



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE *Candidatus Liberibacter solanacearum* Y SU EFECTO EN LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO

PERLA XOCHITL OLIVARES MERCADO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: "**Identificación filogenética de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y su efecto en la calidad fisiológica de la semilla de chile jalapeño**", realizada por la alumna: **Perla Xochitl Olivares Mercado**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESOR:



DR. ANGEL REBOLLAR ALVITER

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2013

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE *Candidatus Liberibacter solanacearum* Y SU EFECTO EN LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO

Perla Xochitl Olivares Mercado, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2013

En 1993 se reportó por primera vez en México a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, como el agente causal de la pigmentación morada en las hojas, reducción de tamaño de la planta y necrosis interna de los tubérculos de la papa; posteriormente se detectó este bacterium en los cultivos de tomate, chile y berenjena. Sin embargo, la distribución de las plantas sintomáticas en el campo no tenía un patrón definido hasta que en 2009 se observó la totalidad de plantas atípicas de chile jalapeño cv Ixtapa en dos campos de los estados de Nayarit y Jalisco. Las plantas tuvieron una reducción de tamaño en un 30%, hojas con coloración verde pálido y deformación de los frutos en un 100%. Por tal razón la presente investigación tuvo como objetivos identificar el agente causal de estos síntomas y establecer si existe alguna relación filogenética con *Ca. Liberibacter solanacearum*. Se utilizó semilla de chile jalapeño cv. Ixtapa proveniente de Tailandia y dos cvs. Ixtapa como testigos de origen nacional. Para el análisis molecular se extrajo DNA de 100 semillas y se realizó la amplificación, clonación y secuenciación de los genes ribosomales, se usó también los iniciadores OA2/OI2c y LsoF/OI2c para la detección específica de *Ca. Liberibacter solanacearum*. Los resultados de los productos clonados y secuenciados con los iniciadores específicos confirmó la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* en la semilla de cv. Ixtapa. Posteriormente se realizó una exploración de la semilla mediante Microscopía Electrónica de Barrido, las imágenes obtenidas revelaron la ubicación del bacterium en el micrópilo de la semilla. De esta área se procedió nuevamente a la extracción de DNA para detectar con los iniciadores para filogenia *EcsecY*, y *secY* y específicos OA2/OI2c y LsoF/OI2c para la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum*, los resultados fueron positivos en ambos casos. También se estableció un experimento para evaluar la calidad fisiológica de la semilla, las pruebas mostraron un retraso en la germinación y emergencia de la plántula. De acuerdo a nuestro conocimiento este es el iniciadores reporte que muestra evidencias acerca de la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* dentro de las semillas de chile jalapeño cultivadas en México.

Palabras clave: Chile jalapeño, *Candidatus Liberibacter solanacearum*, PCR, Clonación, Microscopía Electrónica de Barrido, calidad de la semilla.

ABSTRACT

PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* AND ITS EFFECT ON THE PHYSIOLOGICAL QUALITY OF JALAPEÑO PEPPER SEEDS

Perla Xochitl Olivares Mercado, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2013

In 1993 was reported *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* in Mexico for first time, as the causal agent of the purple pigmentation leaves, the size reduction in the plant and internal necrosis in the potato tubers; afterwards it was detected in tomato, chili and eggplant cultivars. However, the distribution of the symptomatic plants in the field didn't have a defined pattern before 2009, when the total of atypic plants of jalapeño peppers cv. Ixtapa was observed in two fields in the States of Nayarit and Jalisco. The plants had a size reduction of 30%, leaves with green pale coloration and a deformation in the fruits in a 100%. For this reason, the objectives of this research were the identification of the causal agent of those symptoms and establish if there is a relationship with *Ca. Liberibacter solanacearum*. Seeds of jalapeño pepper cv. Ixtapa from Thailand were used, as well as two cvs. Ixtapa were used as controls. For the molecular analysis, DNA was extracted from 100 seeds and the amplification, cloning and sequencing were performed using ribosomal genes. Also, OA2/OI2c and LsoF/OI2c specific primers to detection *Ca. Liberibacter solanacearum* were amplified. PCR products cloned and sequenced with specific primers confirmed the presence of *Ca. Liberibacter solanacearum* in the cv. Ixtapa seed. Afterwards it was realized the exploration of the seed by Electronic Microscopy Scanning, the images obtained reveled the location of the bacterium in the seed micropile. DNA was extracted from this area, amplified with *EcsecY*, *secY* phylogeny primers and OA2/OI2c y LsoF/OI2c specific primers to determine the presence of *Ca. Liberibacter solanacearum*, results were positive in all cases. An experiment was established to evaluate the physiological quality of the seed, and the tests showed a delay in the germination and the emergence of the plant. According to our knowledge, this is the first report that shows evidence about the presence of *Candidatus* *Liberibacter solanacearum* inside jalapeño pepper seeds in Mexico.

Key words: Jalapeño pepper, *Candidatus* *Liberibacter solanacearum*, PCR, cloning, electronic microscopy scanning, seed quality.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por el financiamiento de mis estudios de postgrado y por brindarme su apoyo para seguir superándome.

Al **Colegio de Postgraduados - Campus Montecillo, al Laboratorio de Biotecnología de Semillas y la Línea Prioritaria de Investigación 5:** Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal, por proporcionarme las condiciones académicas y la infraestructura necesaria para desarrollar satisfactoriamente mis estudios de Maestría y mi proyecto de investigación.

Al **Sr. Joaquín Ocegueda**, productor se chile jalapeño por tener la iniciativa para dar seguimiento a la problemática que presenta el cultivo en noroeste del país y por proporcionar la semilla para su estudio en el presente trabajo

A la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, por aceptarme como su alumna y por dejarme formar parte de su equipo, por lo que me siento inmensamente agradecida y orgullosa, además quiero darle las gracias por su apoyo, paciencia, comprensión, amistad y por ser para mí, un ejemplo de fortaleza, responsabilidad y perseverancia, sólo me resta decir **MIL GRACIAS**.

Al **Dr. Ángel Rebollar Alviter**, por sus valiosas aportaciones, por su disposición, orientación, por su ánimo y sobre todo por su comprensión y paciencia, GRACIAS.

Al **Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón** por sus valiosas sugerencias, apoyo, paciencia, interés y por el buen ánimo para apoyar mi proyecto, GRACIAS.

A la **Dra. Libia I. Trejo Téllez**, por su apoyo y consejos en mi ingreso al Colegio de Postgraduados.

Al **Dr. Leobigildo Córdova Téllez** porque con sus palabras me alentó en muchas ocasiones.

A **Greta Hanako Rosas Saito** por todas las facilidades para trabajar en el Microscopio Electrónico de Barrido, por tus sonrisas y tu confianza.

A **todos los profesores**, por su instrucción y dedicación otorgados durante mi estancia en la institución.

Al personal del laboratorio y de la coordinación del postgrado: **La señora Martha y la señora Silvia**, gracias por toda su ayuda.

A mis compañeros de laboratorio: **Soledad, Nahúm, Liberia, Jorge Hernández, Kenia, Andrés, Berenice, Jorge, Arturo, Rossana, Omar, Octavio, Cesar, Manuel, Pedro, Inocente, Héctor, Rosario y Toño**; gracias a todos, porque todos me han ayudado incondicionalmente.

A buenos compañeros del COLPOS: **Miriam y José**, por su apoyo y sus buenos consejos, Gracias

Con todo mi amor dedico este trabajo a:

A **DIOS** por haberme bendecido con ésta hermosa vida, por quererme tanto, por cuidar y bendecir mi camino, y **principalmente por permitirme hoy estar viva.**

GRACIAS PADRE MIO.

A mi único tesoro, mi hijo: **Bruno Manuel González Olivares**, por ser tú lo mejor que me haya pasado en la vida, por ser por quien lucho, por ser por quien vivo y por ser la mayor bendición en mi vida, gracias mi amor por compartir tiempo de tu tiempo para que pudiera realizar este proyecto de vida. **GRACIAS MI AMOR**

A mis amados padres, **Gloria Mercado Hernández y Gabriel Olivares Román** quienes me dieron la oportunidad de venir al mundo, por enseñarme que en esta vida sólo trabajando, con esfuerzo y dedicación se logra el éxito, este trabajo es de ustedes en él se refleja mi esfuerzo y dedicación, que tal vez sea poco en comparación de todo lo que ustedes me han dado **GRACIAS** por todo su amor y por creer en mí.

A mis queridísimos hermanos: **Gabriela, Yesenia y Jesús**, **GRACIAS** por sus palabras de apoyo, ánimo y amor.

A mis amados sobrinos a **Fernanda, Alejandro, Yamilet, Sofía y a mi pequeño ángel Zoé**, **GRACIAS**, porque a cada uno de ustedes los llevo en mi corazón, y porque al verlos y sentirlos sé que queda mucha dicha por delante.

Al señor **Homero Zambrano**, **GRACIAS** por qué aunque ya no estás aquí, tu apoyo y tu cariño siempre estuvieron presentes.

A la **Sra. Isabel Escobar** por el enorme apoyo que recibí, y por acompañarme en esa pequeña brecha que se presentó en mi camino. **GRACIAS.**

A mi cuñada **Miriam González Escobar**, por ayudarme y darme alivio con tu gran ayuda, en los momentos en que sentí que no podía más, **GRACIAS** por todo.

A **Mónica Ruiz Jiménez**, **GRACIAS** por tus palabras de bendición, y por mostrarme que todo puede mejorar si creemos en el amor de Dios.

A la **Dra. Araceli Espinoza Castillo** por ese enorme corazón y ese gran espíritu de querer siempre ayudar al prójimo, **GRACIAS** por ayudarme a mí siempre de manera incondicional.

A **Jamid, Ana Mónica y Marco**, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por su amistad, por su apoyo y su alegría, **GRACIAS**

A **Juan Manuel González Escobar**, porque has estado en momentos importantes de mi vida, llenos de retos y pruebas, esta tesis es producto de un deseo, de un anhelo por superarme, es mi esfuerzo en los momentos donde parecía que todo se derrumbaría, por eso te doy las gracias por todo lo que hayas perdido por ayudarme, te doy las gracias esperando que Dios te multiplique todo, absolutamente todo lo que me has dado de corazón.

Que DIOS los bendiga siempre, Perla

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
INDICE DE FIGURAS	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Objetivo general	3
1.3 Objetivos particulares	4
1.4 Hipótesis	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Origen de <i>Capsicum annuum</i>	5
2.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica de <i>Capsicum annuum</i>	5
2.2.1 Clasificación taxonómica	5
2.2.2 Descripción botánica de <i>Capsicum annuum</i> L.	6
2.3 Importancia económica y social	9
2.4 Calidad de las semillas	11
2.4.2 Calidad fisiológica de la semilla	10
2.5 Problemática del cultivo de chile	12
2.5.1 Transmisión de enfermedades por semilla	13
2.6 Diagnóstico de enfermedades en plantas y semillas	15
2.6.1 Métodos de diagnóstico por PCR	15
2.6.2 Clonación de fragmentos amplificados	17
2.6.3 Secuenciación de productos de PCR	17
2.6.4 Análisis filogenético	17
2.7 Cronómetros moleculares	18
2.7.1 Sistema SecY como marcador molecular	20
2.8 Microscopía Electrónica	20
2.8.1 Microscopía Electrónica de Barrido	21
2.9 LITERATURA CITADA	23

CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES RIBOSOMALES

3.1 INTRODUCCIÓN	29
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.2.1 Material vegetal	31
3.2.2 Análisis molecular	31
3.2.2.1 Extracción de DNA de la semilla	31
3.2.2.2 Amplificación de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA	32
3.2.2.3 Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS)	32
3.2.2.4 Clonación de los fragmentos amplificados con los iniciadores para 16S rDNA e ITS	33
3.2.2.5 Secuenciación de productos clonados usando M13F/M13R	33
3.2.2.6 Análisis filogenético con el método de Máxima parsimonia	34
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.3.1 Amplificación de los genes ribosomales	35
3.3.1.1 Amplificación de 16S rDNA	35
3.3.1.2 Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS)	35
3.3.2 Clonación de los productos amplificados	36
3.3.3 Secuenciación y análisis filogenético	37
3.4 CONCLUSIONES	39
3.5 LITERATURA CITADA	40

CAPÍTULO IV. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES

4.1 INTRODUCCIÓN	41
-------------------------	----

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.2.1 Amplificación con los iniciadores <i>SecYF/SecYR</i> para Gram positivas	42
4.2.2 Amplificación con los iniciadores <i>EcsecYF/EcsecYR</i> para Gram negativas	42
4.2.3 Clonación, secuenciación de productos amplificados	43
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.3.1 Productos de la amplificación con los iniciadores <i>EcSecY</i> y <i>SecY</i>	44
4.3.2 Resultados de la secuenciación	44
4.4 CONCLUSIONES	45
4.5 LITERATURA CITADA	46
CAPÍTULO V. DETECCIÓN DE <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> MEDIANTE EL USO DE INICIADORES ESPECÍFICOS	
5.1 INTRODUCCIÓN	47
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.2.1 Análisis molecular de <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i> con el uso de iniciadores específicos	49
5.2.1.1 Amplificación con los iniciadores <i>OA2/O12c</i>	49
5.2.1.2 Amplificación con los iniciadores <i>LsoF/O12c</i>	49
5.2.1.3 Secuenciación y Análisis filogenético	50
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.3.1 Productos de la amplificación con los iniciadores <i>OA2/O12c</i> y <i>LsoF/O12c</i>	52
5.3.2 Secuenciación	53
5.3.3 Análisis filogenético	54
5.4 CONCLUSIONES	55
5.5 LITERATURA CITADA	56

CAPITULO VI. UBICACIÓN DE *Ca. Liberibacter solanacearum* EN SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO A TRAVÉS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

6.1 INTRODUCCIÓN	
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	59
6.2.1 Selección del material vegetal	62
6.2.2 Fijación de la muestra	62
6.2.3 Deshidratación de la muestra	62
6.2.4 Secado por punto crítico	62
6.2.5 Montaje, recubrimiento y observación de las muestras	63
6.2.6 Extracción de DNA de la zona afectada	63
6.2.7 Amplificación y secuenciación con iniciadores OA2/OI2c y LsoF/OI2c	63
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
6.3.1 Micrografías de la semilla de chile jalapeño	64
6.3.2 Amplificación y secuenciación con los iniciadores OA2/OI2c y LsoF/OI2c	67
6.4 CONCLUSIONES	68
6.5 LITERATURA CITADA	69

CAPÍTULO VII. EFECTO DE *Ca. Liberibacter solanacearum* EN LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO

7.1 INTRODUCCIÓN	70
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS	73
7.2.1 Localización	73
7.2.2 Material evaluado	73
7.2.3 Evaluación de la calidad fisiológica de la semilla de chile jalapeño	73
7.2.4 Diseño y unidad experimental	73
7.2.5 Variables evaluadas	73
7.2.5.1 Porcentaje de germinación (PG)	73

7.2.5.2 Velocidad de germinación (VG)	73
6.2.5.3 Envejecimiento acelerado (EA)	74
7.2.6 Análisis estadístico	75
7.2.7 Evaluación de los síntomas en chile jalapeño en condiciones de invernadero	75
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
7.3.1 Evaluación de la calidad fisiológica	76
7.3.2 Descripción de los síntomas en las plantas de chile jalapeño establecidas en condiciones de invernadero.	81
7.4 CONCLUSIONES	84
7.5 LITERATURA CITADA	85
CAPITULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL	88
8.1 LITERATURA CITADA	92

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Principales países productores de chile en el 2011	10
Cuadro 2. Análisis de varianza para determinar la calidad fisiológica de las semillas de chile jalapeño	76
Cuadro 3. Comparación de medias en tres variables que determinan la calidad fisiológica de las semilla de chile jalapeño	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Representación botánica de una planta de <i>Capsicum annuum</i>	8
Figura 2 Distribución de <i>Capsicum annuum</i> en el mundo	9
Figura 3 Producto de la amplificación obtenido por PCR con los Iniciadores 8F/1492R	35
Figura 4 Producto de la amplificación obtenido por PCR con los iniciadores ITS1/ITS4 e ITS5/ITS4	36
Figura 5 Productos de clonación	36
Figura 6 Amplificación de las clonas con los iniciadores M13F/M13R	37
Figura 7 Árbol filogenético construido con las secuencias para las clonas de 16S rDNA	38
Figura 8 Esquema que representa la ubicación de la proteína transmembrana SecY en las bacterias Gram (+) y (-)	43
Figura 9 Producto de la amplificación de DNA de semillas de chile Jalapeño con los iniciadores EcSecY y SecY	44
Figura 10 Diagrama de las posiciones en las que se anclan los iniciadores LsoF/ OI2c y OA2/OI2c	50
Figura 11 Producto de amplificación obtenido por PCR, utilizando los iniciadores OA2/OI2c	52

Figura 12	Producto de amplificación obtenido por PCR, utilizando los iniciadores LsoF/OI2c.	52
Figura 13	Análisis de las secuencias en el NCBI	53
Figura 14	Árbol filogenético realizado con la amplificación de los primers LsoF/OI2c.	54
Figura 15	Microscopia electrónica de barrido de una semilla de chile jalapeño	64
Figura 16	Bacterias encontradas con la técnica de Microscopia electrónica de barrido.	65
Figura 17	Microscopia electrónica de barrido a: se observa la forma de varilla, en las bacterias encontradas en la semilla de chile jalapeño.	66
Figura 18	Microscopía electrónica de barrido de la morfología y tamaño de las bacterias	54
Figura 15	Amplificación con los iniciadores OA2/OI2c y LsoF/OI2c del micrópilo de la semilla de chile jalapeño	64
Figura 16	Porcentaje y velocidad de germinación de las semillas de chile jalapeño	65
Figura 17	Síntomas asociados con <i>Ca. Liberibacter. solanacearum</i> en plantas de chile jalapeño	66
Figura 18	. Producto de amplificación obtenido por PCR, con DNA del micrópilo de las semillas	67

Figura 19	Porcentaje y velocidad de germinación de semillas de chile jalapeño sometidas a la prueba de germinación estándar y a la prueba de vigor de envejecimiento acelerado	80
Figura 20	Síntomas asociados con <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum en condiciones de invernadero	83

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN GENERAL

La importancia del cultivo de chile (*Capsicum annumm* L.) en México surge desde las culturas prehispánicas junto con la calabaza, el maíz y el frijol; estos cultivos constituyeron la base de la alimentación del México antiguo (López, 2003). En la actualidad el cultivo de chile tiene una gran importancia económica debido a la superficie sembrada, a la producción anu

al, al número de empleos que genera y a su presencia en el comercio internacional de comodities. En el año 2012, la superficie sembrada fue de 148,758.88 ha, con una producción de 2'335,560.31 t y un rendimiento promedio de 16.22 t ha⁻¹ (SIAP, 2012).

México es el país con la mayor variabilidad genética de *Capsicum annumm* L., ocupa el segundo lugar a nivel mundial en producción para consumo fresco, aunque la producción mundial está liderada por China, mientras que la India encabeza la producción de chile deshidratado (FAOSTAT, 2011). Sin embargo, el rendimiento y la calidad de chile depende de varios factores, como los internos por el genotipo y de tipo externo como las condiciones climáticas, el suelo, las propiedades físicas, químicas y biológicas del sustrato, calidad del agua, factores nutrimentales, la técnica de producción y los factores bióticos como la presencia de plagas y enfermedades (Pineda-Pineda et al., 2008; Alcántar et al., 2007; Castro et al., 2000).

Uno de los retos más importantes en la producción de chile es la obtención de semilla sana libre de patógenos ya que es el principal insumo para el establecimiento de una plantación. De esta manera se asegura la ausencia de patógenos transmitidos por semilla que puedan causar enfermedades hasta la muerte de las plantas. En el cultivo de chile se han reportado bacterias, virus y hongos que afectan la producción y reducen el rendimiento. (Chiarappa and Gambogi, 1986).

