

**DETECCIÓN DE *Candidatus liberibacter solanacearum*, EN EL CULTIVO DE TOMATE, ASÍ COMO EN SU VECTOR *Bactericera cockerelli*, EN TORREON, COAHUILA**

Eliel Rocha-Galván<sup>1</sup>, Verónica Ávila-Rodríguez<sup>1</sup>, Omar G. Alvarado-Gómez<sup>2</sup> Urbano Nava-Camberos<sup>3</sup>, Rafael Pérez-Muñoz<sup>1</sup>, Jorge Sáenz-Mata<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, México, Av. universidad S/N Fraccionamiento Filadelfia Gómez Palacio, Durango, C.P. 35010, <sup>2</sup>Facultad de agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, N. L. <sup>3</sup>Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo Domicilio Conocido Venecia Durango, México. C.P. 35170. Biol\_rocha25@hotmail.com

**RESUMEN:** *Candidatus Liberibacter solanacearum* se ha asociado a algunas enfermedades en cultivos como tomate, papa y otras solanáceas, causando las enfermedades conocidas como “permanente del tomate” o “Zebra chip” en papa, la cual es transmitida por el psílido del tomate, *Bactericera cockerelli* Sulc. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Liberibacter solanacearum* en tejido de tomate y en el insecto vector *Bactericera cockerelli*. Se colectaron un total de 42 muestras de tomate y 44 especímenes de *B. cockerelli* en un campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en noviembre del 2013. A las muestras colectadas se les realizó extracción de ADN mediante el método de CTAB. Con el fin de detectar la presencia de *L. solanacearum* se utilizó la técnica de PCR y los primers AO2 y Oi2C. Se encontró que la extracción de ADN mediante el método de CTAB es eficiente tanto para el tejido de tomate como para el insecto *B. cockerelli*. Se detectó *L. solanacearum* en 12% de las muestras de tomate. También se detectó la presencia de *L. solanacearum* en el 68% de los especímenes de *B. cockerelli*.

Palabras clave: Cultivo de tomate, detección, ADN, *Liberibacter solanacearum*, *Bactericera cockerelli*.

**Detection of *Liberibacter solanacearum* in tomato and in its vector insect *Bactericera cockerelli* in Torreon, Coahuila**

**ABSTRACT:** *Candidatus Liberibacter solanacearum* has been associated to some diseases in several crops such as tomato, potato and other solanaceous crops, causing the disease known as “permanente del tomate” and “Zebra chip” in tomato and potato, which are transmitted by the tomato psyllid, *Bactericera cockerelli* Sulc. The objective of this study was to determine the incidence of *Liberibacter solanacearum* in tomato plants and in the vector insect *B. cockerelli*. A total of 42 samples of tomato and 44 specimens of *B. cockerelli* were collected in experimental plots at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro in November 2013. DNA was extracted from the tomato and insect samples by the CTAB method. For detecting the incidence of *L. solanacearum* the PCR technique and the primers AO2 y Oi2C were carried out. Extraction of DNA by the CTAB method was efficient for both the tomato plants and the insect *B. cockerelli*. The bacteria *L. solanacearum* was detected in 12% of tomato samples. Also, this pathogen was detected in 68% of the *B. cockerelli* specimens.

Key word: Tomato crops, detection, DNA, *Liberibacter solanacearum*, *Bactericera cockerelli*.

**Introducción**

*Lycopersicon esculentum* Miller, conocido comúnmente como tomate, es una especie de la familia de las solanáceas originaria de México y cultivada en todo el mundo por su fruto comestible (López, 2012). El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo, y la podemos encontrar en más de 170 países, su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio; a nivel mundial se mencionan 4.6 millones de ha/año con una producción de 126 millones de ton/año (FAOSTAT 2007), la superficie nacional ronda las 980 ha/año con una producción entre 55.000 mil a 60.000 mil ton/año. Sin embargo, la producción de tomate se ve fuertemente amenazada año tras año por el ataque de insectos y enfermedades. Los cuales constituyen un factor limitante en la producción de tomate en muchas partes del mundo. Entre los principales patógenos que disminuyen el rendimiento

