentes ciclos de siembra del cultivo de papa en los departamentos de Estelí y Jinotega.

Ciclo del cultivo	Departamento	Número de fincas	Número de muestras con síntomas	Número de muestras positivas. Cebador Lso Tx 16/23	Porcentaje de 162 muestras
Postrera	Estelí	6	47	15	9.25
	Jinotega	2	9	6	3.70
Apante	Estelí	3	32	11	6.79
	Jinotega	2	7	5	3.12
Primera	Estelí	7	37	0	0
	Jinotega	2	30	13	8.02
Total		22	162	50	30.88

El cebador Lso TX 16/23 amplificó un fragmento de 383 pb el correspondiente para detectar *Ca. l. solanacearum* (Figura 3). Los resultados fueron similares a los obtenidos por Ravindran *et al.*, (2011), obteniendo amplificados de 383 pb de la región 16S y 23S rDNA para *Ca. L. solanacearum* en el cultivo de la papa. Los cebadores Lso Tx 16/23 fueron diseñados a partir de la región intergénica 16S y 23S de las especies de *Liberibacter*, debido a que esta región ha demostrado ser la más variable que el gen 16S rDNA por tanto es de utilidad para la detección

de *Ca. L. solanacearum*. Por otro lado, se han realizado otros estudios de detección de *Ca. L. solanacearum* en los cultivos de apio y perejil utilizando el marcador Lso TX 16/23 obteniéndose como resultado una alta sensibilidad y especificidad en detección superando los marcadores OA2 y OI2c, los cuales se han utilizados comúnmente para la detección y diagnóstico de *Ca. L. solanacearum* (Teresani *et al.*, 2014; Monger y Jeffries, 2016).

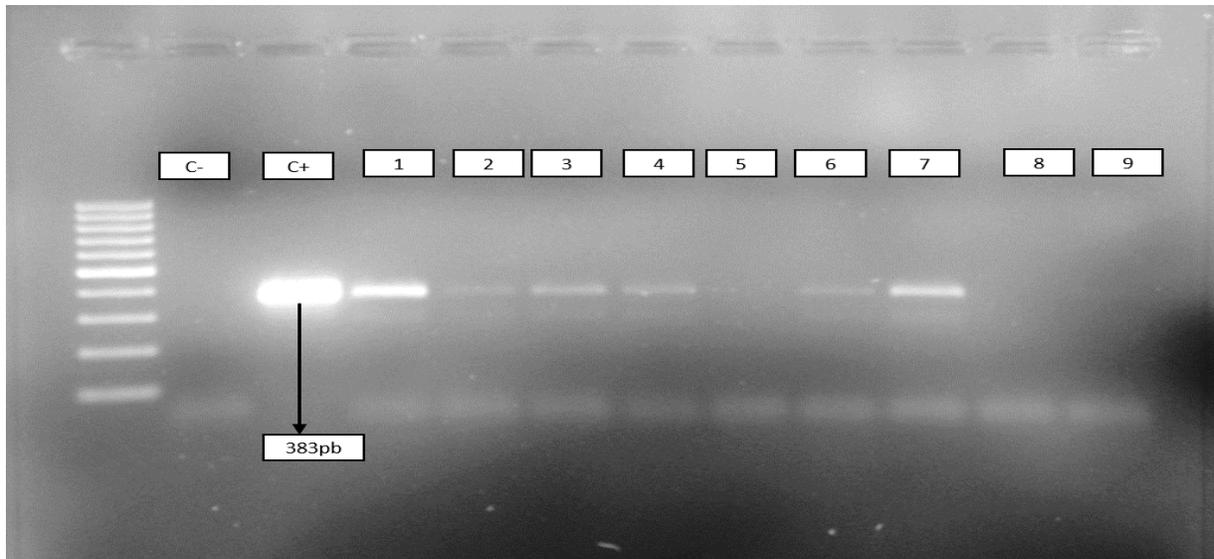


Figura. 3 Resultados del cebador Lso Tx 16/23 el cual amplifica en la región 383 pb. El control positivo (C+) extraído de las muestras colectadas con síntomas de la enfermedad y el control *negativo* (C-) es agua libre de nucleasas. Los números del 1 al 9 corresponden a las muestras colectadas con síntomas característicos de la enfermedad y que dieron positivo para la amplificación de β -tubulin.