Sin embargo la aparición de nuevas enfermedades en el cultivo de chile continúa, uno de los últimos reportes es en 2008 cuando se detecta por primera vez a *Candidatus Liberibacter* en Nueva Zelanda. Se observó amarillamiento, moteado, deformación de la lámina foliar y muerte repentina de las plantas de *Capsicum* (Liefting et al., 2008). A la bacteria se le dio el nombre de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y se determinó *Bactericera cockerelli* como su vector, a este mismo insecto se le atribuye la transmisión de la enfermedad de la Zebra Chip de la papa (Liefting et al., 2008).

La detección e identificación de nuevos fitopatógenos en Chile y otros cultivos se realizan con métodos basados en técnicas moleculares mediante la amplificación de regiones específicas del DNA, específicamente de los operones ribosomales. Esta región es la más importante para la identificación filogenética de los microorganismos porque los ribosomas acumulan los cambios que se producen a través del tiempo, los ribosomas son considerados como relojes moleculares de la evolución.

Las secuencias de los genes 16S rRNA de microorganismos procariotas y del Espacio Transcrito Interno (ITS) del DNA ribosomal en eucariontes, permiten un diseño personalizado de iniciadores específicos para los sistemas de detección de bacterias y hongos. Estos genes “universales” (rRNA) se utilizan ampliamente para la clasificación filogenética correcta de organismos incluidos dentro de los tres dominios en los que está organizada la vida dentro del planeta (Garrity et al., 2002; León-Galván et al., 2008; Escalante-Minakata et al., 2008).

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El chile constituye una de las especies cultivadas de mayor importancia económica para muchos países a nivel mundial. En 2009 se ha presentado un nuevo problema fitosanitario en 200 ha en los estados de Nayarit y Jalisco sembradas con plantas de chile jalapeño cv. Ixtapa procedente de Tailandia. Las plantas tuvieron una reducción en el tamaño de la planta del 30%, las hojas adquirieron una tonalidad verde claro y la totalidad de los frutos presentaron deformaciones. Estudios preliminares para verificar la calidad genética de la semilla mediante el uso de microsatélites confirmó la identidad de las semillas y descartó la presencia de posibles mezclas. Por lo tanto se iniciaron estudios para determinar la presencia de posibles fitopatógenos con la ayuda de técnicas basadas en la amplificación del DNA.

Y considerando las herramientas biológicas, histopatológicas y moleculares, se plantea la presente investigación, para contribuir al conocimiento sobre la problemática con los siguientes objetivos:

1.2 OBJETIVO GENERAL

- Identificar y determinar molecularmente a las poblaciones de microorganismos presentes en semilla de chile jalapeño asociados a la deformación de frutos, así como establecer su posible relación con *Candidatus Liberibacter solanacearum* y su efecto en la calidad fisiológica de la semilla.

1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las poblaciones de microorganismos presentes en semilla de chile jalapeño mediante la amplificación de los genes ribosomales.
- Identificar la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante la amplificación de proteínas transmembranales.
- Identificar la presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* por medio de iniciadores específicos OA2, y LsoF.
- Determinar la ubicación del agente causal de los síntomas presentes en chile jalapeño, a través de microscopia electrónica de barrido.
- Evaluar el efecto de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en la calidad fisiológica de la semilla de chile jalapeño.

1.4 HIPÓTESIS

- Dentro de la población de microorganismos presentes en la semilla pueden existir algunos patógenos cultivados o no cultivados que pueden estar afectando el desarrollo de las plantas de chile jalapeño.
- El agente causal de los síntomas en el cultivo de chile puede encontrarse en alguna estructura interna o externa de la semilla.

CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen de *Capsicum annum* L.

Los restos más antiguos de la planta o fruto del chile (*Capsicum* spp.), proceden del valle de Tehuacán (México) y datan del año 5000-3000 a.C., a los que denominaban chile o ají. El centro de origen y/o domesticación de *C. annum* fue en Mesoamérica, principalmente México y Guatemala (Pickersgill, 1971).

2.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica de *Capsicum annum* L.

2.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del chile es la siguiente:

Reino: Plantae - Plantas

Subreino: Tracheophyta - Plantas vasculares

Superdivisión: Spermatophytina - Plantas con semilla

División: Angiospermae - Plantas con flores y frutos

Clase: Magnoliopsida - Dicotiledóneas

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum annum* L. (ITIS, 2012)

El género *Capsicum* incluye 24 especies silvestres y 5 especies domesticadas (IBPGR, 1983; Bosland and Votava, 2000).

Existen aproximadamente 22 especies silvestres del género *Capsicum* y 5 que han sido domesticadas las cuales incluyen a *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* J., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* (Ochoa, 2001).

Capsicum annuum presenta una gran variabilidad genética, se presentan diversas corrientes para su denominación botánica, la mayoría de autores coinciden en denominar *C. annuum* a la especie que engloba a todas las variedades cultivadas.

2.2.2 Descripción botánica de *Capsicum annuum*

C. annuum se cultiva como una planta herbácea anual, es monoica, tiene los dos sexos incorporados en una misma planta, y es autógama, se autofecunda; aunque puede experimentar hasta un 45% de polinización cruzada (Orellana et al., 2000).

El sistema radical es pivotante y profundo (dependiendo de la profundidad y textura del suelo), con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 cm y 1 m (Nuez, 1996).

El tallo principal es de crecimiento limitado y de tallos erguidos. A partir de cierta altura emite 2 ó 3 ramificaciones (dependiendo de la variedad) y continúa ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo (los tallos secundarios se bifurcan después de brotar varias hojas, y así sucesivamente) (Nuez, 1996).

Las hojas enteras, con un largo pecíolo o casi sésiles, tienen una forma entre lanceolada y aovada, con el borde entero o muy ligeramente sinuoso en la base. Es de color verde claro u oscuro y en ocasiones de color violáceo.

De una planta a otra se encuentran variaciones en las dimensiones y el número de hojas (FAO, 2006). Las hojas se caracterizan por ser enteras, lampiñas y lanceoladas, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es liso y suave al tacto, la nervadura principal parte de la base de la hoja como una prolongación del pecíolo, del mismo modo que las nervaduras secundarias que son pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto (Nuez, 1996).

Las flores del chile son hermafroditas, es decir, una misma flor produce gametos femeninos y masculinos, suelen nacer solitarias en cada nudo y con el pedúnculo torcido hacia abajo cuando se produce la antesis. El cáliz, de una sola pieza, está formado por 5 - 8 sépalos verdes que persisten y se endurecen hasta madurar el fruto (Orellana et al., 2000). La corola es usualmente blanca lechosa, está formada por 5 - 8 pétalos, con la base de los mismos formando un tubo muy corto. El androceo está formado por 5 - 8 estambres y el gineceo por 2 - 4 carpelos (Orellana et al., 2000).

Las flores están localizadas en los puntos donde se ramifica el tallo o axilas, encontrándose en número de uno a cinco por cada ramificación. Generalmente, en las variedades de fruto grande se forma una sola flor por ramificación, y más de una en las de frutos pequeños.

El fruto es una baya hueca, de superficie lisa y brillante, de colores y formas muy variables, con características típicas en cada cultivar. En el interior de la baya se encuentran 2 ó 4 tabiques incompletos a lo largo de la pared del fruto, uniéndose solamente en la base de la placenta (Figura 1).

El color de los frutos, así como cambios del mismo, es debido a la presencia de pigmentos carotenoides y antocianinas (Maroto - Borrego, 1995).

El grosor del pericarpio es una de las características importantes para la valoración de las variedades, de tal modo que el chile cultivado para consumo fresco, debe tener un pericarpio carnoso, mientras que el chile para pimentón deberá tenerlo bastante fino (FAO, 2006).

El sabor de algunos de sus cultivares se debe a la presencia de un alcaloide llamado capsicina. La concentración de este alcaloide es mayor en la placenta, menor en la pulpa y casi no se encuentra en las semillas y la piel (Guenkov, 1974).

Los frutos de chile poseen un elevado contenido vitamínico, principalmente en forma de vitamina C (Bastin, 1995). En la región de la placenta se insertan las semillas, normalmente de 4 a 5 mm de diámetro, de color blanco amarillento (Borrego, 1995). Las semillas de los cultivares de *C. annuum* no presentan fenómenos de latencia (Nuez, 1996).



Figura 1. Representación botánica de una planta de *Capsicum annuum* (Franz, 1897).

2.3 Importancia económica y social de *Capsicum annum* L.

La producción de *Capsicum annum* L. en el mundo se extiende a varios países (Fig. 2), pero solo en siete de ellos, de distintos continentes, se concentra la mayoría de la producción. Los principales países productores de Chile. (Cuadro 1.), destacando en primer lugar China como principal productor concentrando más del 50% del total mundial, y en segundo lugar se encuentra México. (FOASTAT, 2011).

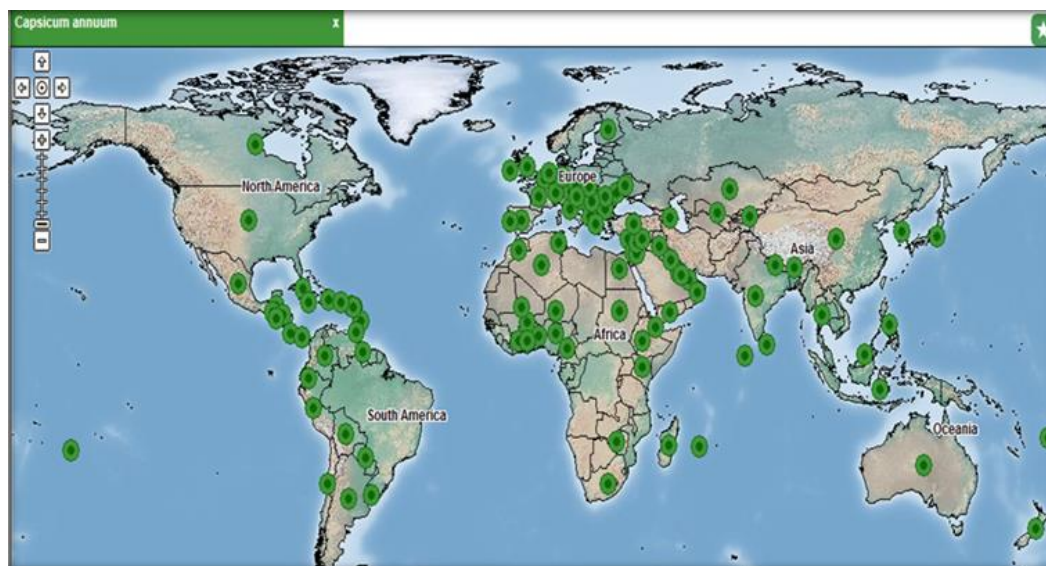


Figura 2. Distribución de *Capsicum annum* en el mundo. (Tomado de www.plantwise.org).

En lo que respecta a la producción de Chile seco se está concentrando principalmente en países asiáticos, encabezados por la India, China y Bangladesh, donde México se ubica

en décimo lugar, trayendo como consecuencia que grandes volúmenes de Chile seco sean importados de China vía Estados Unidos con estrada libre de aranceles debido al Tratado de Libre Comercio de América del Norte- (TLCAN). (Morales y González, 2005, Reyes, et al., 2006, Berríos et al., 2007.)

Cuadro 1. Principales países productores de chile en el 2011.

País	Área (ha)	Rendimiento (t ha⁻¹)	Producción (t)
China	652,296	21.88	14,27,278
México	132,337	15.52	2,054,968
Turquía	88,000	20.41	1796,117
Indonesia	202,712	5.3	1092,115
España	18,861	52.60	992,200
Estados Unidos	30,720	29.61	909,810
Otros	754,152		
Total	1,879,078	15.34	28,483,822

Fuente: FAOSTAT, 2011.

México destaca a nivel mundial por tener la mayor variabilidad genética de *Capsicum annum* L., lo que ha dado origen a numerosas de chile. Actualmente se estima que existen más de 40 tipos de chile, entre los que destacan el serrano, jalapeño, ancho, pasilla, guajillo y de árbol (Nuez et al., 2003, Galindo y Cabañas, 2006). Debido a la variedad de especies, la producción de chile en México se extiende prácticamente a todas sus entidades federativas, ya que en algunos estados se produce chile deshidratado, mientras que en otros, la producción se destina para su consumo en fresco (Montes et al., 2004).

La importancia del chile en México se extiende a cada uno de sus estados y regiones debido a su diversidad genética, logrando que su producción se realice en diversos climas y topografías (Pozo, 2002). Los principales productores de chile son: Chihuahua (23%) del total de la producción nacional, Sinaloa (27%), Zacatecas (12%) La producción de chile en México se divide según la forma de consumo, ya sea en fresco o seco (SIAP, 2010).

2.4 Calidad de la semilla

La calidad es uno de los atributos más importantes de la semilla, para que una semilla tenga una calidad aceptable es necesario que reúna los requisitos de: i) **Calidad genética**, inherente a la información genética contenida en la semilla que proporciona el potencial para un buen rendimiento, mejor calidad y mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico. ii) **Calidad fisiológica**, representada por la viabilidad, germinación y vigor de las semillas, lo que determina su potencial para germinar, la velocidad para la emergencia de las plántulas y el establecimiento del cultivo en el campo. iii) **Calidad física**, se evalúa el tamaño, peso y uniformidad de las semillas, así como la pureza que es la ausencia de semillas de otros cultivos, malezas y materia inerte. iv) **Calidad sanitaria**, es la ausencia de todo agente causal de enfermedades que puedan ser transmitidos por la semilla, como pueden ser hongos, bacterias, fitoplasmas, nematodos, insectos etc. (Bishaw et al., 2007).

2.4.2 Calidad fisiológica de la semilla

De los componentes de la calidad fisiológica, la germinación está definida como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal en condiciones favorables (Bishaw et al., 2007; Moreno, 1996).

Una semilla es viable cuando es capaz de germinar (crecimiento del embrión y aparición de la radícula) en condiciones ambientales adecuadas. Un procedimiento para medir la viabilidad consiste en detectar el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Esto se consigue con un compuesto soluble e incoloro, el cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio que posee un potencial de reducción intermedio entre los transportadores de la cadena.

Es una herramienta útil para estimar rápidamente la capacidad germinativa. En los programas de control de calidad su uso contribuye permitiendo agilizar decisiones de compra, venta, beneficio, almacenamiento o descarte de semillas (Leme, et al 1995).

El vigor de las semillas es de utilidad para predecir el comportamiento de estas cuando las condiciones del ambiente no son del todo favorables para la germinación y emergencia de las plántulas. En 1977 el Comité de pruebas de Vigor de ISTA lo definió como la suma de todas aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y comportamiento de la misma durante su germinación y emergencia de la plántula (Moreno, 1996).

2.5 Problemática del cultivo de chile

El cultivo de chile, como el resto de los cultivos es afectado por diferentes microorganismos fitopatógenos como bacterias, hongos y virus (Agrios, 2006).

Por problemas sanitarios de origen patogénico se estima que en el cultivo de chile tiene una pérdida de rendimiento en México de 30%. Sin embargo son recurrentes los casos en que las pérdidas se aproximan al 100% (SAGARPA, 2012).

El Chile presenta susceptibilidad a problemas fitosanitarios como son enfermedades y plagas; entre las principales enfermedades se encuentran *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium sp*, *Phytophthora sp*, *Alternaria alternata*, *Cercospora capsici*, *Ralstonia solanacearum* (Barreto et al., 2002), y una de las enfermedades más destructivas es la mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (nueva clasificación propuesta: *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones et al. 2004),

Por otro lado las plagas como: la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*, *B. argentifolii*); Paratrioza (*Bactericera cockerelli*), pulgón verde (*Myzus persicae*), barrenillo del Chile (*Anthonomus eugenii*), minador de la hoja (*Liriomyza ssp*), ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*), araña roja (*Tetranychus urticae*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano del fruto (*Helicoverpa zae*, *Heliothis virescens*) y gusano del cuerno (*Manduca sexta*) han tenido un papel importancia en las pérdidas económicas (INIFAP, 2011).

En marzo de 2009, se ha observado en Sinaloa, que plantas de Chile presentaban síntomas parecidos al causado por el psílido de papa (*Bactericera cockerelli*) transmitiendo "*Candidatus Liberibacter solanacearum*". Las plantas mostraron un crecimiento apical clorótico o verde pálido y catación de la hoja, disminuyendo el vértice agudo de la hoja, entrenudos acortados, y un retraso en el crecimiento global (Liefting et al., 2009).

2.5.1 Transmisión de enfermedades por semilla

La patología de semillas es la ciencia que estudia las implicaciones relativas a la asociación de patógenos con la semilla, considerando todas las etapas del sistema de producción, teniendo como objetivo principal el control de los patógenos transmisibles por semilla (Neergaard, 1979).

La semilla ofrece las condiciones nutrimentales adecuadas para el desarrollo de una nueva planta y para organismos que pueden vivir de manera saprófita o fitopatógena. El 90% de los cultivos destinados a la producción de alimentos puede sufrir algún tipo de enfermedad y sus agentes, en su mayoría, son transmitidos por la semilla. Se ha encontrado cerca de 1.500 organismos presentes en lotes de semillas de aproximadamente 600 géneros de plantas, por lo que se puede concluir que la mayoría de los patógenos pueden ser transportados a través de la semilla, sin embargo, no todos los microorganismos transportados por semilla son obligatoriamente causantes de enfermedades.

La efectividad del transporte de patógenos y la transmisión de enfermedades por la semilla dependen de una serie de factores bióticos y abióticos. En general, las causas de transmisión de patógenos aumentan en la medida en que el inóculo se ubique en el embrión de la semilla. Considerando la importancia económica internacional se puede considerar que la sanidad tiene gran trascendencia en la producción de las diferentes especies vegetales en condiciones económicas favorables (Neergaard, 1979).

El objetivo principal del manejo de los patógenos que se transmiten por semilla se logra a través de la aplicación de varias estrategias destinadas a reducir estos riesgos. De este modo, la inspección y el análisis de las semillas permiten la detección oportuna de los microorganismos asociados a ellas; los tratamientos permiten protegerlas de dichos microorganismos y, en algunos casos, erradicarlos.

Finalmente, una legislación sanitaria adecuada permite regular y orientar el necesario intercambio internacional de semillas, desarrollando esquemas de certificación, que son las normas legales para calificar las semillas asegurando la identidad genética, pureza física, germinación, ausencia de malezas y de patógenos, logrando obtener y ofrecer semillas sanas (Sherf and Macnab, 1986).

2.6 Diagnóstico de enfermedades en plantas y semillas

La identificación de bacterias se ha basado en combinaciones de pruebas fisiológicas y bioquímicas, para metabolizar ciertos sustratos, mientras que la identificación de hongos se ha realizado con base en características morfológicas, tales como tipo de espora, forma y color, en el caso de los virus la utilización de pruebas serológicas y plantas diferenciales han sido muy útiles. Sin embargo, en los últimos 40 años, los avances en la biología molecular con el uso de la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (qPCR) han permitido la expansión de los métodos de diagnóstico y procedimientos de identificación de diferentes patógenos en plantas y semillas (Bridge, 2002).

2.6.1 Métodos de diagnóstico por PCR

La principal herramienta de diagnóstico molecular de microorganismos fitopatógenos es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta herramienta es rápida, económica y permite obtener un gran número de copias de moléculas de DNA vía catálisis enzimática, para mostrar diferencias en secuencias de genes del RNA ribosomales, mitocondriales o genes housekeeping (Luc *et al.*, 2005; Atkins and Clark, 2004).