y demeritan la calidad en tomate se encuentran las enfermedades inducidas por hongos y bacterias. Una de las bacterias de gran importancia es *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Calso) (Liefting *et al.*, 2009), comúnmente conocida como “Zebra chip”, esta bacteria se ha asociado a algunas enfermedades en cultivos como tomate, papa y otras solanáceas, es una enfermedad relativamente nueva y es transmitida por el psílido *Bactericera cockerelli* sulc (Calso) ha causado pérdidas millonarias a los productores inclusive el abandono total del cultivo. Esta bacteria se detectó en México en el cultivo de papa en saltillo en 1994, actualmente está distribuida en los estados de Coahuila y Sinaloa, y actualmente se le encuentra en cultivos de tomate y en chile (*Capsicum annuum* L.). Las técnicas moleculares hoy en día han tomado un gran auge para la identificación y caracterización de las especies microbianas en diferentes ambientes, ya que estas son sensibles, rápidas y específicas. Por lo anterior, el propósito del presente estudio fue detectar la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* en el cultivo de tomate, así como en su vector *Bactericera cockerelli*, en Torreón, Coahuila.

## **Materiales y Método**

**Colecta de muestras de tejido vegetal.** El método de colecta fue dirigido a plantas sintomáticas (marchitez, muerte foliar o cambio en la coloración en la planta) en las diferentes partes del cultivo. Se colectaron un total de 42 muestras de tejido de planta de tomate en cultivos en campo abierto durante noviembre de 2013, del total de las muestras 23 correspondieron a la variedad Sahel y 19 a la variedad Top1182. Bajo distintos tratamiento; sin control químico se obtuvieron 11 muestras de tejido y 12 muestras con control químico de la variedad Sahel y 11 muestras sin tratamiento químico y 8 muestras con tratamiento químico de la variedad Top 1182. Todas la muestras fueron colocadas en bolsas de plástico y etiquetadas de acuerdo a sus datos sobre variedad, tratamiento y repeticiones; se transportaron a temperaturas de 4, para su traslado al laboratorio, finalmente las muestras fueron colocadas a -70°C para su posterior procesamiento.

**Colecta de muestras de *Bactericera cockerelli*.** Se colectaron 44 especímenes, los cuales fueron obtenidos mediante distintos métodos de colecta, directa con aspiradores manuales y con red entomológica. Los especímenes se colocaron en tubos falcón, se trasladaron al laboratorio, donde se almacenaron a temperatura de -70C para la extracción de ADN.

**Extracción ADN.** Para la extracción de ADN de tejido vegetal se tomó 5 mm de diámetro de una hoja. Para la extracción de ADN de los insectos se tomó de forma individual siguiendo el método de CTAB (cetyl trimethyl amonium bromide).

**Amplificación de ADN.** La detección de *L. solanacearum* en tubos Eppendorf de 0.2 mL con un volumen total de reacción de 25 µl en un PCR punto final, de acuerdo al procedimiento de Sambrook *et al.*, (1989), el cual consiste en utilizar 5 µl de Buffer de PCR 5X, 1µl de MgCl 25x Mn, concentración final. 0.5 µl de dNTPs 2.5Mn, concentración final, 0.5µl de cada primer de 10 picomoles/µl concentración final, los primers fueron AO2 5`-gcgctatttttaataggagcggca-3` y Oi2C 5`-gcctcgcgacttcgcaacct-3` (Liefting *et al.*, 2009) 0.5µl cada uno (1.5 U) Taq DNA polimerasa, 15 µl agua de grado MiliQ y 2 µL de DNA. El programa térmico que se utilizó, consiste en una temperatura de 94°C por 5 minutos y 36 ciclos de las temperaturas 94-55-72°C durante 30-30-60 segundos. Por último se dará una extensión final a 72°C durante 6 minutos. La amplificación se llevara a cabo en un termociclador (MAXYGENE Thermal Cycler therm 1061 Ver 1.6).

**Visualización del DNA.** Los productos extraídos así como los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 0.8% y 1.5% respectivamente, con amortiguador TBE 0.5% (tris base, ácido bórico, EDTA al 0.5M Ph 8.0). Se empleó un marcador de peso molecular de 100 a 3,000 pb (Axygen Ladder) como referencia. Los geles fueron fotografiados en un fotodocumentador Multidoc-IT UVP®

**Resultados y Discusión**

**Extracción de ADN y detección de *L. solanacearum* por PCR en plantas de tomate.** Se realizaron 42 extracciones de ADN directamente de tejido de tomate sintomático, como estrategia para la detección de *L. solanacearum* por PCR. Del total de muestras procesada para extracción, todas dieron positivo, por lo que se considera que el método de CTAB es un método eficiente para extracción de tejido vegetal (Fig. 1). Los productos de PCR obtenidos correspondieron a un tamaño fragmentos de aproximadamente 1500 pb (Liefiting *et al.*, 2009 y Gutiérrez *et al.*, 2013) y solo se obtuvieron 5 muestras positivas del total de muestras procesadas, lo que corresponde al 12% de muestras positivas para la detección de *L. solanacearum* (Fig. 2).