Un segundo marcador fue utilizado para la detección de '*Ca. L. solanacearum*. El marcador Lso adk proviene del gen de limpieza adk (housekeeping gene adk) de secuencias alineadas de *Ca. L. solanacearum* y *asiaticus* (Ravindran *et al.*, 2011). Un total de 72 muestras de tejido infectado con zebra chip fue utilizado para la detección con el marcador Lso adk obteniendo como resultado 42 muestras positivas, observándose fragmentos de 383, 500 y 770 pb. (Figura 4). Los resultados se compararon con los obtenidos por Ravindran *et al.*, (2011) encontrando similitud en 9 muestras con una sola banda de 770 pb. Sin embargo, la presencia de fragmentos polimórficos con el marcador Lso adk no fue reportado en el estudio de Ravindra *et al.*, 2011 y 2012. De acuerdo a Glynn *et al.*, 2012; los genes de limpieza son generalmente utilizados como tipo de secuencia multilocus (MLST) debido a que experimentan variaciones relativas en la

secuencia entre los loci lo cual refleja adaptación de los patógenos y son informativos para identificar grupos entre una población dada. Recientemente, el análisis de MLST ha sido utilizado para entender la estructura genética, variabilidad y relación evolutiva de bacterias asociadas a enfermedades de plantas (Lin y Gudmestad, 2012). El polimorfismo encontrado puede estar relacionado a la diversidad genética de *Ca. l solanacearum* entre las muestras colectadas en Estelí y Jinotega agrupándolos en 5 diferentes haplotipos. Estos resultados concuerdan con lo estudiado por Glynn *et al.*, 2012; Lin u Gudmestad, 2012 los cuales indican que la utilización de genes de limpieza como MLST pueden ser usados para diferenciación de razas. Sin embargo, se necesita utilizar al menos 10 marcadores de genes de limpieza para poder establecer una variación genética de *Ca. l solanacearum* asociada a zebra chip.