2.6.2 Clonación de fragmentos amplificados

La posibilidad de clonar un fragmento de PCR se debe a la capacidad que poseen plásmidos y fagos de seguir su desarrollo después de que secuencias adicionales de DNA han sido incorporadas en su material genético.

Un plásmido es un DNA circular extracromosómico y autorreplicante que existe en las bacterias; un fago o bacteriófago (virus bacteriano). Ambos tienen la capacidad de replicarse miles de veces utilizando para ello el material que posee la bacteria para sus propios procesos. La inserción de secuencias foráneas genera un plásmido o fago quimérico o híbrido que se replica en bacterias como si fuera el plásmido o fago original. Tanto a los plásmidos como a los fagos que se utilizan para transportar DNA foráneo como parte de su genoma se les denomina vectores. Las copias del original y del fragmento foráneo pueden extraerse de la bacteria hospedante, obteniéndose un gran número de copias de material genético que contiene también replicado el fragmento insertado (Davis et al., 1986).

El genoma de un plásmido es circular; sin embargo el corte con una enzima de restricción da origen a una molécula lineal donde los dos extremos se pueden unir con el DNA lineal producto de la PCR, obteniéndose de esta manera un plásmido quimérico circular que puede perpetuarse indefinidamente en una bacteria. Los plásmidos contienen dos genes que confieren resistencia específica a antibióticos y uno de ellos posee un lugar de restricción.

Al ser insertado el DNA foráneo, el gen queda interrumpido y la resistencia frente al antibiótico es anulada. Uno de los genes que se utiliza para conocer si el plásmido lleva el inserto y el gen de selección para la bacteria que contiene el plásmido se realiza mediante el crecimiento de la bacteria en un medio que contenga el antibiótico contra el que presenta resistencia conferida por el plásmido que hospeda (Sambrook et al., 1989).

2.6.3 Secuenciación de los productos de PCR

El fragmento de DNA clonado permite tener cantidades indefinidas de éste a partir de una sola molécula. La clonación es un paso previo necesario en la mayoría de los procesos en biología molecular para separar hebras de DNA amplificadas con iniciadores universales o específicos. Una vez que un segmento de DNA ha sido clonado, la secuenciación nos revela si codifica para genes ribosomales, cloroplasto, mitocondriales o proteínas housekeeping (Okayama et al, 1982).

La técnica de secuenciación de fragmentos de DNA se desarrolló a finales de los años 70. Tanto el método químico desarrollado por Maxam y Gilbert, como el método enzimático o de los "dideoxi", desarrollado por Sanger, compartían un principio común: la generación de cadenas sencillas de DNA, marcadas radiactivamente, cuyo tamaño se diferenciaba del de la siguiente cadena en una única base, y que podían separarse por su diferente movilidad electroforética en geles desnaturizantes donde los diferentes fragmentos capaces de impresionar una placa de autoradiografía (Lewin, 2008).

2.6.4 Análisis filogenético

Un árbol filogenético refleja el proceso de evolución de las entidades biológicas como el resultado de una “descendencia con modificación” (Darwin, 1859) entre especies ancestrales y descendientes ya sea caracteres morfológicos o moleculares. La parte inherente de la filogenética es la relación ancestro–descendiente que se trata de estimar a partir de los caracteres estudiados, y cuya relación se trata de representar en los árboles filogenéticos.

Existen tres métodos comúnmente utilizados en estudios de sistemática filogenética: La Cladística, usando el principio de Máxima Parsimonia (MP); Máxima Verosimilitud (MV) y la inferencia Bayesiana (IB).

De los tres métodos válidos para inferencia filogenética, algunos sistemáticos utilizan solo uno de ellos, o combinaciones de los tres. Por lo general, estas preferencias se basan en fundamentos filosóficos y/o razones prácticas. La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio.

En la Máxima Parsimonia (MP) se usa un mínimo de asunciones a priori sobre los caracteres utilizados como fuente de información; se asume que cualquier carácter heredable es una homología potencial. En MP el árbol filogenético que se prefiere es el que implica la mínima cantidad de cambios evolutivos que se requieren para explicar una determinada matriz de caracteres (Swofford et al., 1996).

Por otro lado el método de Máxima Verosimilitud (MV) selecciona el cladograma óptimo que tenga la mayor verosimilitud, basándose en un modelo de cambios de probabilidad específica, siendo un método estadístico que requiere un modelo de evolución para el cálculo de probabilidades; y mientras que la verosimilitud mide la probabilidad de los datos dado un árbol, el método Bayesiano calcula para cada árbol, la probabilidad de que sea la hipótesis correcta (en función de los datos). (Rannala and Yang, 1996; Lewis, 1998, 2001; Huelsenbeck et al., 2002; Holder and Lewis, 2003).

2.7 Cronómetros moleculares

Antes de los años sesentas, la única forma de analizar la filogenia era por medio de los fósiles, por lo que no podía estudiarse la historia evolutiva de los organismos.

Desde entonces, las herramientas moleculares han sido de gran ayuda para conocer la filogenia de organismos que no generan fósiles, organismos con poca morfogénesis en el tiempo u organismos con gran variabilidad fenotípica; una de estas herramientas son los relojes moleculares.

Los relojes moleculares se basan en que los procesos de replicación del DNA, transcripción, síntesis de proteínas y metabolismo, son similares en todos los organismos. Además, las proteínas y RNA's que llevan a cabo los procesos de mantenimiento y funcionalidad celular son altamente conservados y que a través del tiempo se ha presentado la sustitución de nucleótidos en los genes de mantenimiento, por lo que las secuencias de DNA y de proteínas han cambiado. Estos cambios han preservado la funcionalidad de los genes a pesar de las modificaciones, por lo que los cambios en el código de DNA han tenido poco o ningún efecto en la funcionalidad del gen o de la proteína (Bargues et al., 2000).

El análisis de genes que codifican para la subunidad menor de rDNA (16S en procariotes y 18S en eucariotes) permiten el análisis de relaciones relativamente ancestrales (>100 m.a.) (Wainright et al., 1993), esto se debe a que la tasa de sustitución nucleotídica de estos genes es relativamente baja (Meyer et al., 2010). Por tanto, los cambios en las secuencias de nucleótidos de estos genes son útiles para resolver relaciones entre taxa muy cercanos que han divergido recientemente (aproximadamente <10 m.a.) (Campbell et al., 1996). La tasa de sustitución del gen 18S rRNA se calcula en un promedio de 1.8×10^{-10} sustituciones por año, lo que equivale a 1.8 % por cada 100 m.a., cálculo estimado de acuerdo a la tasa de sustitución del gen 16S rRNA en procariotas (Moran et al., 1993). Sin embargo, otros autores, determinaron que la tasa de sustitución es de 0.8 % por cada 10 m.a., al comparar secuencias ascendentes del gen 18S del rRNA de organismos multicelulares divergentes, de los cuales se conoce el tiempo de divergencia (Escalante, 1995).

Las regiones internas transcritas son más útiles para dilucidar eventos más recientes, ya que estas evolucionan más rápido que el gen 18S rRNA, por tanto, pueden proveer información de taxa que aparecieron y evolucionaron en los últimos 50 m.a. (Mas-Coma, 1999).

Se calcula que los Espacios Transcritos Internos (ITS) tienen una tasa de sustitución de 0.3-0.8 % por cada m.a. muy similar en las secuencias no transcritas (Depres et al., 1992).

2.7.1 Sistema de secY como marcador molecular

El sistema secY, es una proteína que codifica para una subunidad translocasa, es otro marcador molecular útil para la diferenciación más fina de las cepas. El gen secY tiene una secuencia similar a la de los genes *rp*. (Lee *et al.*, unpublished) pero se ha encontrado que las secuencias del gen secY son mejores que las producidas por *rp*, debido a que los caracteres son más informativos, por lo que podría representar una buena opción como marcador molecular para la clasificación de cepas bacterianas (Lee et al., 2004a, b, 2006b and Martini et al., 2007)

2.8 Microscopía Electrónica

Los primeros microscopios electrónicos se construyeron en la década de 1930, fueron creados en forma independiente en varios países por científicos e ingenieros que trabajaban en el desarrollo de la televisión, pero no es hasta la década de 1950 que se desarrollaron métodos de fijación, inclusión y corte adecuado que permitieron la mejor visualización del espécimen.

Existen dos tipos de microscopios electrónicos que proporcionan datos morfológicos y analíticos de células y tejidos: el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM Scanning Electron Microscope). El adelanto principal de la microscopia electrónica respecto a la microscopia óptica es que la longitud de onda del haz de electrones es una 2000 veces menor que la del haz de luz, con lo que aumenta la resolución por un factor de 10^3 .

El SEM es un instrumento para obtener fotografías tridimensionales debido a que tiene una alta resolución y una gran profundidad de campo. En las fotografías se puede apreciar la ultraestructura de muestras microscópicas detallando las características morfológicas y topográficas. También se puede observar cualquier tipo de espécimen o de materiales orgánicos (crustáceos, plantas, parásitos, hongos, invertebrados, plancton, protozoarios, bacterias, tejidos, músculo, células, neuronas, cabello y pelo) y materiales inorgánicos (industria petroquímica, biodeterioro de obras y artes, pintura, papel, enlatados, balística, material geológico, material de electrónica y computación, metales, aleaciones, plásticos, vidrios, etc;) (Hayat, 2000).

2.8.1 Microscopía Electrónica de Barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM) utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía para generar una variedad de señales en la superficie de especímenes sólidos. Las señales que se derivan de las interacciones de la muestra de electrones revelan información acerca de la muestra incluyendo la morfología externa (textura), composición química, y la estructura cristalina y la orientación de los materiales que componen la muestra. En la mayoría de las aplicaciones, los datos se recogen sobre un área seleccionada de la superficie de la muestra, y una imagen 2-dimensional se genera que muestra las variaciones espaciales.

Áreas que van desde aproximadamente 1 cm a 5 micras de ancho se pueden obtener imágenes en el modo de exploración utilizando técnicas convencionales de SEM (magnificación 20X que van desde aproximadamente 30.000 a X, la resolución espacial de 50 a 100 nm). La SEM es también capaz de realizar análisis de ubicaciones de los puntos seleccionados en la muestra; este enfoque es especialmente útil en forma cualitativa o semi-cuantitativamente determinar composiciones químicas, estructura cristalina, y orientaciones cristalinas (Goldstein, 2003).

2.9 LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N.** 2006. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, USA.
- Atkins, S., and Clark, I.** 2004. Fungal molecular diagnostics: A mini review. Journal of Applied Genetics 45: 3-15.
- Bargues, M. D., Marcilla, A., Dujardin, J. P., and Mas-Coma, S.** 2000. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers, In: J. Alvar, Molecular Epidemiology and Diagnosis of Parasitic Diseases, Book Homage to Prof. Douglas C Barker, Cambridge University Press, Cambridge.
- Barreto, J.D., Aguirre, M. C., Caicedo, A. M., Miranda, D., Echeverri L. A y. Campos Y. Y.** 2002. Manual: El cultivo del tomate tipo milano, pimentón, maíz dulce y frijol en el sistema de siembra de camas plastificadas bajo las condiciones agroecológicas de la meseta de Ibagué. Editorial El Poira, Ibagué.
- Bastin, R.** 1970. Tratado de Fisiología Vegetal. Compañía Editorial Continental S. A España. P.368-370.
- Berríos, M. E., Arredondo, B and Tjalling, H.** 2007. Guía de manejo de nutrición vegetal de especialidad: Chile. SQM. México, D. F. 103 p.
- Besnier, R. F.** 1989. Semillas: Biología y Tecnología. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. p. 63.
- Bishaw, Z., Niane, A. A., and Gan, Y.** 2007. Quality seed production: pp. 349-383 In: Lentil: An ancient crop for modern times. Yadav, S.S., McNeil, D. and Stevenson, P.C. (eds.) Springer Verlag.
- Bosland, P. W., and Votava E. J.** 2000. Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. Crop Production Science in Horticulture 12. CAB International Publishing, Wallingford, England, UK. pp. 204.

- Bridge, P.** 2002. "Biochemical and molecular techniques". pp. 229-244. In: Waller, J.M., Lenne, J. M. and Waller, S. J. (eds.), Plant Pathologist's Pocketbook. 3rd ed. (). Wallingford, 22 43 p.
- Darwin, C.** 1859. On the Origin of Species by Means of Natural selection, the reservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London.
- Davis, L. G., Dibner M. D., and Battey, J. F.** 1986. Basic Methods in Molecular Biology. Ed. Elsevier.
- Despres, L., Imbert-Establet, D., Combes, C., and Bonhomme, F.** 1992. Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes:Trematoda). Mol. Phyl. Evol. 1: 295-304.
- Escalante, A. A., and Ayala, F. J.** 1995. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 5793-5797 pp.
- FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) . 2006.
- FAOSTAT** (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011. Production crops.
- Franz, E. K.** 1897. Medizinal Pflanzen.
- Galindo, G., Cabañas, C.** 2006. El cultivo de chile seco en Zacatecas. In: Tecnología de producción de chile seco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Pp. 5-18.
- Goldstein, J. Newbury, D. Joy, D. Lyman, C. Echlin, P.** 2003 Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. New York: Kluwer. 689 p.
- Guenkov, G.** 1974. Fundamentos de Horticultura Cubana. Instituto Cubano del Libro. La Habana, Cuba Academic/Plenum Publishers, 689 pp.
- Hayat, M.A.** 2000. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge. 564 pp.

- IBPGR.** 1983. Genetic resources of Capsicum: A Global Plan of Action. International Board for Plant Genetic Resources. AGPG/IBPGR/82/12. Rome, Italy. 49 p.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).** Foro para productores de Chile 2011.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System).** www.itis.gov. Consultado el 10 febrero de 2013.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. and Shaad, N.** 2004. Reclassification of Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* 27, 755–762.
- Lee, I. M., Martini, M., Marcone, C. and Zhu, S. F.** (2004a). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 337–347.
- Lee, I. M., Gundersen, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marcone, C. and Seemu" Iler, E.** (2004b). ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1037–1048.
- Lee, I. M., Bottner, K. D., Secor, G and Rivera, V. V.** 2006a. ‘*Candidatus phytoplasma americanum*’, a phytoplasma associated with purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and evolutionary y Microbiology* 56, 1593-1597.
- Leme de Lima Dias, M. C., and Rego-Barros, A. S.** 1995. Avaliação da qualidade de sementes de milho. Circular N° 88. Instituto Agronômico de Paraná, Londrina – Paraná, Brasil. pp. 43.
- Lewin, B.** 2008. *Genes IX*. 9ª ed. McGraw-Hill. 57p
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., and Clover, G. R. G.** 2009. A new “*Candidatus Liberibacter*” species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis*. 93: 208-214.

- López, M. L.** 2003 Serie Científica Avanzada: El microscopio Electrónico. Centro de Extensión Biomédica Facultad de Medicina Universidad de Chile.
- Luc, M., Sikora, R., and Bridge, J.** 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd ed. UK. CABI Publising.
- Maroto-Borrego, J. V.** 1995. "Horticultura herbácea especial". Ediciones Mundi-prensa. Madrid. 400; pp.402- 407.
- Martini, M., Lee, I. M., Brottner, K. D., Zhao, Y., Bottis, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marccone, C and Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene based phylogeny for finer differentiation and clasification of phytoplasmas International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology. 57, 2037- 2051.
- Mas-Coma, S.** 1999. Los espaciadores transcritos internos (ITSs) del ADN ribosomal como marcadores en sistemática, ecología, evolución y filogenia de parásitos y vectores. Abstracts XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. pp. 5-6.
- Montes, H., Heredia, G y Aguirre, G.** 2004. Fenología del cultivo de chile (*Capsicum annum* L). In: Primera Convención Mundial de chile. León Guanajuato, México. 27 al 29 de Junio de 2004. Consejo Nacional de Productores de Chile. Pp. 43-48.
- Morales, C.N. y González, N.** 2005. Competitividad de la páprika peruana y el chile guajillo zacatecano. Serie Estudios económicos de cadenas productivas. Sistema- Producto Chile. No. 1. Secretaría de Desarrollo Agropecuario- Universidad Autónoma Chapingo. Zacatecas, México.
- Moreno, M. E.** 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 382.
- Neergaard, P.** 1979. Seed Pathology. Vol. I y II. Revised edition. Mac Millan Press Ltda. Gran Bretaña. 1025 pp.

- Nuez, F., Gil, R., and Costa, J.** 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Nuez, F., Gil, R., and Costa, J.** 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona España. 661p.
- Ochoa, A. N.** 2001. Usos y propiedades del chile habanero. Seminario del chile habanero. Memorias. Fundación produce Yucatán. SAGARPA.INIFAP. Mérida Yucatán. 2-5 p
- Okayama, H., and Berg, P.** 1982. High - efficiency cloning of full length cDNA. Mol. Cell Biol. 2, 161-170.
- Orellana-Benavides, F., José, E. B., Aura, M. B., Irma. M. S., Rafael, C. V., Manuel C. H.** 2000. El cultivo de chile dulce. Guía técnica. Centro Nacional de tecnología agropecuaria y forestal. San Salvador. El Salvador. pp 9 – 19.
- Pickersgill, B.** 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). Evolution 25:683-691.
- Pozo, C.** 2002. Current status of pepper production and research in Mexico. In: Proceedings of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, México. 10 al 12 de noviembre de 2002. Consejo Nacional de Productores de chile. Pp.34.
- Reyes, R.E. Bravo, L., Salinas. G y Padilla, B.** 2006. Rentabilidad del chile seco en Zacatecas, México. Revista Fitotecnia Mexicana 29: 137-144.
- Rodríguez-del Bosque, L. A., Ramírez-Meraz, M., y Pozo-Campodónico, O.** 2004. Tecnología de producción de chile piquín en el noroeste de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agronómicas y Pecuarias (INIFAP), Tamaulipas, México, pp. 01-33.
- SAGARPA.** 2012. (Secretaría de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989.** In Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1,2,3.
- SIAP.** 2012. (Servicio de información agroalimentaria y pesquera) www.siap.gob.mx. Consultado el 09 de Febrero del 2013.
- SIAP.** 2010. (Servicio de información agroalimentaria y pesquera) www.siap.gob.mx. Consultado el 30 de Enero del 2012.
- Sherf, A. F., and Macnab, A. A.** 1986. Vegetables diseases and their control. Second Ed. John Wiley and Sons. USA. pp: 728.
- Swofford, D. L.** 1996. PAUP 3.1.1: Phylogenetic analysis using parsimony. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, E.U.

CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO

3.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la manera más adecuada de reconstruir filogenias es, utilizar datos de secuencia de nucleótidos o aminoácidos analizados a través de métodos de inferencia estadísticos. En el momento que dos especies divergen a partir de un ancestro común, las secuencias de genes ortólogos acumulan mutaciones con el tiempo, lo cual permite reconstruir árboles filogenéticos. Asumiendo que cada posición de un alineamiento es independiente, es posible reconstruir relaciones filogenéticas en base a miles de caracteres. Ello permite afrontar la reconstrucción de un árbol en un entorno estadístico (con métodos de máxima verosimilitud o bayesianos) (Holder and Lewis, 2003).

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés (Simpson, 1997).

El rDNA puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo. Contiene la información para el RNA que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El rDNA se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rDNA, 5.8 rDNA y 28 rDNA), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2).

Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente. Estas secuencias, por la baja tasa de sustitución que presentan, son extremadamente útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas de taxa con tiempos de divergencia muy antiguos (Hills et al., 1991).