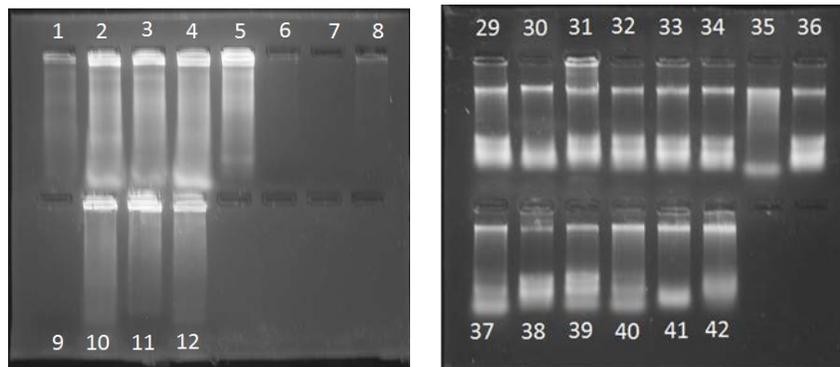


Figura 1. Extracción de ADN de *L. esculentum*, mediante el método de CTAB, en geles de agarosa al 0.8%.

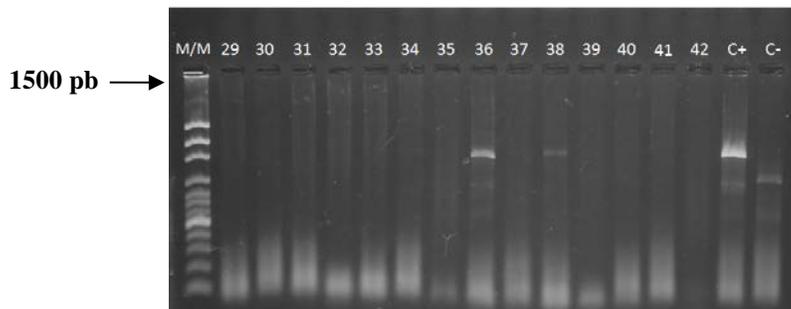


Figura 2. Amplificación de PCR para la detección de *L. solanacearum* en tomate: Carriles 36 y 38 positivos en tejido de tomate; C+ control positivo; C- control negativo. M/M marcador de peso molecular de 3000 pb (Axigen Ladder).

**Extracción de ADN y detección de *L. solanacearum* por PCR en *B. cockerelli*.** Se realizaron 44 extracciones de ADN de especímenes individuales de paratrypano. Del total de muestras procesadas para la extracción 43 dieron positivo, por lo que se infiere que el método de CTAB es un método eficiente para extracción de ADN en *B. cockerelli* y algunos otros insectos (Fraga *et al.*, 2004) (Figura 3). Los productos de PCR obtenidos correspondieron a un tamaño de fragmentos de 1500 pb (Liefiting *et al.*, 2009 y Gutiérrez *et al.*, 2013) y se obtuvieron 30 muestras positivas del total de muestras procesadas, lo que corresponde al 68% de muestras positivas para la detección de *L. solanacearum* (Figura 4).

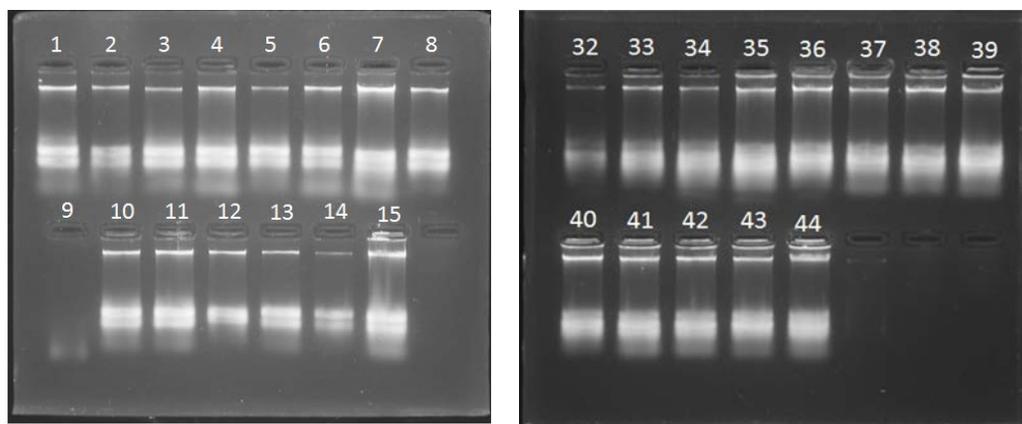


Figura 3. Extracción de ADN de *B. cockerelli* mediante el método de CTAB, en geles de agarosa al 0.8%.