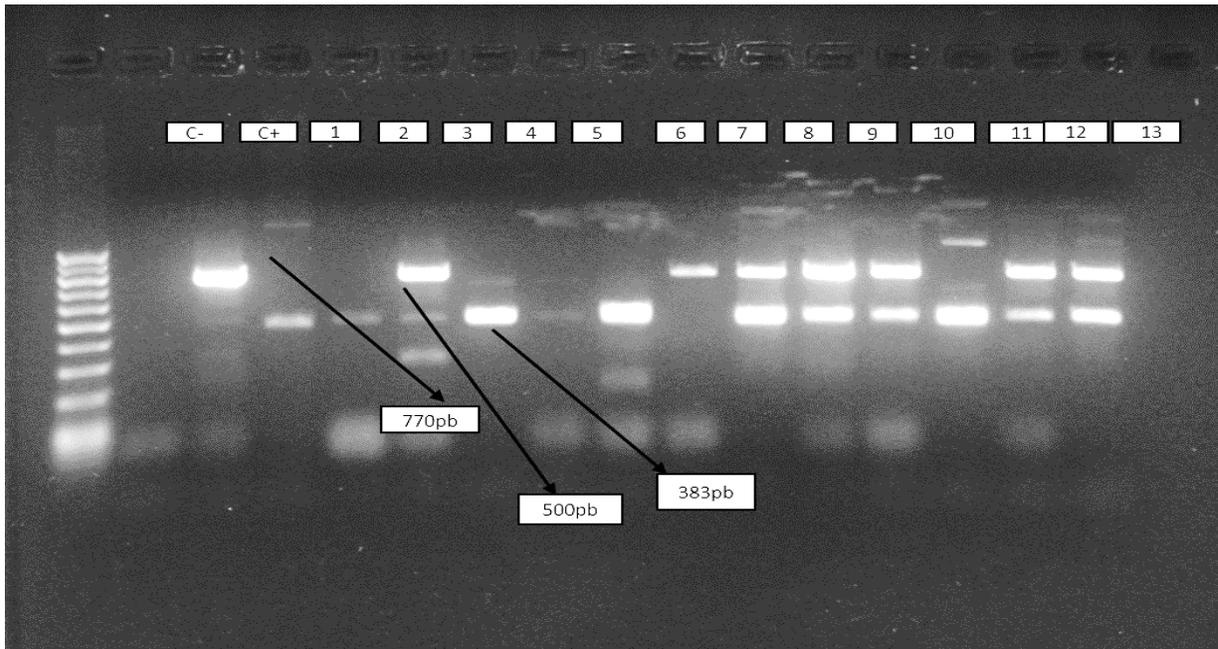


Figura.4 Productos PCR amplificados a 770 pb con los cebadores Lso adk. (C+) indica control positivo, obtenido de tejido vegetal colectado (C-) control negativo es agua libre de nucleasas. Los números del 1 al 13 corresponden a las muestras colectadas con síntomas característicos de la enfermedad y que dieron positivo para la amplificación de β -tubulin.

4.3. Distribución geográfica de *Candidatus liberibacter solanacearum* (CLs)

La distribución geográfica se basa fundamentalmente en los informes recolectados de la presencia de *Bactericera cockerelli* quien transmite la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum* (MAG Costa Rica, 2010). Mediante los resultados obtenidos de la PCR, que se realizó en muestras colectadas con síntomas de la enfermedad en los departamentos de Jinotega y Estelí se detectó la presencia de *Candidatus liberibacter solanacearum* en El Tayacán y El Zacatón en el departamento de Estelí, mientras en que el departamento de Jinotega en las zonas del Mojón, La Palmera y San Gregorio.

Los síntomas de la enfermedad se registraron por primera vez en los campos comerciales de Texas, México en 1994 y ha sido reportada en California, Colorado, Kansas, Nebraska, Nevada y Nuevo México suroeste de Estados Unidos en el 2000, también se registró la presencia en Guatemala, Honduras y Nicaragua en el 2010; en el 2008 se encontró que la bacteria estaba afectado los cultivos en nueva Zelanda, Finlandia, Noruega y Suecia (Secor *et al* 2009; Munyaneza *et al.*, 2012).



Figura.5. Localidades de los departamentos Estelí y Jinotega donde se colectaron las muestras con síntomas característicos de la enfermedad, y mediante la amplificación de la PCR resultaron positivas para *Candidatus liberibacter solanacearum* (Puntos negros en el mapa).

La producción de papa se desarrolla en un clima relativamente fresco debido a que la papa requiere temperaturas de 15 a 20 °C para su tuberización (formación de tubérculos) y

crecimiento, aunque se adapta bien a temperaturas entre 18 a 25°C. La temperatura más favorable del suelo en el período de formación de tubérculos es de 16 -19 °C, que acompañada con días de fotoperíodos cortos representan las condiciones óptimas para el cultivo. En Nicaragua estas condiciones se presentan en las épocas de noviembre, diciembre y enero en las zonas de Jinotega, Matagalpa y Estelí (INTA, 2004); por tal razón en Nicaragua se cultiva papa únicamente en la zona norte del país.

La presencia de *Candidatus liberibacter solanacearum* en los campos de papa esta correlacionados con la presencia del insecto vector *Bactericera cockerelli* el cual tiene un rango óptimo de temperatura 21-27°C, mientras que las temperatura superiores a 32°C perjudica la ovoposición y eclosión de *B. cockerelli* (OIRSA, 2015). La altura promedio en el departamento de Estelí es de 900-1500 msnm, mientras que en Jinotega altura promedio oscila entre 700-1700 msnm, según Rubio *et al.*, (2011) la población de *B. cockerelli* disminuye con la altura, por tanto a alturas mayores de 3200 msnm no se presentan daños significativos económicamente.