La amplificación de los 16S rDNA se realiza por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés, empleando oligonucleótidos o iniciadores específicos. Esto se realiza para amplificar los 16S rDNA de bacterias u otros grupos como arqueobacterias. En el caso de organismos eucariontes, se emplean las secuencias 18S rDNA (Baker *et al.*, 2003). Los productos 16S rDNA se pueden clonar en vectores o plásmidos. Dichos vectores son transferidos a bacterias huésped como *Escherichia coli*, para crear bibliotecas o bancos de clonas, conteniendo las secuencias 16S rDNA de diversos microorganismos de forma separada. Esto permite el análisis individual de cada una de las secuencias clonadas utilizando diversos métodos, tales como secuenciación. (Escalante-Lozada *et al.*, 2004).

De esta manera, miles de secuencias de 16S rDNA de diversos microorganismos, cultivables y no cultivables, son reportadas a las bases de datos como el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Asimismo, se ha informado el descubrimiento de nuevos grupos taxonómicos a través de los 16S rDNA usando la amplificación de secuencias de organismos no cultivables (Hugenholtz-Pace, 1996; Huber *et al.*, 2002).

En la actualidad existen una gran variedad de métodos para determinar el estado sanitario de un lote de semillas, estos análisis se denominan Ensayos de Sanidad de semillas y se encuentran normalizados y estandarizados por las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2011).

El objetivo del presente trabajo fue identificar a los microorganismos presentes en la semilla de chile jalapeño Ixtapa mediante la amplificación y clonación de los genes ribosomales para poder aportar conocimiento a la problemática que presenta actualmente el cultivo.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de dos variedades de chile jalapeño, híbrido IXTAPA (X3R) procedente de Tailandia, Híbrido IXTAPA H53 y chile jalapeño IXTAPA originarias de México. Las semillas de las dos variedades se lavan por 5 min en agua corriente, posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 20 min, y se enjuagaron con agua destilada estéril cinco veces y secadas en papel filtro.

3.2.2. Análisis molecular

3.2.2.1. Extracción de DNA de la semilla

La extracción de DNA se realizó con una muestra de 100 semillas completas, las muestras se molieron hasta polvo fino con mortero y pistilo, usando nitrógeno líquido. Se utilizó CTAB 2% (Tris- HCl 100mM pH 8.0; EDTA 2H₂O mM, CTAB 2%; NaCl 1.4 M). Se colocaron tubos con el buffer precalentado a 60 °C. Se agregó el tejido molido, se mezcló vigorosamente y se incubó a 60° por una hora, mezclando con vortex cada 10 min. Posteriormente se le agregó a cada tubo 500 µL de cloroformo – alcohol isoamilico (24:1 v/v) y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 x g por 10 min, para formar la fase acuosa y la fase orgánica; se recuperan aproximadamente 600 µL de la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. Posteriormente se colocaron 500 µL de isopropanol frío, se mezcló suavemente para favorecer la precipitación, y se incubó a -20 °C por toda la noche. Se centrifugó a 10 000 x g por 30min, a continuación se le agregó 500 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla; se centrifugó a 10 000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y los tubos se secaron a temperatura ambiente por 2 h, finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua libre de

nucleasas. La calidad y la concentración del DNA se verificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA), los valores de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} fueron iguales o ligeramente superior a 2.

3.2.2.2 Amplificación de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA

Para amplificar el 16S rDNA se usaron los iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTACGACTT3'). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: buffer 5X: 5 μ L, dNTP's (2.5 mM):1.0 μ L, iniciadores (8F-1492R) 10 pm: 0.3 μ L, Taq DNA polimerasa (5U):0.3 μ L, DNA (100 ng). La PCR se llevó a cabo en un termociclador (BIO-RAD C100 Touch, USA); con las siguientes condiciones respectivamente: con una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 50 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por dos min; con una extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (Biotim, USA). El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT Affymetrix® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3130® (Applied Biosystem®, USA).

3.2.2.3 Amplificación del Espacio Transcrito Interno ITS

Para amplificar la región ITS se usaron los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC), ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) que reconocen las regiones que codifican para los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S y 28S que son altamente conservados y que se encuentran unidos internamente. Para la purificación de productos de PCR se utilizó el kit Wizard SV and PCR Clean-up System de Promega. También, USB® ExoSAP-IT® PCR CleanUp, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.2.4 Clonación de los fragmentos amplificados con 16S rDNA e ITS

La clonación se realizó siguiendo el protocolo del vector de clonación comercial pGEM®-T Easy (Promega, USA). La extracción de DNA de clonas se realizó con solución de lisis desarrollado por el laboratorio de Biotecnología de Semillas.

Las amplificaciones se realizaron con los iniciadores universales M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13R (5'-GCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'), estos incluyen parte del vector y el fragmento de interés. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: La mezcla de reacción para PCR fue preparada en un volumen total de 25 µL conteniendo 1X of *Taq* DNA buffer, 2.5 mM de dNTP's, 10 pM de cada iniciadores, 1.5 Unidades de *Taq*-DNA polimerasa y 100 ng de DNA.

Los parámetros para los ciclos de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial de 94 °C por 4 min, seguida por 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y finalmente una extensión final de 72 °C por 10 min.

3.2.2.5 Secuenciación de los productos clonados usando M13F/M13R

Los productos de PCR clonados se limpiaron con la enzima ExoSAP-IT para secuenciar el inserto, la reacción de secuenciación se llevó a cabo con el Big Dye Terminator V.3.7 de Applied biosystems. La cantidad de Producto de PCR purificado para secuenciación, fue según lo especificado por el protocolo del kit.

Las condiciones de secuenciación fueron las siguientes: La mezcla de reacción para secuenciación fue preparada en un volumen total de 20 µL conteniendo 4.0 µL (2.5 X) de Ready Reaction Premix, 2.0 µL (5X) de BigDye Sequencing Buffer, 4 pM de cada iniciadores y 2.0 µL de DNA templado.

Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial de 95 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s y 60 °C por 4 min.

3.2.2.6 Análisis filogenético con el método de Máxima parsimonia

Las secuencias correspondientes a la región de 16S rDNA se ensamblaron y editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1, para la creación de las secuencias consenso de cada clona. Desde que Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) encuentra regiones de similitud local entre secuencias con alineamientos significantes, las secuencias consenso de cada aislamiento obtenido para la región 16S rDNA, se compararon con la opción BLAST_ nucleotide 2.2.19 y depositadas en el GenBank del NCBI. El análisis evolutivo, de todas las secuencias consenso fueron compiladas dentro de un archivo con formato FASTA y alineadas usando el ClustalW 1.8.1, incluido en el Software MEGA 5.0.2. con el método de máxima parsimonia.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Amplificación de los genes ribosomales

3.3.1.1 Amplificación de 16S rDNA

Los productos de PCR amplificados con 16S rDNA para organismos procariones resultaron positivas amplificando una banda del tamaño esperado de 1500 pares de bases (bp) con los iniciadores 8F/1492R (Fig. 3). El resultado del BLAST en comparación con otras secuencias en el GenBank dieron como resultado Unculture bacterium clone, corresponde a bacterias no cultivadas, por lo que se clonaron los productos de PCR para poder separar el mayor número de copias del DNA de interés.

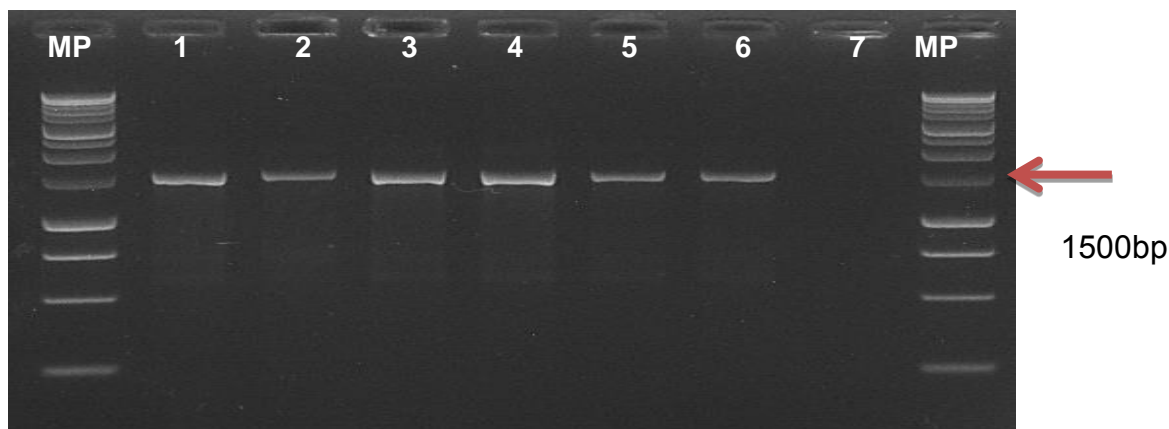


Figura 3. Producto de amplificación obtenido por PCR, utilizando los iniciadores 8F/1492R de la región rDNA 16S. M: Marcador de peso molecular, 1, 2, 3, 4, 5,6 : Semilla completa, 7 (+): Control negativo.

3.3.1.2 Amplificación de Espacio Trascrito Interno (ITS)

Para los productos de PCR amplificados para la región ITS (Fig. 4), resultaron positivos con una banda de aproximadamente 720 bp (Fig. 6).

Los resultados del BLAST para los productos de ITS5/ITS4 los resultados fueron Fungal sp., y para ITS1/ITS4 fue Uncultured *Epicoccum* clone.

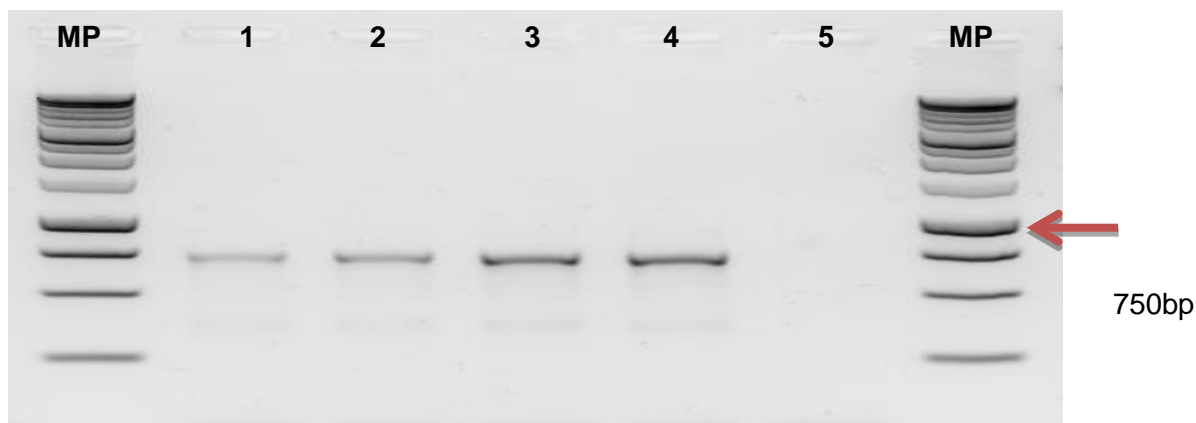


Figura 4. Producto de amplificación obtenido por PCR, utilizando los iniciadores 1,2: ITS1/ITS4 semilla completa, 3,4 ITS5/ITS4 semilla completa. M: Marcador de peso molecular 1KB; 5: Control negativo (-).

3.3.2 Clonación de los productos amplificados

En este proceso se obtuvieron las transformantes esperadas, se observaron colonias de color blanco lechoso, ya que las células que llevan el DNA recombinante crecieron en medio con ampicilina, el vector incluye este gen marcado (gen de resistencia a antibiótico), esto permitió la selección de las células que deberían llevar el DNA requerido. Las clonas que teóricamente no llevan el DNA recombinante aparecieron de color azul, debido a la presencia de la enzima β -galactosidasa (gen *lacZ* de *Escherichia coli*) que transforma el sustrato sintético X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-3-indolil- β -D-galactopirranósico) en un producto de color azul (Fig. 5).

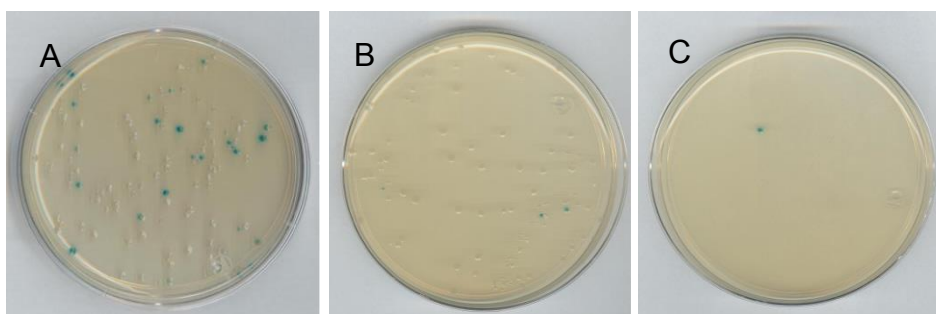


Figura 5. Producto de clonación: A) clonas blancas con DNA recombinante y azules sin inserto, B) control positivo, C) control negativo.

El DNA extraído se amplificó con los iniciadores universales M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13R (5'-GCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'), estos incluyen parte del vector y el fragmento de interés (Fig. 6). La amplificación de diferentes tamaños de fragmentos es debido a que se encuentra el DNA de la semilla y de diferentes microorganismos, ya que el DNA original fue extraído directamente de la semilla.

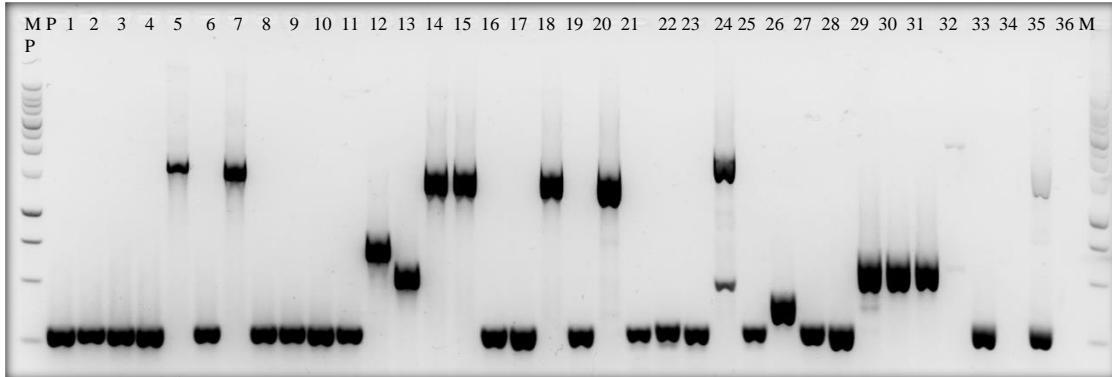


Figura 6. Amplificación de DNA de clonas con los iniciadores universales M13-F y M13-R M: Marcador de peso molecular, 5, 7, 14, 15, 18, 20, 24, 35: clonas positivas del fragmento esperado.

3.3.3 Secuenciación y análisis filogenético

Las secuencias se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso, esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19. Identificando como el patógeno asociado a *Candidatus Liberibacter solanacearum* con un 98% de máxima identidad. Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los números de acceso KC771216, KC771217, KC771218. Con estas secuencias se realizó el análisis filogenético entre diferentes secuencias depositadas de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. En el árbol filogenético podemos observar que las secuencias son muy similares a secuencias depositadas de *Ca. L. solanacearum* en papa, tomate, y del psilido (Fig. 7).

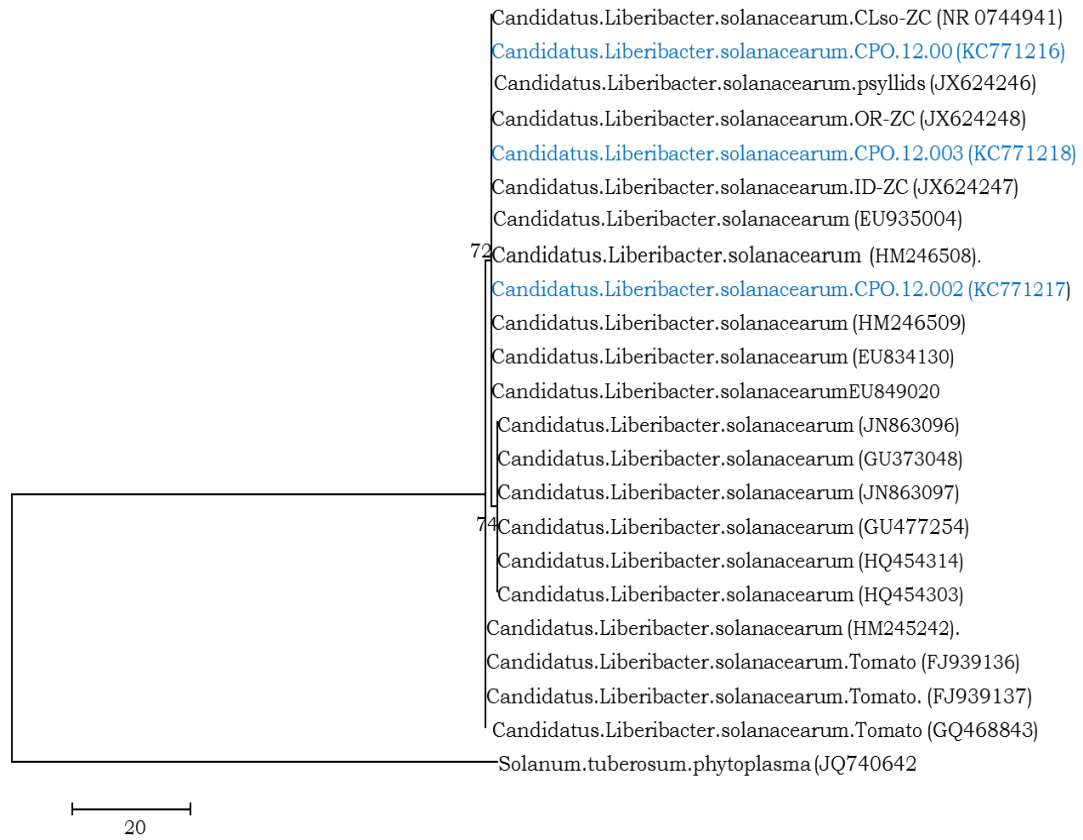


Figura 7. Árbol filogenético de la región 16S rDNA de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* y *Solanum tuberosum* phytoplasma usada como raíz.

3.3 CONCLUSIÓN

El análisis molecular que se realizó con la región 16S rDNA y clonación, es recomendada para este grupo de bacterias difíciles de cultivar y para laboratorios cuyas detecciones están basadas principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación y secuenciación, esta metodología permitió la identificación de *Ca. Liberibacter solanacearum* con un 98% de máxima identidad en las semillas de chile jalapeño.

3.5 LITERATURA CITADA

- Baker, G. C, Smith, J. J, Cowan, D. A.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55:541–555.
- Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez, A. y Bolívar-Zapata, F.** 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 38: 583-592.
- Hillis, D. M., and Dixon, M. T.** 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Holder, M. T., and Lewis P. O.** 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics*: 4, 275-284.
- Huber, J. A., Butterfield, D. A., and Baross, J. A.** 2002. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1585-1594.
- Hugenholtz, P., and Pace, N. R.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* 14: 190-197.
- Simpson, J.** 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60: 73-76.

CAPÍTULO IV. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES

4.1 INTRODUCCIÓN

Secuencias de rRNA y en especial el 16S rRNA representan el marcador más importantes para el estudio de la evolución bacteriana y ecología, incluyendo la determinación de las relaciones filogenéticas entre los taxones, la exploración de la diversidad bacteriana en el medio ambiente y la cuantificación de la abundancia relativa de los taxones desde una cepa hasta varias taxas (Hugenholtz et al., 1998; Daubin et al., 2002; Wolf et al., 2001).