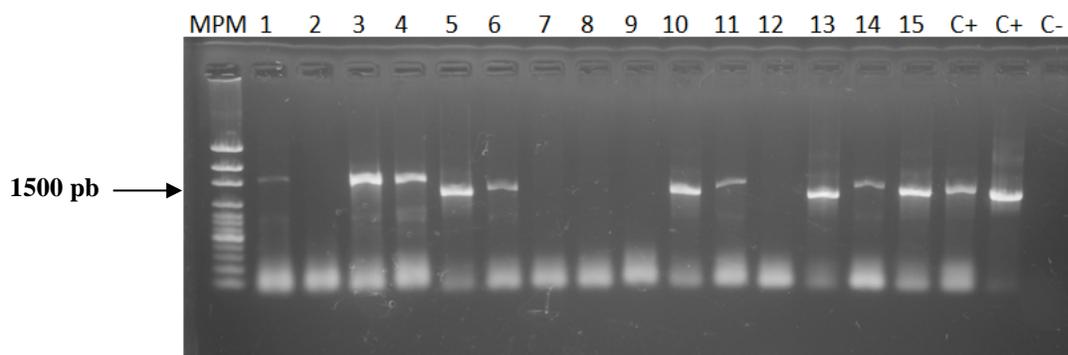


Figura 4. Amplificación de PCR para la detección de *L. solanacearum* en *B. cockerelli*: Carriles 1,3,4,5,6,10,11,13,14,15 positivos; C+ control positivo; C- control negativo. M/M marcador de peso molecular de 3000 pb (Axigen Ladder).

## Conclusiones

Se encontró que la extracción de ADN mediante el método de CTAB es eficiente tanto para el tejido de tomate como para el insecto *B. cockerelli*.

Los productos de PCR obtenidos de tejido de tomate correspondieron a un tamaño de fragmentos de 1500 pb y solo se obtuvieron cinco muestras positivas del total de muestras procesadas, lo que corresponde al 12% de muestras positivas para la detección de *L. solanacearum* en el cultivo.

Se detectó la presencia de *L. solanacearum* en 30 especímenes de *B. cockerelli* mediante la técnica de PCR utilizando los primers AO2 y Oi2C, observándose una banda de amplificación de 1500 pb, lo que corresponde al 68% de muestras positivas para la detección de *L. solanacearum* en el insecto vector.

## Literatura Citada

- Álvarez, Z. R., Felipe Delgadillo Sánchez. 2004. Enfermedades del tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, manejo y Producción Torreón, Coah, México, Octubre 13, 14 y 15 del 2004. Z
- FAO, Statistical Database (FAOSTAT). 2008. Area harvested, yields and production 2008 in Mexico. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>
- Fraga, N. J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos. Revista Cubana Médica Tropical 2004. 56(3):208-13
- Gutiérrez, I. A. T., Sánchez, P. J. R., Laguna, C. A., Ramírez, D. J., Alvarado, G. O. G. 2013. Detección de *Ca Liberibacter solanacearum* y Fitoplasmas en cultivo de papa (*Solanum*

- tuberosum L.) en el Valle de Toluca. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol XV, Num1, 2013, pp.145-149.
- Lacava, T. P.; Dini, A F.; Araujo, W.; Azevedo, J. 2006. Caracterização da comunidade de bacterias endofíticas de cítricos por isolamento, PCR específica e DGGE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, p. 637-542.
- 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 Dis.* 93:208-214.
- López-Reyes, L.; Carcaño-Montiel, Moisés Graciano; Pérez-y-Terrón, Rocío., Fuentes-Ramírez, Luis Ernesto. 2011. La biodiversidad en Puebla, Estudio de Estado. La diversidad de especies: Diversidad en bacterias. Comisión Nacional para el Uso de la Biodiversidad (4) 93-98.
- Velásquez Valle Rodolfo., Medina Aguilar María. 2005. Enfermedades bacterianas del jitomate en Aguascalientes y Zacatecas. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)* 35(1) 2-29
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arumakumari, A., Barletta, R. G, Vidaver, A. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied Environmental Microbiology.* 68:2198-2208.