V. CONCLUSIONES

- Se verificó la presencia de '*Ca. l. solanacearum*' en los campos de papa de los departamentos de Estelí y Jinotega, el marcador Lso TX 16/23 F/R es altamente específico para detectar '*Ca. l. solanacearum*' el uso del marcador Lso adk para la detección de *Ca. L. solanacearum* sugiere diversidad genética en las muestras estudiadas y puede ser utilizadas para la discriminación entre haplotipos de *Ca. l.solanacearum*.
- Con los resultados de la PCR se identificó la presencia de '*Ca. l. solanacearum*' en las zonas de El Tayacán y El Zacatón en el departamento de Estelí y en el departamento de Jinotega en las zonas del Mojón, La Palmera y San Gregorio.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar los set de cebadores Lso TX 16/23 para la detección de '*Ca. l. solanacearum*' de muestras provenientes del campo y ser utilizados en pruebas rutinarias de laboratorio.
- Realizar estudios de diversidad genética en aislados de *Ca l. solanacearum* en el país utilizando marcados MLST, y SSR y de esta manera poder diferenciar los diferentes haplotipos que están establecidos. Con esta información se puede construir a futuro estrategias de manejo de la enfermedad y mejoramiento genético.
- Realizar estudios adicionales de *Ca l. solanacearum* en cultivos que no están relacionados con las solanáceas como perejil, zanahoria, apio y otras hortalizas de altura debido a que se ha reportado la presencia de este patógeno en otros países infectando estos cultivos.

VII. LITERATURA CITADA

- Banttari, E. E., Orr, P. H., and Preston, D. A. 1990. Purple top wilt of potatoes caused by the aster yellows virus. *Trans. ASAE* 33:221-226.
- Camacho Tapia, M., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., Rebollar Alviter, A., Aranda Ocampo, S., & Suárez Espinosa, J. 2016. Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*. *Revista Chapingo serie horticultura*. 12. (1). 5-16p.
- Dallaporta SJ., Wood J., Hicks JB, 1983 A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Reporter* 1: 19-21
- Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA). 2007. Análisis de la cadena sub-sectorial de la papa para consumo. *Boletín FUNICA*. FUNICA, Managua, Nicaragua 48 p.
- Girsova, N., Bottner, K. D., Mozhaeva, K. A., Kastalyeva, T. B., Owens, R. A., and Lee, .- M. 2008. Molecular detection and identification of group 16SrI and 16SrXII phytoplasmas associated with diseased potatoes in Russia. *Plant Dis.* 92:654.
- González, CA.; Villavicencio, GEE.; Torres, TMA.; Zamora, VVM.; Almeyda, LIH. 2014. Efecto de antioxidantes y señalizadores en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum* bajo condiciones de invernadero. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 16. (2). 114-121p.
- González, FAC.; Rodríguez, RM.; Robles, HL. 2014. Principales virus que afectan el cultivo de papa y metodologías para su identificación y caracterización. *Tecnociencia chihuahua*. 8. (3). 142-151 p.

- Gutierrez, IAT., Sánchez, PJR., Laguna, CA., Ramírez, DJF., Balbuena, MA., Alvarado, GOG. 2013. Detección de *Ca liberibacter solanacerum* y fitoplasma en cultivo de papa (*Solanum Tuberosum* l) en el valle de Toluca. Colomb. Biotecnol. 15. (1). 145-149p.
- Harding, R. M., and Teakle, D. S. 1985. Mycoplasma- like organisms as causal agents of potato purple top in Queensland. Aust. J. Agric. Res. 36:443-449.
- Hernández, LS.2012. Caracterización de las variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Utilizadas en el cofre de perote, Veracruz bajo régimen de temporal. Xalapa, Enríquez Veracruz. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Agrícolas. 85p.
- Instituto nicaragüense de estudios territoriales. (INETER).2012. Dirección general de meteorología.
- INTA/NORAD Zona B-3. 2004. Programa MIP; Plegables sobre: como muestrear las plagas de nuestros cultivos.
- Jones, P., Arocha, Y., Antesana, O., Montellano, E., and Franco, P. 2005. “Brotes grandes” (big bud) of potato: A new disease associated with a 16SrI-B subgroup in Bolivia. Plant Pathol. 54:234.
- Jung, H. Y., Hahm, Y. I., Lee, J. T., Hibi, T., and Namba, S. 2003. Characterization of a phytoplasma associated with witches’-broom disease of potatoes in Korea. J. Gen. Plant Pathol. 69:87-89.
- Khadhair, A. H., Hiruki, C., Hwang, S. F., and Wang, K. 1997. Molecular identification and relatedness of potato witches’-broom phytoplasma isolates from four potato cultivars. Microbiol. Res. 152:281-286.
- Khadhair, A. H., and McAllister, P. D. 2003. Transmission and characterization of phytoplasma diseases associated with infected potato cultivars in Alberta. Acta Hortic. 169:167- 176.