Este gen se encuentra distribuido universalmente en los organismos vivos, permitiendo el análisis de las relaciones filogenéticas entre taxas distantes. Como parte indispensable del conjunto de genes del núcleo, se espera que el gen 16S rRNA sea muy poco afectado por la transferencia horizontal de genes (Daubin et al., 2003), esta característica permite su uso para estudios filogenéticos. A pesar de esta característica el 16S rRNA está siendo objeto de variación, en particular en ciertas regiones variables, estas regiones variables permiten realizar el diseño de iniciadores de PCR adecuados o de sondas de hibridación para la identificación de varias taxa en diferentes niveles taxonómicos (Head et al., 1998). A pesar de la amplia utilización del 16S rRNA, hay varios aspectos que limitan la interpretación de los resultados, el más importante es que es un gen multicopia y que el número de copias puede ser de 15 o más (Klappenbach et al., 2001). El número de copias parece ser un taxón-específico hasta cierto punto, pero se ha reportado también variación entre las cepas de la misma especie (Acinas et al., 2004). Los números de copias de rRNA se han puesto en el contexto de la estrategia de vida de las

bacterias debido a que el número de copias de rRNA de algunos taxones están correlacionadas con su capacidad para responder a las condiciones de crecimiento favorable (Eichorst et al., 2007). Se supone que las copias de los genes rRNA dentro de un organismo son sujeto a la homogeneización a través de la conversión de genes [Hashimoto et al., 2003]. Sin embargo, secuencias de 16S rRNA de la misma especie o incluso el mismo genoma son frecuentemente diferentes. Por consiguiente, la cantidad de variación del 16S rRNA se estimó en 2,5 veces mayor que el número de especies bacterianas (Acinas et al., 2004), y actualmente se pueden observar secuencias muy disímiles en la base de Datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Uno de las alternativas para reducir el efecto de los genes ribosomales multicopia es la utilización de los Multilocus Sequences Typing (MLST) técnica que se basa en las variaciones de la secuencia de al menos siete genes housekeeping con una sola copia (Maiden et al., 1998), los índices de variación de las secuencias en estos loci proporcionan un medio para identificar de manera confiable las relaciones entre los organismos relacionados, y se han sugerido como una base para un nuevo enfoque en la identificación de especies microbianas (Gevers et al., 2005). Sin embargo, los protocolos de MLST son relativamente caros principalmente debido al laborioso proceso de secuenciación del DNA por la tecnología de Sanger, que es actualmente la tecnología de secuenciación más utilizada. Además no siempre proporcionan suficiente resolución entre bacterias estrechamente relacionadas (Achtman, 2008) en muchos casos cada esquema de MLST tiene que ser desarrollado para un grupo particular de bacterias relacionadas.

No obstante, la secuenciación del gen de una sola copia *SecY* ha sido revalorado para su uso en filogenia, se encuentra presenta tanto en bacterias Gram negativas, Gram positivas y fitoplasmas (Lee et al., 2006). Este gen se

encuentra situado en la parte distal del operador del operón *spc* para las proteínas ribosomales, codifica para la proteína translocasa subunidad *secY*. El gen *secY* es uno de los más variables entre los marcadores filogenéticos usados para la diferenciación de cepas de fitoplasmas, se encontró que este gen es más eficaz que otros marcadores para la diferenciación y clasificación de bacterias y fitoplasmas, especialmente para encontrar cepas estrechamente relacionadas dentro del gen 16S rDNA (Lee et al., 2006).

Por lo que el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de bacterias Gram negativas o Gram positivas en la semilla de chile jalapeño cv. Ixtapa mediante el uso del gen *secY*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Amplificación con los iniciadores *SecYF/SecYR* para bacterias Gram positivas

Para la identificación de bacterias Gram positivas se usaron los iniciadores *SecYF* (5'-CGGGATCCCGTACAGCTCGCTTCTGAAAT-3') y *SecYR* (5'-CCAAGCTTGGCTATTTGTATCAGCCGAACC-3') que amplifican un fragmento 1500 bp localizado en la membrana plasmática (Fig. 8.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 µL de buffer 5X, 1.0 µL de dNTP's (2.5 mM), 2.0 µL de cada iniciador (10 pM), 0.4 µL de *Taq* DNA polimerasa (5U), 5 µL de DNA (20 ng). La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD C200 Touch, Thermal Cycle; con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 65 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 60 s; con una extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ a 110 volts finalmente se visualizó las bandas con un fotodocumentador. El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.2.2 Amplificación con los iniciadores *EcsecYf/EcsecYr* para bacterias Gram negativas

Para la identificación de bacterias Gram negativas se usaron los iniciadores *EcsecYf* (5'-CCTCGGCCGTAGCCTTTCAGGTT-3') y *EcsecYr* (5'-GCCGCTAAACAACCGGGATTAGA-3') que amplifican un fragmento 1500 bp (Fig. 8). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 65 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 60 s; con una

extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ a 110 volts finalmente se visualizó las bandas con un fotodocumentador. El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

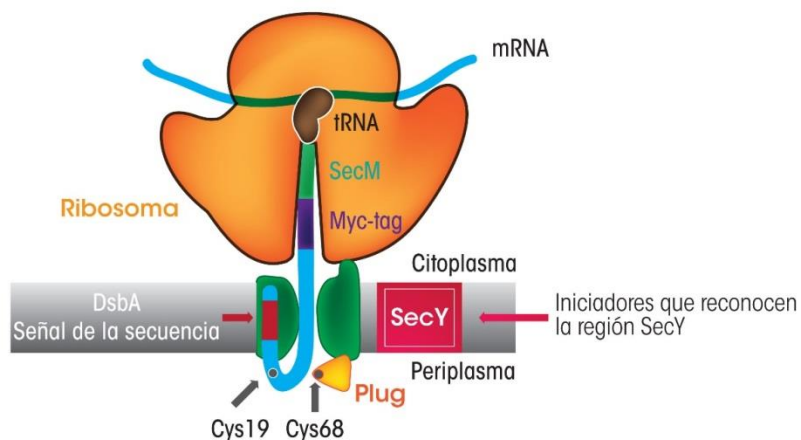


Figura 8. Esquema que representa la ubicación de la proteína de canal transmembranal SecY presente en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

4.2.3 Clonación, secuenciación y análisis filogenético

Las reacciones se realizaron como se mencionan en los puntos 3.2.2.4, 3.2.2.5 y 3.2.2.6 del Capítulo III.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Productos de la amplificación con los iniciadores *EcSecY* y *SecY*

Con la PCR se pudo visualizar la amplificación de los genes *EcSecY* para bacterias Gram (-) con un tamaño de 1500 bp (Fig. 9A). Para los iniciadores *SecY* no se obtuvo amplificación, lo que nos indica que la bacteria presente en las semillas de chile jalapeño cv Ixtapa X3R procedente de Tailandia corresponden al grupo de bacterias Gram negativad (Fig. 9B).

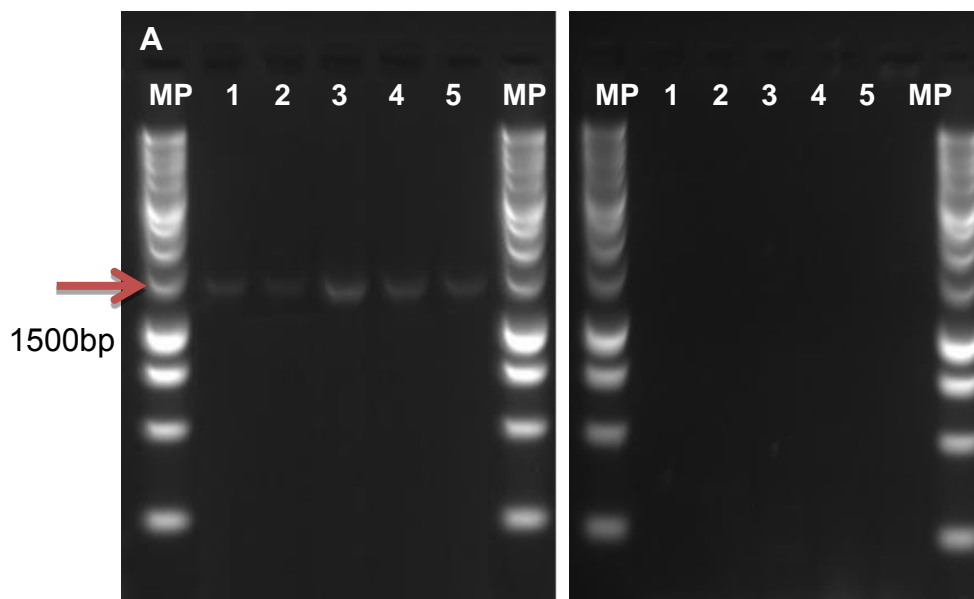


Figura 9. Producto de la amplificación del DNA de semillas de chile jalapeño. A: Amplificación con los iniciadores *EcSecY* para Gram (-) y B: amplificación con los iniciadores *SecY* para Gram (+), MP: marcador de peso molecular de 1Kb.

4.3.2 Análisis filogenético de los productos amplificados para *EcSecY*

La secuencia consenso, se comparó con las secuencias depositadas en el (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19. Encontrando como patógeno asociado a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, con una máxima identidad del 99%.

4.4 CONCLUSIONES

El uso de los genes *SecY* y *EcSecY* en el presente estudio resultó de gran utilidad por que claramente se pudo detectar al grupo de bacterias que se encuentran en el DNA obtenido de las semillas de chile jalapeño. Las amplificaciones positivas para bacterias Gram negativas y el resultado de la secuenciación permitió identificar a *Candidatus Liberibacter solanacearum*, un bacterium Gram negativo perteneciente a los rizobiales, con un 99% de máxima identidad. La consistencia entre los resultados de 16S rDNA y el uso de *EcSecY* fue evidente, por lo cual podemos decir que el uso de estos genes pueden servir como herramienta filogenética adicional para la diferenciación más fina de subgrupos dentro de un grupo de 16S rDNA.

4.5 LITERATURA CITADA

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M. F.** 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.* 186: 2629–2635.
- Daubin, V., Gouy, M., and Perriere, G.** 2002. A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: Evidence of a core of genes sharing a common history. *Genome Res.* 12:1080-1090.
- Daubin, V., Moran, N. A., and Ochman, H.** 2003. Phylogenetics and the cohesion of bacterial genomes. *Science* 301: 829–832.
- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., and Schmidt, T. M.** 2007. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the Phylum Acidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2708–2717.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., and Vandamme, P.** 2005. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 733–739.
- Hashimoto, J. Q., Stevenson, B. S., and Schmidt, T. M.** 2003. Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *J. Bacteriol.* 185: 966–972.
- Head, I. M., Saunders, J.R., and Pickup, R. W.** 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35: 1–21.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., and Pace, N. R.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765–4774.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., and Schmidt, T. M.** 2001. *rrndb*: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nuc. Acid. Res.* 29: 181–184.

- Lee, I. M., Zhao, Y., and Bottner, K. D.** 2006. *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cell Probes* 20: 87–91.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., and Zurth, K.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3140–3145.
- Park, E., and Rapoport, T. A.** 2012. Mechanisms of *sec61/secY*-mediated rotein translocation across membranes. *Ann. Rev. Biophysics* 41: 21-40.
- Větrovský, T., and Baldrian, P.** 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE* 8(2): e57923.
- Wolf, Y. I, Rogozin, I. B Grishin, N. V., Tatusov, R. L., and Koonin, E. V.** 2001. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC Evol. Biol.* 1:8.

CAPÍTULO V. DETECCIÓN DE *Candidatus Liberibacter Solanacearum* EN LA SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO POR MEDIO DE INICIADORES ESPECÍFICOS

5.1 INTRODUCCIÓN

Candidatus Liberibacter solanacearum (LSO) es una bacteria no cultivable, limitada al floema, que pertenece a la subdivisión α de la clase Proteobacteria, los miembros de esta clase son Gram negativos. Esta subdivisión es un grupo diverso de microorganismos que incluyen patógenos de plantas, simbiontes y patógenos humanos (Bové, 2006).

El nombre *Candidatus Liberibacter psyllauros* se considera que es sinónimo de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, porque la secuencia de 16S rDNA de *Ca. L. psyllauros* es idéntica a la secuencia de 16S rDNA de *Ca. L. solanacearum* asociado con ZC en los Estados Unidos y en Nueva Zelanda (Secor *et al.*, 2009). El nombre *Ca. L. solanacearum* se prefirió y se ha convertido en el nombre más ampliamente utilizado para el patógeno porque se publicó válidamente por (Liefting *et al.* 2008a) de acuerdo a las normas del Código de Nomenclatura de Bacterias (Secor *et al.*, 2009).

En el 2008 se detectó a *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso) afectando cultivos comerciales de jitomate y chile en Nueva Zelanda. (Liefting *et al.*, 2008b; y más tarde en el mismo año, la enfermedad se encontrará en plantas de papa, que mostraban síntomas de Zebra chip (ZC) en Auckland, Nueva Zelanda y en 2011, la enfermedad se encuentra en los campos de papa en Idaho, Oregón y Washington (Crosslin *et al.*, 2011). La incidencia y severidad fluctúa de año en año y la enfermedad ha causado pérdidas de millones dólares, por lo que no es raro que campos enteros queden abandonados (Munyaneza *et al.*, 2007a).

Munyanzeza *et al.* 2012. reportó la primera asociación conocida de LSO en un cultivo de zanahoria (*Daucus carota* L.) en Finlandia. En este caso, LSO parece ser transmitido por el psílido zanahoria (*Trioza apicalis* Förster), que es una plaga en el norte y centro de Europa. Este fue también el iniciadores informe de Lso fuera de Norte y Centro América y Nueva Zelanda (Munyanzeza *et al.*, 2010). En 2011 Lso se encuentra en las zanahorias en Suecia y Noruega (Munyanzeza *et al.* 2011a; Munyanzeza *et al.*, 2011b) y en 2012, se encuentra en zanahorias en las Islas Canarias relacionadas con *Bactericera trigonica* (Hodkinson) (Alfaro-Hernández *et al.*, 2012).

En enero de 2011 en invernaderos, Jocotitlán en el Estado de México, se encontró en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) con síntomas como retraso en el crecimiento, mosaico, hojas con amarillamiento y cloróticas, flores y frutos abortados, de tamaño reducido, síntomas similares a los exhibidos por las plantas infectadas por *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Liefting *et al.*, 2009).

Las encuestas sobre el insecto asociado como vector en los campos de papa afectadas con ZC en el suroeste de los Estados Unidos se encontró que *Bactericera cockerelli* fue la plaga más abundante y común (Goolsby *et al.*, 2007; Munyanzeza *et al.*, 2007a). Se ha demostrado que el psílido de la papa, *B. cockerelli* es el vector principal de la LSO, (Munyanzeza *et al.*, 2007a; Secor *et al.*, 2009; Sengoda *et al.*, 2010). La detección, identificación y clasificación de esta bacteria se basan principalmente en técnicas moleculares, con el uso de iniciadores específicos diseñados en la región de 16S rDNA de su genoma (Jagoueix *et al.*, 1997. Texeira *et al.*, 2005).

El objetivo de la presente investigación fue identificar si *Candidatus Liberibacter solanacearum* estaba presente en la semilla de chile jalapeño mediante el uso de iniciadores específicos para esta bacteria.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Análisis molecular con los iniciadores específicos

5.2.1.1 Amplificación con los iniciadores OA2/OI2c

Para la identificación de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (LSO) se usaron los iniciadores OA2 (5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3') y OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') diseñados a partir de la región 16S rDNA y que amplifican un fragmento 1168 bp (Liefiting *et al.*, 2008 and Liefiting *et al.*, 2009) (Fig. 9). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: buffer 5X: 5 µL, dNTP's (2.5 mM):1.0 µL, iniciadores (OA2-OI2c) 10 Pm: 0.5 µL, Taq polimerasa (5U):0.3 µL, DNA (100 ng). La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD C100 Touch, Thermal Cycle; con las siguientes condiciones respectivamente: con una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 65 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 60 s; con una extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ a 110 volts en un equipo Peltier Thermal Cycle PTC-0200 BIORAD y finalmente se visualizó con un fotodocumentador. El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT Affymetrix® de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.2.1.2 Amplificación con los iniciadores LsoF/OI2c

Para la identificación de *Ca. Liberibacter solanacearum* se usaron los iniciadores LsoF (5'-GTTCGAGCGCTTATTTTAAATAGGA-3') y OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') diseñados a partir de la región 16S rDNA y que amplifican un fragmento 1173 bp (Li *et al.*, 2009) (Fig. 10). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: buffer 5X: 5 µL, dNTP's (2.5 mM):1.0 µL, iniciadores (LsoF-OI2c) 10 Pm: 0.5 µL, Taq polimerasa (5U):0.3 µL,

DNA (100 ng). La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD C100 Touch, Thermal Cycle; con las siguientes condiciones respectivamente: con una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 62°C por 30 s y la extensión a 72 °C por 60 s; con una extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ a 110 volts en un equipo Peltier Thermal Cycle PTC-0200 BIORAD. y finalmente se visualizó con un fotodocumentador . El producto de PCR se purificó con ExoSAP-IT Affymetrix® de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

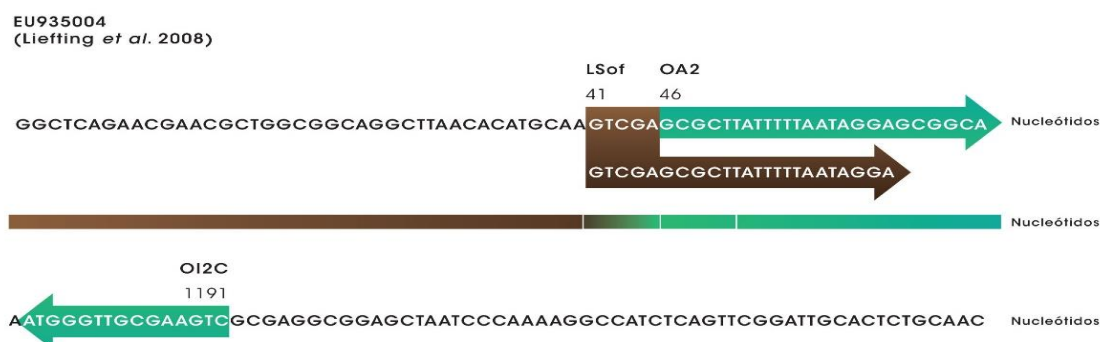


Figura 10. Diagrama de las posiciones en las que se anclan los iniciadores Lsof/OI2c y OA2/OI2c diseñados para reconocer *Candidatus Liberibacter solanacearum*

5.2.1.3 Secuenciación y análisis filogenético

Las condiciones de secuenciación fueron las siguientes: La mezcla de reacción para secuenciación se preparó en un volumen total de 20 µL conteniendo 4.0 µL (2.5 X) de Ready Reaction Premix, 2.0 µL (5X) de BigDye Sequencing Buffer, 4 pM de cada iniciadores y 2.0 µL de DNA templado. Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial de 95 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s y 60 °C por 4 min. La secuenciación se realizó en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3130® (Applied Biosystem®, USA).

Las secuencias correspondientes a la región de 16S rDNA se ensamblaron y editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1, para la creación de las secuencias consenso. La Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) encuentra regiones de similitud local entre secuencias con alineamientos significantes, las secuencias consenso de cada aislamiento obtenido para la región 16S rDNA, fueron comparadas con la opción BLAST_ nucleotide 2.2.19 y depositadas en el GenBank del NCBI. El análisis evolutivo, de todas las secuencias consenso fueron compiladas dentro de un archivo con formato FASTA y alineadas usando el ClustaW 1.8.1, incluido en el Software MEGA 5.0.2 (Tamura et al., 2011).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Productos de la amplificación con los iniciadores OA2/OI2c y LsoF/OI2c

Con la PCR se pudo visualizar la banda esperada con un tamaño de 1168 bp y 1173 bp para los iniciadores OA2/OI2c (Fig. 11) y LsoF/OI2c (Fig. 12) respectivamente, lo cual nos indica que las muestras son positivas para *Ca. Liberibacter solanacearum* en las semillas de chile jalapeño cv Ixtapa X3R procedente de Tailandia.

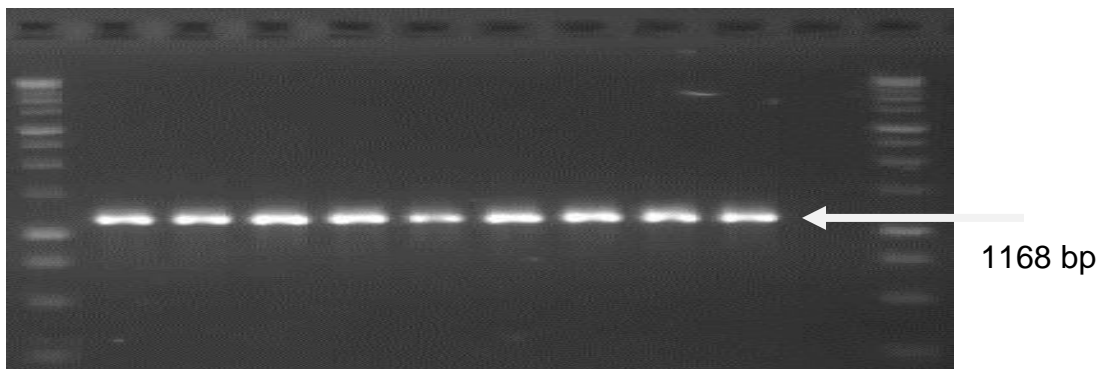


Figura 11. Producto de amplificación obtenido por PCR, utilizando los iniciadores OA2/OI2c. M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carriles: 1-9: DNA semilla; 10 (-): Control negativo.

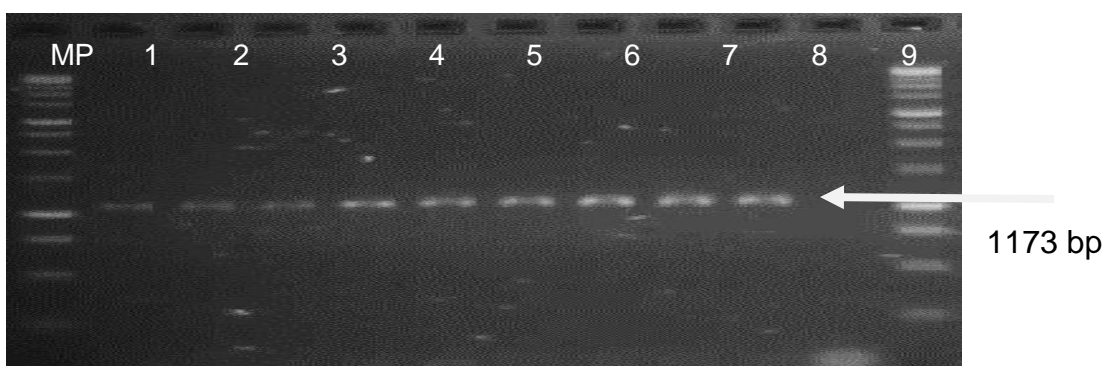


Figura 12. Producto de amplificación obtenido por PCR, utilizando los iniciadores LsoF/OI2c. Carriles: 1-9: DNA semilla, 10: Control negativo M: Marcador de peso molecular 1Kb.

Para poder corroborar la información obtenida con el iniciador par de iniciadores específicos se utilizó el iniciador LsoF resultando positivo por lo que estos resultados confirman la presencia de *Ca. liberibacter solanacearum* en la semilla de chile jalapeño cv Ixtapa.

5.3.2 Secuenciación

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5, con el cual se creó una secuencia consenso, esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19. Identificando como el patógeno asociado a *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Fig. 13), con una máxima identidad del 99%.con los iniciadores OA2/OI2c y con un 100% con los iniciadores LsoF/OI2c.

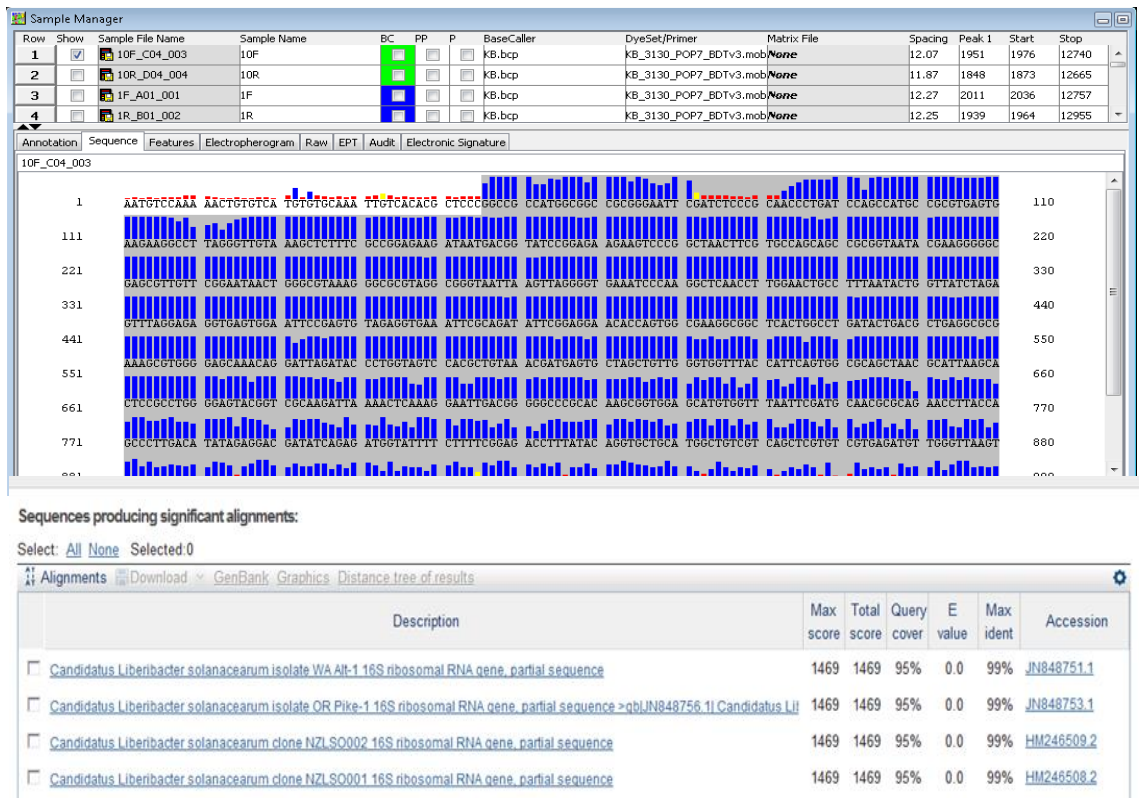


Figura 13. Análisis de las secuencias en el NCBI

5.3.3 Análisis filogenético

En el árbol filogenético (Fig. 14.) se observa que las secuencias obtenidas en este estudio son muy similares a las secuencias depositadas en GenBank para *Ca. Liberibacter solanacearum* obtenidas en apio, papa y ligeramente diferente al identificado en tomate.

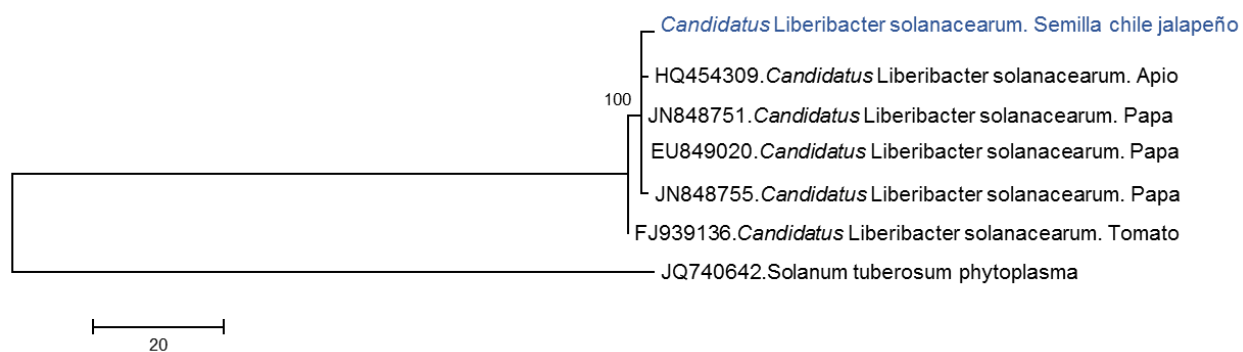


Figura 14. Árbol filogenético realizado con la amplificación de los primers LsoF/OI2c.

5.4 CONCLUSIONES

La amplificación, secuenciación y el análisis filogenético con los iniciadores específicos resultaron de gran importancia ya que con el análisis se obtuvo como patógeno asociado a *Ca. Liberibacter solanacearum* en un 99% de máxima identidad en la semilla de chile jalapeño Ixtapa.

5.5 LITERATURA CITADA

- Alfaro-Fernández, A., Siverio, F., Cebrian, C., Millaescusa, J. F., and Font, M. I. 2012.** 'Candidatus Liberibacter solanacearum' associated with *Bactericera trigonica* -affected carrots in the Canary Islands. *Plant Dis.* 96:582.
- Bové, J. M. 2006.** Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88: 7-37.
- Cavalier-Smith, T. 2002.** The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial mega classification. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52: 7-76.
- Crosslin, J. M., and Bester, G. 2009a.** First report of the 'Candidatus Liberibacter psyllaourous' in zebra chip symptomatic potatoes from California. *Plant Dis.* 93:551.
- Crosslin, J. M., and Munyaneza, J. E. 2009b.** Evidence that the zebra chip disease and the putative causal agent can be maintained in potatoes by grafting and *in vitro*. *Am. J. Pot. Res.* 86:183-187.
- Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P. R., Le Roux, H. F., and Bove, J. M. 2000.** Genomic characterization of a Liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of 'Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2119–2125.
- Goolsby, J., Bextine, B., Munyaneza, J. E., Setamou, M., Adamczyk, Jr., J. J. and Bester, G. 2007.** Seasonal abundance of sharpshooters, leafhoppers, and psyllids associated with potatoes affected by zebra chip disorder. *Subtropical Plant Sci.* 59: 15-23.
- Jagoueix, S., Bove, J.M., and Garnier, M, 1997.** Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of "Candidatus Liberobacter asiaticum" and

"*Candidatus Liberobacter africanum*," the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 224-7.

Li, W., Levy, L., Hartung, J. S., 2009. Quantitative distribution of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99, 139–144.

Liefting, L. W., Perez-Egusquiza, Z. C., Clover, G. R. G., and Anderson, J. A. D. 2008a. A new 'Candidatus *Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92: 1474.

Liefting, L. W., Ward, L. I., Shiller, J. B.M., and Clover, G. R. G. 2008b. A new 'Candidatus *Liberibacter*' species in *Solanum betaceum* (tamarillo) and *Physalis peruviana* (cape gooseberry) in New Zealand. *Plant Dis* 92: 1588.

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

Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., and Upton, J. E. 2007a. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip," a new potato disease in Southwestern United States and Mexico. *J. Econ. Entomol.* 100: 656-663.

Munyaneza, J. E., Fisher W. J., Sengoda, G. V., and Garczynski, F. 2010. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" associated with psyllid affected carrots in Europe. *Plant Dis.* 94: 639.

Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Stegmark, R., Arvidsson, A. K., Anderbrant, O., Yuvaraj, J. K., Ramert, B., and Nissinen, A. 2012. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" associated with psyllid-affected carrots in Sweden. *Plant Disease.* 3:96. pp.453.

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 Dis. 93: 574-583.

Sengoda, V. A., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Buchman, J. I., and Pappu, H. R. 2010. Phenotypic and etiological differences between psyllid yellows and zebra chip disease of potato. Am. J. Pot. Res. 87: 41-49.

Teixeira, D. C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., Inacio da Costa, P., Ayres, A. J. and Bové, J. 2005. '*Candidatus* Liberibacter americanus', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1857-1862.

CAPÍTULO VI

UBICACIÓN DE *Candidatus Liberibacter solanacearum* EN SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO A TRAVES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

6.1 INTRODUCCIÓN

El microscopio electrónico de barrido (MEB) es un instrumento para obtener fotografías tridimensionales debido a que tiene una alta resolución y una gran profundidad de campo. En las fotografías se puede apreciar la ultraestructura de muestras microscópicas detallando de manera extraordinaria, sus características morfológicas y topográficas. También se puede observar cualquier de materiales materiales organicos e inorgánicos (Hayat, 1981; López, 2003). El analizador del espectrómetro de dispersión de energía (EDS) es un instrumento que se ha desarrollado para el análisis de muestras a travez del MEB y que identifica la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos químicos que se encuentran presentes en la muestra, mostrando gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución. Es pertinente señalar que el analizador EDS de rayos X identifica y evalúa el contenido de elementos químicos desde el carbono al uranio en superficies planas o secciones finas de las muestras en todo tipo de material biológico e inerte (Pilleux, 2001).

En general, la preparación de las muestras es sencilla y los requisitos que deben cumplirse son: fijación, deshidratación y secado; además, la superficie debe ser conductora de la corriente eléctrica. (Dykstra, 1992). Existe una gran variedad de fijadores empleados en el tratamiento de las muestras destinadas al microscopio electrónico de barrido. Los más comunes son el glutaraldehído, el tetraóxido de osmio, una mezcla de glutaraldehído y una combina ción de glutaraldehído-tetraóxido de osmio. El fijador más empleado es el glutaraldehído en concentraciones del 1.5% a 6% (Brown and White, 1982).

Por medio de la deshidratación el agua de los tejidos vegetales se elimina, los deshidratantes más comunes son el alcohol, la acetona. se utiliza la concentración del alcohol gradualmente y disminuyendo el contenido de agua. Es te proceso no debe hacerse con lentitud porque se extraen algunos componentes celulares.

El secado por punto crítico introducido por Anderson en 1951 para microscopía electrónica de barrido, aprovecha el hecho de que en su punto crítico, un fluido pasa imperceptiblemente de líquido a gas sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión, es decir a ciertas temperatura y rangos de presión, un fluido se comporta como dos fases, discretas separados (líquido y vapor están en equilibrio). Por eliminación de tensiones superficiales en punto crítico se evitan los cambios superficiales de las estructuras biológicas durante la desecación ofreciendo finalmente el microscopio electrónico de barrido una imagen real de las mismas.

Para el recubrimiento de las muestras la emisión de electrones es una de las formas básicas del MEB para proporcionar una imagen tridimensional de las estructuras biológicas. Un haz de electrones desprendidos del filamento del tungsteno chocan con el objeto a analizar excitando cierto número de electrones secundarios de tal forma que origina una señal. Este fenómeno es posible gracias al recubrimiento que se le dá a la muestra biológica aplicando una finísima capa de metal para prevenir ó reducir el efecto de carga eléctrica, que ocasiona el haz de electrones sobre esa muestra. Este recubrimiento se hace al vacío con el recubridor de capa fina. Los metales más empleados son el oro, paladio, carbón o las combinaciones de ellos. El oro es de uso más generalizado debido a su fácil adquisición en forma pura o combinada, es fácilmente evaporado desde un filamento de tungsteno y tiene un alto coeficiente de emisión de electrones secundarios (Bozzola and Russel, 1992).

Durante la observación se deben tener en cuenta varios factores para lograr una imagen aceptable a la magnificación deseada; éstos son la distancia de trabajo (DT), el tamaño de la apertura de los lentes electrónicas finales (lentes objetivo), el tamaño del diámetro del haz de electrones (SS, spot size) y el voltaje de aceleración (kV). Antes de tratar las muestras se debe tomar en cuenta el material a ser observado y guiarse por los parámetros específicos para cada muestra (Dykstra, 1992).

Las semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) son miembros del subgrupo de tipo Solanoideae, el embrión está rodeado por una abundante capa de células del endospermo y por la testa (cubierta de la semilla). Los embriones son curvados y aplanados, las semillas son discoides, y tienen una estructura micropilar que se encuentra como tapa entre el endospermo y testa y cubre la punta de la radícula (Bozzola and Russel 1992).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la ubicación del *Ca. Liberibacter solanacearum* en la semilla chile jalapeño, a través de microscopía electrónica de barrido.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Selección del Material vegetal

Se utilizaron dos cvs. de chile jalapeño la primera es la Ixtapa X3R (Tailandia) y la segunda es Híbrido Ixtapa (México) segundo es el . Las semillas fueron seleccionadas y lavadas con agua corriente, posteriormente se sometieron a una limpieza con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, y finalmente se lavaron con agua destilada estéril, las semillas se colocaron en una caja de Petri y con la ayuda de un microscopio de luz se realizaron los cortes longitudinales con un volumen aproximado de 1mm para facilitar la penetración de los reactivos.

6.2.2 Fijación de la muestra

Las semillas se colocaron en frascos de vidrio estériles y se les agregó una solución de glutaraldehído al 2.5% más una solución de tetróxido de osmio al 4% por dos horas. Posteriormente se les realizó tres lavados de 5 min con una solución amortiguadora de fosfatos para eliminar los residuos de las soluciones de fijación.

6.2.3 Deshidratación de la muestra

Para la deshidratación las muestras se introdujeron en frascos de 5 mL con tapa; se comenzó agregando alcohol al 30% por 60 min, 40% por 40 min, 50% por 40 min, 60% por 40 min, 70% por 40 min, 80% por 40 min, 90% por 40 min, y por último se colocó en alcohol absoluto en tres tiempos de 20 min, 20 min y 10 min con cambio de alcohol cada uno posteriormente se llevan a secar.

6.2.4 Secado por punto crítico

Las muestras se colocaron en una secadora de punto crítico Samdri-780A® (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA); durante una hora para que el CO₂ líquido se sustituyera por el alcohol.

6.2.5 Montaje, recubrimiento y observación de las muestras

Las muestras se colocaron en un portamuestras y se recubrieron con la aleación oro-paladio en una desionizadora de metales JFC-1100® (JEOL LTD, Tokio, Japan).

Posteriormente se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido, MEB (JSM-6390, Jeol-Japan) con un micro analizador elemental de rayos X – EDS (INCAx-ACT, N2free high Speedy *sdd* detector, Oxford Instruments).

6.2.6 Extracción de DNA de la zona afectada

Para este procedimiento se seleccionó un lote de 100 semillas a las cuales se les realizó un corte para separar la parte del micrópilo del resto de la semilla. La extracción de DNA se realizó como se especifica en el punto 3.2.2.1 del Capítulo III.

6.2.7 Amplificación y secuenciación con los iniciadores OA2/OI2c y Lsof/OI2c

La amplificación para los iniciadores específicos se realizó como se describe en el punto 4.2.1.1 del Capítulo IV.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Micrografías de la semilla de chile jalapeño

Con la Microscopía Electrónica de Barrido se pudo observar la anatomía interna de la semilla de chile jalapeño donde se apreció perfectamente las estructuras tal como las describe (Watkins and Cantliffe, 1983) donde se puede apreciar la testa, el endospermo, los cotiledones, el embrión y la estructura micropilar (Fig. 15).