- Lee, I.-M., Bottner, K. D., Munyaneza, J. E., Secor, G. A., and Gudmestad, N. C. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Dis.* 88:429
- Lee, I. M., Bottner, K. D., Secor, G. A., and Rivera-Varas, V. 2006. 'Candidatus *Phytoplasma americanum*', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1593- 1597.
- Lee, I.-M., Bottner, K. D., and Sun, M. 2009. An emerging potato purple top disease associated with a new 16SrIII group phytoplasma in Montana. *Plant Dis.* 93:970
- Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S., and Martínez-Soriano, J. P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Can. J. Microbiol.* 48:1062-1068.
- Liefting, L. W., Veerakone, S., Ward, L. I., and Clover, G. R. G. 2009. First report of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' in potato. *Plant Dis.* 93:969
- Lin, H., and Gudmestad, N. C. 2013. Aspects of pathogen genomics, diversity, epidemiology, vector dynamics, and disease management for a newly emerged disease of potato: Zebra chip. *Phytopathology.* 103. (6). 524 – 537 p.
- Levy J. Ravindran A. Gross D. Tamborindeguy C. Pierson E. 2011. Traslocation of "Candidatus *Liberibacter solanacearum*", the zebra chip pathogen, in potato and tomato. *The American Phytopathological Society.* 101. (11). 1285-1291p.
- MAG Costa Rica. 2010. SFE desarrolla Plan de Acción ante la cercanía de la ParatRIOza (*Bactericera cockerelli* Sulc.) Costa Rica .No 45. 4p.

- Martínez-Soriano, J. P., Leyva-López, N. E., Zavala-Soto, M. E., Berès, M., and Leal- Klevezas, D. S. 1999. Detección molecular del agente causal del síndrome “bola de hilo” de la papa en semillas infectadas y asintomáticas. *Biotechnol. Apl.* 16:93-96.
- Monger, W.A., Jeffries. C.J. 2016. First report of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' in parsley (*Petroselinum crispum*) seed. *New Disease Reports.* 34. 31.
- Munyanza. Joseph E. 2012. Zebra Chip Disease of potato Biology, Epidemiology, and Management. Publications from USDA AR.
- Munyanza, J. E., y Segonda, V. G. 2014. First report of “Candidatus *Liberibacter solanacearum*” on pepper in Honduras. *Plant Disease.* 98. (1). 154p.
- Munyanza, E. Joseph. Y Sengoda G.Venkatesan, Buchman L.Jeremy y Fisher W.Tonga. 2011. Effects of temperature on “Candidatus *Liberibacter solanacearum*” and zebra chip potato Disease Symptom Development. *Plant Disease.* 96. (1). 23p.
- Ravindran A. Levy J, Pierson E. Gross. C. D 2011. Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, ‘Candidatus *Liberibacter solanacearum*’. *Plant Disease.* 95. (12). 1542-1546p.
- Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., and Gross, D. C. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification procedure as a sensitive and rapid method for detection of ‘Candidatus *Liberibacter solanacearum*’ in potatoes and psyllids. *Phytopathology.* 102. (9). 899-907p.
- Rubio, COA.; Almeyda, LIH., Ireta, MJ., Sánchez, SJA.; Fernández, SR.; Borbón, SJT.; Diaz, HC.; Garzón, TJA.; Rocha, RR.; Cadena, HMA. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* sulc. En las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura técnica en México.* 32. (2). 201-211p.
- Rubio, COA.; Almeyda, LIH., Cadena, HMA.; Lobato, SR. 2011. Relacion entre *Bactericera cockerelli* y la presencia de *Candidatus psyllaourous* en lotes comerciales de papa. *Revista México ciencia agrícola.* 2. (1).