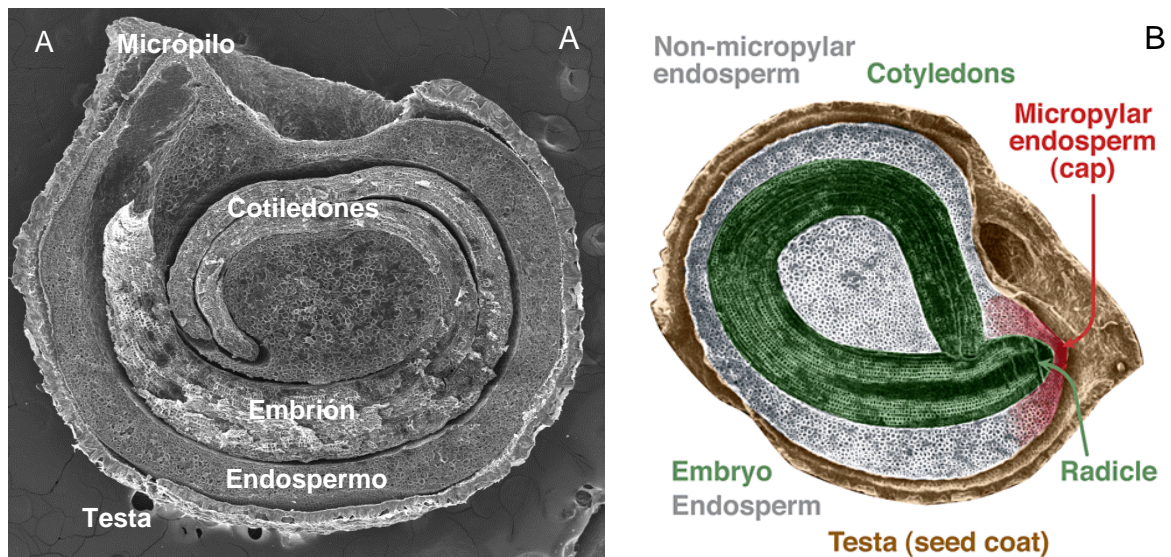


Figura 15. A: Microscopia electrónica de barrido de una semilla de chile jalapeño, tomada en la UME del Colegio de Postgraduados, B: imagen de semilla madura de *Capsicum annum* L. basada en una imagen de microscopia electrónica de barrido, publicada por (Finch and Leubner, 2006).

Al realizar la exploración de las muestras del cv Ixtapa X3R la MEB reveló la presencia de bacterias en la zona micropilar de la semilla (Fig. 16), esta zona es una abertura que dejan los tegumentos en los primordios seminales y por donde entra la mayor parte del agua y por donde el tubo polínico atraviesa y descarga su contenido.

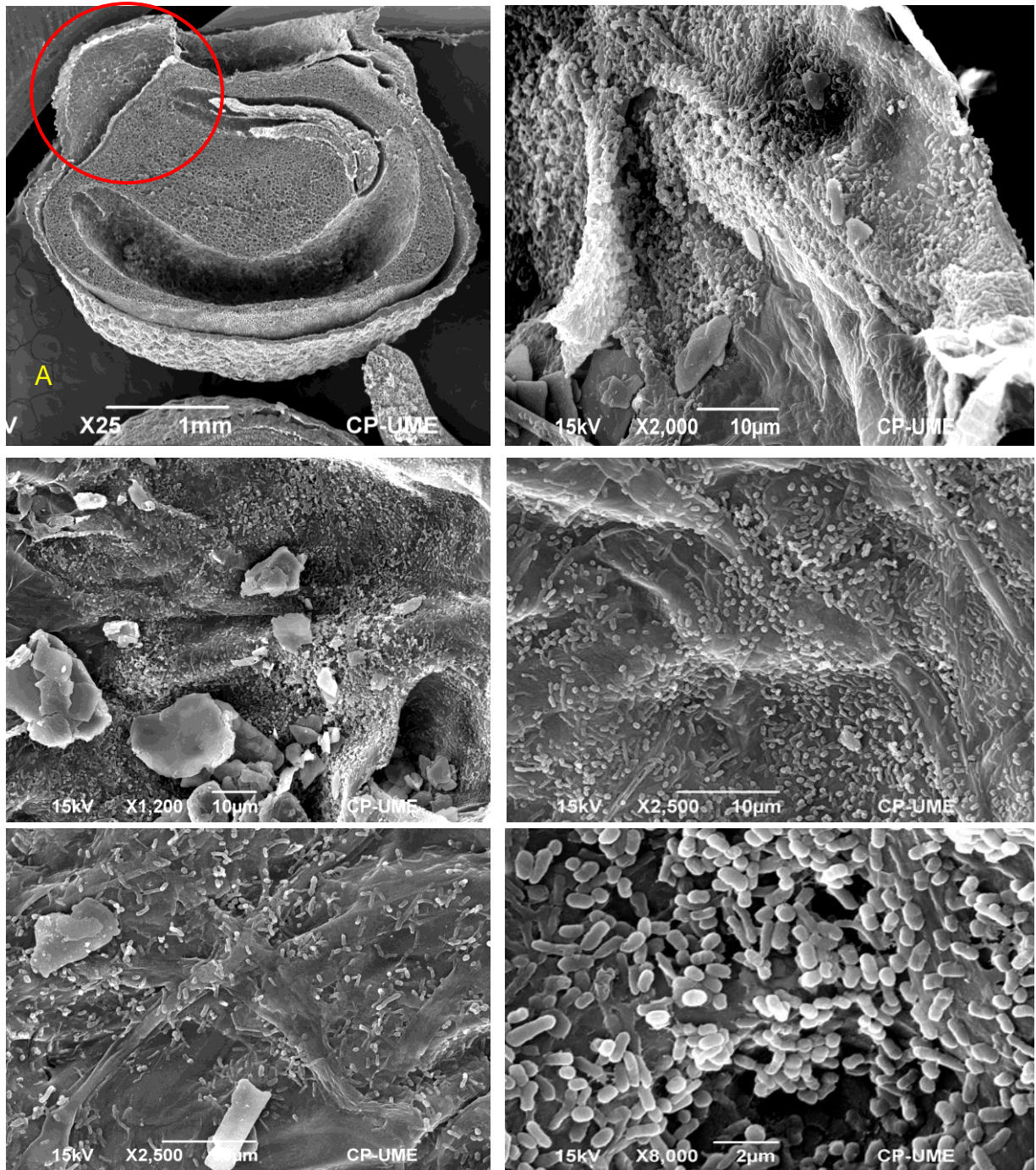


Figura 16. Bacterias encontradas con la técnica de Microscopía electrónica de barrido. A: semilla de chile jalapeño variedad Ixtapa X3R que señala la parte micropilar donde se pueden observar la presencia de bacterias. (1, 2, 3, 4).

La Microscopía Electrónica de Barrido mostró en las cuatro muestras analizadas de la semilla Ixtapa X3R que las bacterias se encontraban en la misma zona de la semilla, por lo anterior podemos decir que el micrópilo por la función que desempeña pudo ser la ruta de entrada para el patógeno, lo cual tiene relación con lo descrito por (Sinclair, 1989) que dice que la infección de la semilla puede ocurrir sistemáticamente a través del sistema vascular o indirectamente a través del micrópilo de la semilla y la infección puede ser por más de un proceso y afectar considerablemente a la semilla; con lo anterior podemos decir que la bacteria encontrada en esta zona puede resultar *Candidatus Liberibacter solanacearum*; ya que actualmente el cultivo está siendo afectado por este patógeno como lo reporta (Liefing et al, 2009).

Las bacterias encontradas en este estudio tienen una morfología en forma de varilla (Figura 15) Esta descripción coincide con lo mencionado por (Tanaka et al., 2007). Que dice que la morfología en forma de varilla se observó para *Candidatus Liberibacter americanus* asociado al sistema vascular (floema), con imágenes de Microscopía electrónica de barrido

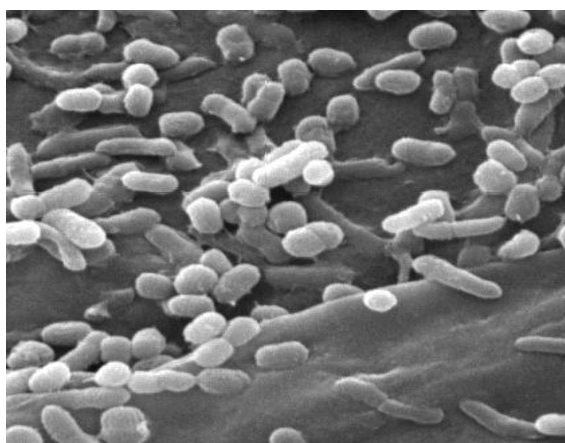


Figura17. Microscopía electrónica de barrido a: se observa la forma de varilla, en las bacterias encontradas en la semilla de chile jalapeño.

El análisis que se realizó a la semilla de chile jalapeño Híbrido Ixtapa utilizada como testigo; no mostro la presencia de ningún microorganismo.

6.3.2 Amplificación y secuenciación con los iniciadores OA2/O12c y LsoF/O12c

La prueba con los primers específicos para *Candidatus Liberibacter solanacearum* resultó ser positiva amplificando una banda del tamaño esperado para OA2/O12c de 1,168 bp y para LsoF/O12c de 1173bp (Fig. 18.). El resultado del BLAST en comparación con otras secuencias en el GenBank arrojó como patógeno asociado a *Candidatus Liberibacter solanacearum* con una Máxima identidad del 98%. Lo anterior confirma que las bacterias encontradas por medio de la MEB corresponden a *Ca. L. solanacearum*.

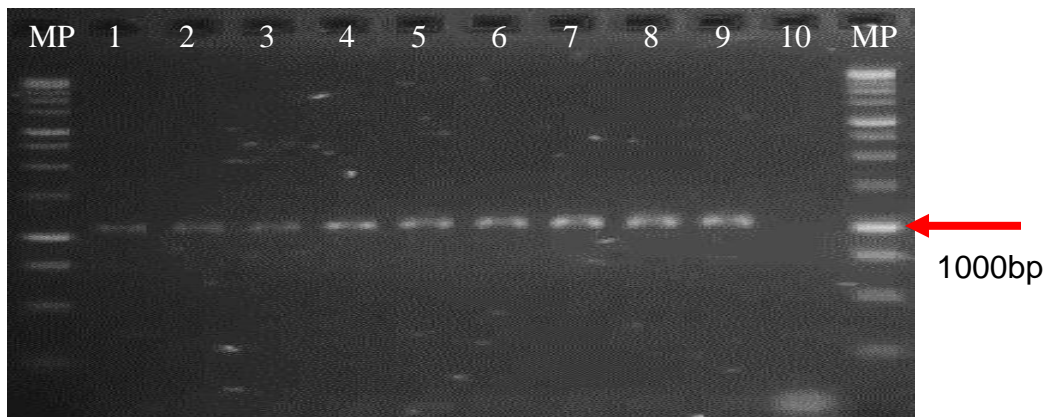


Figura.18. Producto de amplificación obtenido por PCR, con DNA del micrópilo de las semillas. Utilizando los iniciadores A) LsoF/O12c y B) OA2/O12c de la región rDNA 16S. M: Marcador de pares de bases; 1, 2, 3, para A y 4, 5, 6, 7, 8 para B del Micrópilo de la semilla 9 (+): Control positivo tomado de los resultados del Capítulo IV, 10: Control negativo (-).

>

6.4 CONCLUSIONES

Mediante el uso de la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se pudo observar la ubicación de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* dentro de la semilla, en una estructura que recibe el nombre de micrópilo; esta se pudo observar en diferentes aumentos y conocer sobre sus características morfológicas

5.5 LITERATURA CITADA

- Anderson, T.F.** 1951. Techniques for the preservation three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans. N.T. Acad. Sci., 13: 130-133.
- Bozzola J.J., Russel L.D.** 1992. Electron mycroscopy : Principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett publishers. USA. 519 p.
- Brown, M.F and White J.A.** 1982: Applications Scanning Electron Microscopy for Research m Plant Protection. Plant Disease vol. 66 No. 4.
- Dykstra, M.** 1992. Biological electron microscopy: theory, techniques and troubleshooting. Plenum Press.
- Hayat, M.** 1981. Fixation for electron microscopy, Academic Press
- López M. L.** 2003 Serie Científica Avanzada: El microscopio Electrónico. Centro de Extensión Biomédica Facultad de Medicina Universidad de Chile.
- Víctor Poblete P.M. Pilleux C.** 2001. Ciencia De Los Materiales “Microscopia Electrónica De Barrido” Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- Watkins, J.T. Cantliffe, D. J, and Huber, D. J.** 1983. The appearance of cell wall degrading enzymes during germination of Capsicum annum L. Physiol Plant 55: In press

CAPÍTULO VII

***Candidatus Liberibacter solanacearum* Y SU EFECTO EN LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA DE CHILE JALAPEÑO**

7.1 INTRODUCCIÓN

México es uno de los países más importantes en la producción de chile, este cultivo se encuentra distribuido en todo el mundo y de acuerdo al área sembrada y a los volúmenes de producción, que año tras año se incrementan, es actualmente una de las especias más importantes que condimentan los alimentos, se estima que una de cada cuatro personas lo consumen diariamente. El auge que tiene el chile en la alimentación, se debe en gran medida a la variedad de formas, usos y aromas que presenta. Para varios estados del país, el chile es el producto agrícola más importante desde el punto de vista económico y el impacto social que presenta, por la generación de empleos en el medio rural y la activación económica a otros sectores (Pozo-Campodomico, 2004).

Por lo anterior la calidad de la semilla es de gran importancia, es un estándar de excelencia en ciertas características o atributos que pueden determinar el funcionamiento de la semilla al momento de la siembra o en el almacenamiento, los componentes de la calidad de la semilla se pueden agregar en categorías, donde se menciona la descripción, la higiene y potencial de funcionamiento; en ese último, se toma en cuenta el vigor y el porcentaje de germinación (Hampton, 1995). La calidad de semilla es frecuentemente requerida para pronosticar la germinación uniforme bajo condiciones óptimas de suelo, temperatura y humedad, para lograr un mejor establecimiento temprano del cultivo (Cantliffe and Tigchelaar, 1980). Para lograr avances en la agricultura, se debe contar con insumos que contribuyan a este propósito; con semilla de alta calidad, la cual, para su obtención por parte de la industria

semillera, es necesaria una inmensa supervisión en las diferentes etapas de producción, así como contar con métodos adecuados para su evaluación.

El vigor es un concepto que describe varias características de las semillas como la velocidad y uniformidad de la germinación, crecimiento de la plántula, capacidad de emergencia de las plántulas bajo condiciones ambientales desfavorables. Las semillas que se comportan de manera favorable en estos aspectos se denominan de alto vigor (Black and Bewley, 2000; Copeland and McDonald, 2001).

Dado que el vigor con frecuencia se expresa mediante la germinación, el mecanismo de autoreparación después del deterioro tiene un efecto importante en el vigor de las semillas. Este mecanismo incluye la activación y reparación de membranas, órganos celulares, enzimas, DNA y RNA. Durante la imbibición y germinación de las semillas, la membrana recupera su funcionamiento normal para dar lugar a la emergencia de la plántula. Cuando el mecanismo de reparación no opera o se prolonga debido al drástico daño celular, la germinación no sucede o posiblemente ocurra después del tiempo establecido, con lo cual la semilla se identifica como bajo vigor (Sun *et al.*, 2007; Kapoor *et al.*, 2011).

Existen diferentes pruebas para evaluar el vigor de las semillas, las cuales consisten en someterlas a estrés (alta humedad, frío, calor, etc.) y posteriormente ponerlas a germinar. Dentro de las pruebas utilizadas está la de envejecimiento acelerado, la cual es de utilidad para predecir el deterioro de las semillas, ya que en esta prueba las semillas se exponen a alta temperatura (40-45 °C) y humedad relativa (75%-100%) (Black *et al.*, 2006).

La calidad fisiológica es la capacidad que tienen las semillas para germinar, emerger y dar origen a nuevas plantas que nacen uniformes y con fortaleza; pero la germinación de la semilla puede ser afectada antes de la siembra por

organismos patógenos, por ejemplo durante el manejo y almacenamiento, y es precisamente la germinación la manifestación fisiológica más aceptada para evaluar el deterioro de un lote de semilla (Camacho, 1994).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en la calidad fisiológica de la semilla de chile jalapeño para seleccionar variables significativas para su estudio; así como la valoración de los síntomas presentados en las plantas.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Semillas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados -Campus Montecillo, ubicado en el Municipio de Texcoco, Estado de México.

7.2.2 Material evaluado

Se utilizó semilla de chile jalapeño Ixtapa X3R de origen extranjero (Tailandia) proporcionada por el Sr. Joaquín Ocegueda productor de chile jalapeño y el Híbrido Ixtapa de origen nacional (México) proporcionado por el M. C. Moisés Ramírez M. del INIFAP del sur de Tamaulipas, El primer cultivar presenta problemas de crecimiento y deformación de frutos bajo condiciones de campo; el segundo se consideró como testigo ya que no presenta problemas en germinación y de vigor en campo.

7.2.3 Evaluación de la calidad fisiológica

Para evaluar la calidad fisiológica de los materiales en estudio, se registraron las variables que recomienda la ISTA (2012): Prueba de germinación estándar y la prueba de envejecimiento acelerado.

7.2.4 Diseño y unidad experimental

El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar, con dos repeticiones. La unidad experimental constó de 100 semillas para la prueba de germinación estándar y 200 para la prueba de envejecimiento acelerado.

7.2.5. Variables evaluadas

7.2.5.1 Porcentaje de germinación (PG): esta variable se obtuvo de la prueba de germinación estándar y se consideró el porcentaje de plántulas normales emergidas a los 14 días después de la siembra de las semillas. La prueba se llevó en cajas Petri dentro de un cuarto de germinación a 25 ± 1 °C, con luz constante, se colocaron 25 semillas por caja con una capa de papel filtro Whatman No. 2, se humedeció previamente con 4.5 mL de KNO_3 al 2 %.

6.2.5.2 Velocidad de germinación (VG)

Para esta variable se contabilizó diariamente el número de semillas germinadas una vez que emergió el coleóptilo; el conteo terminó cuando se estabilizó la emergencia. Con estos valores se calculó el índice de velocidad de germinación aplicando la ecuación propuesta por Maguire (1962).

6.2.5.3 Envejecimiento acelerado (EA): se realizó como prueba para determinar el vigor de las semillas, se empleó la metodología de Delouche (1996), la cual consiste en mantener las semillas a una temperatura de $40^\circ\text{C} \pm 1$ y 100% de humedad relativa por 24h. Se utilizaron cajas, a las que se le agregaron 60 mL de agua destilada y por arriba del nivel de esta se colocó una malla de alambre para evitar el contacto directo con el agua. En cada caja se depositaron 25 semillas con cuatro repeticiones cada una. Después del periodo de envejecimiento, las semillas se sembraron en charolas de arena para evaluar el porcentaje de germinación. La siembra en arena se realizó en charolas de 36 cm x 27 cm, en cada charola se trazaron 10 sucos y se sembraron 10 semillas por surco.

6.2.6 Análisis estadístico

Se efectuó un análisis de varianza para las variables evaluadas, previo al análisis, los datos de las variables medidas en porcentaje (PG y EA) se transformaron con la función arcoseno. Se realizó una comparación con la prueba de medias de Tukey, solo en las variables con diferencias significativas y altamente significativas ($\alpha=0.05$ y 0.01 , viz.). Se utilizó el paquete estadístico Statical Analysis System (SAS) versión 9.3 para Windows. También se realizaron graficas de los datos obtenidos para las cuatro variables (PG, VG-PG, EA y PG-EA) y con los dos tipos de semillas de las variedades de chile, las cuales se procesaron con la hoja de cálculo Microsoft Excel.