- Secor, G. A., Rivera, V. V. Abad, J. A., Lee, I.-M., Clover, G. R. G., Liefting, L. W., Li, X., and De Boer, S. H. 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). 575-583p.
- Teresani, G. R., Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Martínez, C., Tanaka, F. A. O., Kitajima, E. W., Roselló, M., Sanjuán, S., Ferrándiz, J. C., López, M. M., Cambra, M., and Font, M. I. 2014. Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a real-time PCR method for its detection. *Phytopathology*. 104. (8). 804-811 p.
- Toledo, M. 2011. Cultivo de papa: Honduras secretaria de agricultura y ganadería dirección de ciencia y tecnología agropecuaria la esperanza (Tesis de grado) intibuca Honduras 78p.
- Wen. A. Mallik. I. Alvarado, V. Y. Pasche. J. S. Wang. X. Li. W. Levy. L. Lin. H. Scholthof H. B. Mirkov. T. E. Rush. C. M. y Gudmestad. N. C. 2009. Detection, distribution, and genetic variability of 'Candidatus Liberibacter' species associated with zebra complex disease of potato in North America. *Plant Disease*. 93. (11). 1102-1115p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Datos obtenidos en las colectas realizadas en los departamentos Estelí y Jinotega, número de muestras, coordenadas geográficas, época de siembra y fecha según la colecta.

Departamento	Municipio	Época de colecta	Coordenadas Latitud	geográficas Longitud	Altura msnm	Número de muestras colectadas
Estelí	El Zacatón	Postrera	58°20'14''	14°63'38''	1327 m	7
Estelí	El Zacatón	Postrera	58°22'69''	14°62'86''	1379 m	8
Estelí	El Tayacán	Postrera	58°11'77''	14°65'34''	1310 m	17
Estelí	El Tayacán	Postrera	58°12'51''	14°65'59''	1292 m	1
Estelí	El Tayacán	Postrera	58°11'51''	14°65'72''	1282 m	6
Jinotega	San Gregorio	Postrera	60°56'06''	14°61'48''	1188 m	2
Jinotega	San Gregorio	Postrera	60°30'15''	14°62'35''	1300 m	7
Jinotega	El Mojón	Apante	60°43'06''	14°60'93''	1246 m	6
Jinotega	Los Horcones	Apante	60°18'37''	14°61'81''	1287 m	1
Jinotega	Palmera	Primera	60°39'50''	14°64'73''	1145 m	17
Jinotega	Mojón	Primera	60°36'95''	14°61'91''	1266 m	13
Jinotega	El Zacatón	Primera	58°22'04''	14°61'97''	1393 m	5
Jinotega	El Zacatón	Primera	58°17'87''	14°63'89''	1371 m	1
Jinotega	El Zacatón	Primera	58°18'67''	14°64'01''	1383 m	6
Jinotega	El Zacatón	Primera	58°19'72''	14°63'99''	1367 m	6
Jinotega	El Tayacán	Primera	58°14'74''	14°64'93''	1319 m	3
Jinotega	El Tayacán	Primera	58°15'06''	14°64'96''	1327 m	14
Jinotega	El Zacatón	Primera	58°15'30''	14°63'76''	1371 m	2

Anexo 2. Resultados de la amplificación de fragmentos, mediante la técnica PCR. Donde se procesaron las muestras colectadas con síntomas característicos de la enfermedad en los departamentos de Jinotega y Estelí en los tres ciclos de siembra del cultivo de papa.

Ciclo del cultivo	Departamento	Número total de muestras	Número de muestras con cebador endógeno tubulin.	Número de muestras positivas. cebador Lso 16/23	Número de muestras positivas cebador Lso adk
Postrera	Estelí	47	27/47	15/27	11/27
	Jinotega	9	7/9	6/7	3/7
Apante	Estelí	32	32/32	11/32	25/32
	Jinotega	7	7/7	5/7	3/7
Primera	Estelí	37	13/37	0/37	0/37
	Jinotega	30	30/30	13/30	0/30
Total		162	127/162	50/162	42/162

Anexo 3. Guía de entrevista a los productores.

Esta entrevista está dirigida a productores de las localidades donde se realizará la colecta de tejido vegetal.

Departamento:

Nombre de la finca:

Municipio/comunidad:

Nombre del productor:

Cultivos en asocio al de papa:

Topografía. Plana

Pendiente

Área total:

Altitud:

Material colectado: hoja tallo frutos otros