6.2.7 Evaluación de los síntomas en el chile jalapeño en condiciones de invernadero

Se establecieron 100 semillas de cada uno de los cvs (Hibrido Ixtapa e Ixtapa X3R en charolas de polipropileno de 200 pozos, el experimento se llevó a cabo en el invernadero ubicado en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México. Las semillas fueron lavadas y desinfestadas. Veinte días después las plántulas fueron trasplantadas en bolsas de 4 Kg, con riego cada 2 días y a una temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm$.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Evaluación de la calidad fisiológica

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias altamente significativas entre tratamientos con un nivel de confianza del 99% ($\alpha=0.01$), para las variables VG-PG, EA y PG-EA; mientras que para la variable PG solo se encontró significancia con un $\alpha=0.05$ (Cuadro 2).

Los porcentajes del coeficiente de variación fueron menores al 15% por lo que los resultados reflejan ser confiables, excepto para la variable PG (16.14%), lo que indica que existió variabilidad en su comportamiento con respecto a su promedio, González (2010) menciona que a mayor porcentaje de coeficiente de variación existe mayor variación entre tratamientos, en este caso se entiende que existe variación entre las dos variedades chile jalapeño para la variable PGE (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza para las variables utilizadas en la calidad fisiológica de semillas de chile jalapeño.

FV	GL	PGE	VG-PGE	EA	VG-EA
Tratamiento	3	0.082*	1.303**	0.334**	2.736**
Error	12	0.004	0.007	0.003	0.029
TOTAL	15				
C.V (%)		16.14	3.827	8.970	10.098
Promedio		0.436	2.292	0.611	1.711

** : Diferencias altamente significativas ($\alpha =0.01$); * : Diferencias significativas ($\alpha =0.05$); FV: Fuente de variación; GL: Grados de libertad; TRAT: Tratamientos (híbridos de chile); CV: Coeficiente de variación; PGE: Prueba de germinación estándar; VG-PGE: Velocidad de germinación en la prueba de germinación estándar; EA: Envejecimiento Acelerado; VG-EA: Velocidad de germinación en la prueba de envejecimiento acelerado.

Los resultados de comparación de medias, mostraron para PGE y VG-PG diferencias entre los cultivares Ixtapa y Ixtapa X3R, lo que implica que la semilla (Ixtapa X3R) presenta más bajo porcentaje de germinación con respecto Al Híbrido Ixtapa utilizada como testigo, esto se entiende debido al problema de patógenos con los que está afectada. Ya que pudiera estar afectando las membranas y las sustancias de reserva y se ve reflejado en la germinación y la emergencia de las plántulas; y por consecuencia su establecimiento en el campo

En las variable EA y VG-EA el comportamiento fue similar, en los dos genotipos, sin embargo en estas pruebas se incluyó un control para cada material vegetativo que no fue sometido a la prueba de envejecimiento acelerado y es fácil apreciar el efecto de esta prueba en el porcentaje y velocidad de germinación, ya que el vigor se reduce de la misma forma tanto en el testigo como en la semilla problema, con respecto a sus controles, lo que indica que los patógenos si afectan la semilla problema y fueron favorecidos con el tratamiento de envejecimiento acelerado (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de medias en tres variables que determinan la de calidad fisiológica de semillas de chile jalapeño.

VARIEDAD DE CHILE	PG	VG-PG	EA	VG-EA
Híbrido Ixtapa-control	94 a	3.06 a	91 a	2.72 a
Híbrido Ixtapa	92 a	2.92 a	75 b	1.88 b
Ixtapa (X3R)-control	66 b	1.59 b	65 c	1.51 c
Ixtapa (X3R)	68 b	1.60 b	30 d	0.72 d

PG: Porcentaje de germinación; VG-PG: Velocidad de germinación en la prueba de germinación estándar; EA: Envejecimiento Acelerado; VG-EA: Velocidad de germinación en la prueba de envejecimiento acelerado; a, b, ab, c y d: indican si existe diferencia en las variedades utilizadas para cada prueba.

La velocidad de germinación es una medida directa del vigor de las semillas. Puede definirse como el número de semillas emergidas por día (Golpayegani and Tilebeni, 2011). En la figura 17 se observa que el PGE de la variedad Híbrido Ixtapa fue de 93%; y para la prueba de EA (testigo) la variedad muestra el mismo comportamiento con 91%, y con envejecimiento muestra una disminución en el PGE de un 18% y 16% con respecto a las otras dos pruebas; para la variedad Ixtapa X3R se observa un 67% de PG y un 65% para la prueba de vigor sin envejecimiento y con envejecimiento observamos que la semilla fue susceptible al estrés ya que tuvo una disminución considerable en su germinación del 37% y 35% en comparación a las otras dos pruebas lo que podemos decir que las semilla con envejecimiento artificial, al respecto Chauhan et al. 2001 estudiaron el efecto del envejecimiento evaluando el nivel de enzimas en semillas de trigo y encontraron que en general, la disminución de la actividad enzimática en las semillas baja su potencial respiratorio,

disminuyendo a su vez la energía (ATP) y el suministro de reservas de las semillas para germinar.

Los resultados de la prueba de germinación pueden ser utilizados para clasificar los lotes de semilla por su vigor (Salinas *et al.*, 2001). Esta clasificación considera que los lotes de semilla envejecidos artificialmente que presenten un germinación superior a 80 % podrían ser clasificados como de alto vigor, entre 60-80 % como de vigor medio, y menores de 60 % como de bajo vigor. A partir de esta clasificación, en el presente estudio se puede inferir que la variedad Híbrido Ixtapa (testigo) con un porcentaje de germinación después del envejecimiento fue de 75% se considera semilla de vigor medio y la semilla de Ixtapa X3R después del envejecimiento fue de 30% lo cual la coloca en semilla de bajo vigor.

En la Fig. 17 se observa que la VG en la prueba de germinación para el Híbrido Ixtapa, fue en promedio de 3 plántulas emergidas por día; y en cuanto a la variedad Ixtapa X3R presentaron menor valor de VG con 1.6 plántulas emergidas por día. En condiciones de EA la VG para para Híbrido Ixtapa e Ixtapa X3R sin envejecimiento fueron de 2.7 y 1.5 plántulas emergidas por día y con envejecimiento fue de 1.5 y 0.72 plántulas por día lo que muestra que la segunda variedad tuvo alta sensibilidad a la prueba, provocando un deterioro en la semilla que puede relacionarse con estrés biótico ya que las semillas pueden ser afectadas en el proceso de germinación por patógenos que se encuentran en el suelo, o portados sobre o dentro de la misma semilla al respecto reporta (Duarte *et al.* 1986) los patógenos son un factor influyente en la disminución del porcentaje de germinación de la especie.

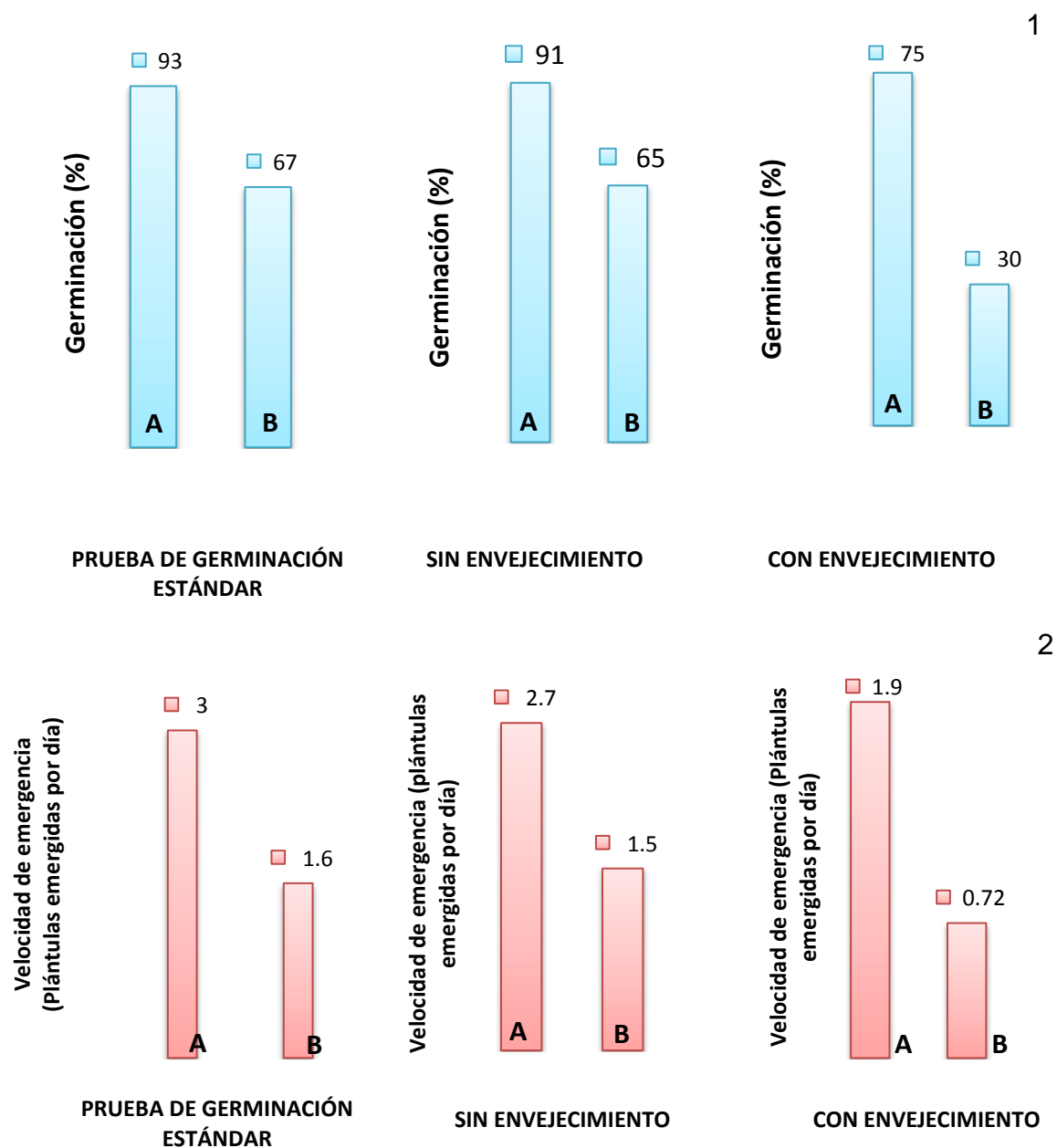
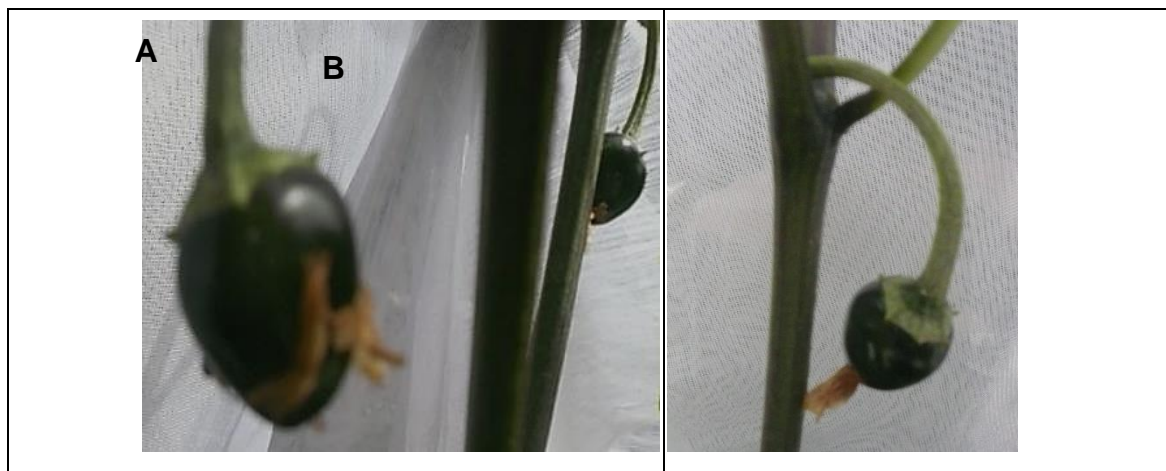


Figura 19. Porcentaje y velocidad de germinación de semillas de chile jalapeño sometidas a la prueba de germinación estándar y a la prueba de vigor. 1 = Porcentaje de germinación; 2 = Velocidad de germinación A= Híbrido Ixtapa; B= Ixtapa X3R; VG = Velocidad de emergencia; S/EA= Sin envejecimiento acelerado; C/EA = Con envejecimiento acelerado.

7.3.2 Descripción de los síntomas presentados en las plantas de chile jalapeño establecidas en condiciones de invernadero.

Se observó crecimiento anormal del fruto, de tamaño pequeño, ovalado a alargado, y con forma de garfio, además con proliferación de hojas en los entrenudos. Las hojas presentaron una coloración verde claro y caída de flores lo cual coincide con lo reportado por Bové, 2006 y Brlansky *et al.*, 2009 quienes mencionan que las plantas presentan caída de las flores, asimetría y reducción en el tamaño de los frutos con una línea curvada a la mitad del mismo, por otro lado Liefting *et al.*, 2009 coincide también en que los síntomas se manifiestan con hojas deformes de color verde pálido o amarillo y caída de flores. En este sentido Secor *et al.*, 2009 menciona que los síntomas foliares y aéreos incluyen clorosis, decoloración amarilla o púrpura, enrollamiento de las hojas, tallos trenzados con una apariencia zigzag y proliferaron de yemas axilares. La Fig. 3. A-J muestra los síntomas presentados en planta de chile jalapeño con diferencias importantes en cuanto a nuestra planta utilizada como testigo (asintomática).



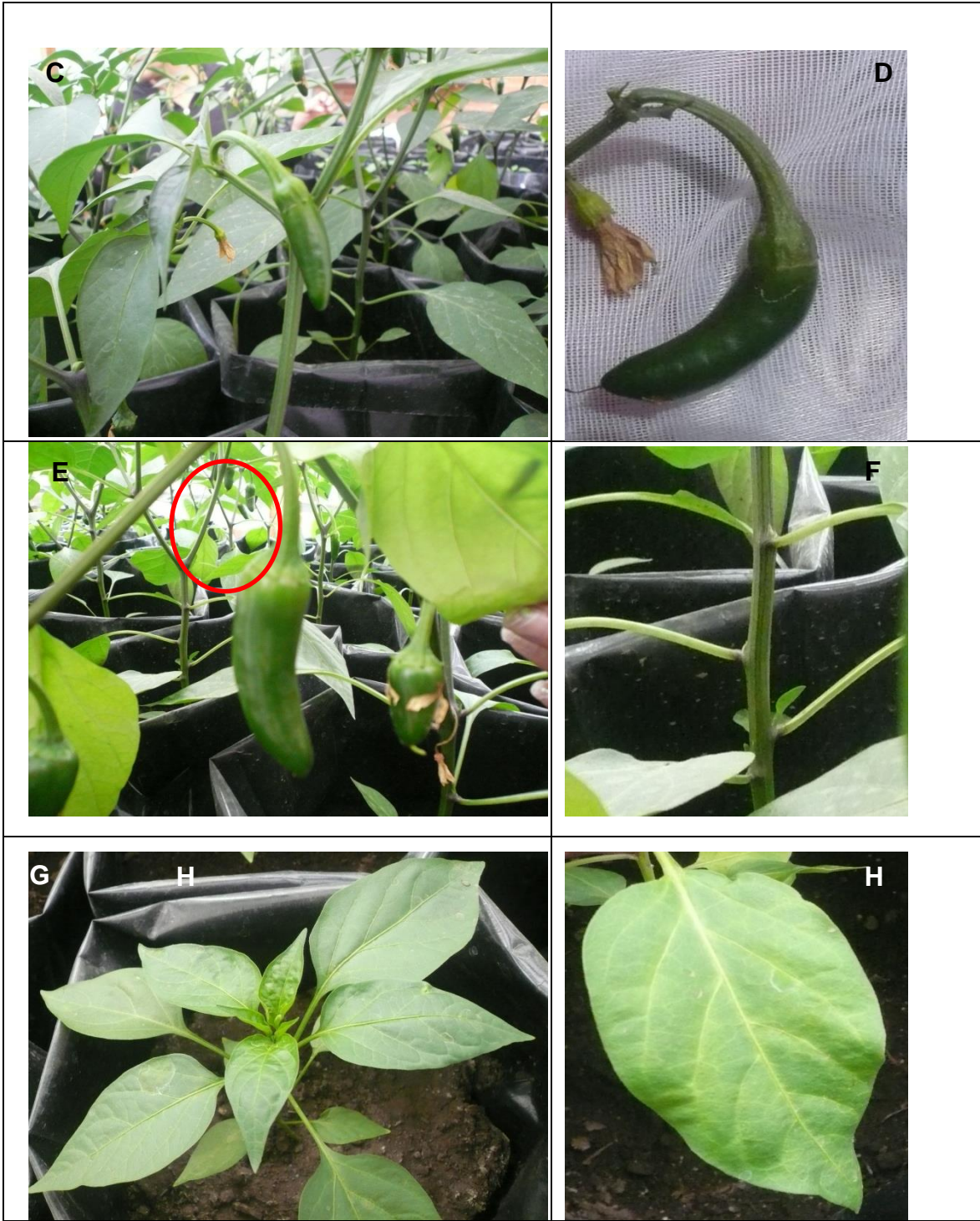




Figura 20. Síntomas asociados con *Candidatus Liberibacter solanacearum* en condiciones de invernadero. A y B) Deformación del fruto quedando a la madurez en forma de bola. C y D) reducción de tamaño y delgado a la madurez. E y F) Proliferación de hojas en los entrenudos. G y H) verde pálido en las hojas. I y J) planta sintomática y asintomática respectivamente.

7.4 CONCLUSIONES

La evaluación de la calidad fisiológica de la semilla de chile jalapeño en términos de germinación, y vigor, muestran que la variedad Ixtapa X3R fue más susceptible a las pruebas. Y tomando en cuenta el análisis histoquímico y molecular que se realizó a la semilla donde el resultado fue positivo para *Candidatus Liberibacter solanacearum* podemos relacionar esta disminución provocada por el patógeno al verse favorecido ante el estrés que se indujo a la planta.

7. 5 LITERATURA CITADA

- Black, M., and Bewley, J. D.** 2000. Seed Technology and its Biological Basis. Sheffield Academic Press Ltd. Sheffield, England. 419 p.
- Black, M., Bewley, J.D., and Halmer, P.** 2006. The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses. CABI publishing, Wallingford, UK.
- Bové, M. J.** 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7-37.
- Brlansky, H. R, Dewdney, M. M., Rogers, E. M., and Chung, R. K.** 2009. Florida citrus pest management guiede: Huanglongbing (Citrus greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Servicie, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA. 225 p.
- Camacho, M. F.** 1994. Dormición de semillas, causas y tratamientos Trillas
- Cantliffe, D. J., and Tigchelaar, E. C.** 1980. Seed quality: An overview of it's relationship to horticulturist and physiologists. Horticulture Science 15: 764-765.
- Chauhan, D. S., Deswall, D. P., Dahiya, O. S. and Punia, R. C.** 2011. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seeds of wheat (*Triticum aestivum*). Indian Journal of Agricultural Sciences 81, 1037-1040.
- Copeland, L. O., and McDonald, M. B.** 2001. Principles of seed science and technology. Fourth edition. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts, USA. 467p.
- Delouche, J. C., and Baskin, C. C.** 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Sci. Technol. 1: 427-452.
- Duarte, A., Alonso, R. M., y Pérez, P.** 1986. Investigación preliminar sobre el aislamiento e identificación de microorganismos en semillas. Revista Forestal Baracoa 16: 77-87.

- Golpayegani, A., and Tilebeni, H.G.** 2011. Effect of biological fertilizers on biochemical and physiological parameters of Basil (*Ocimum basilicum* L.) medicine plant. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 11: 411-416.88.
- González, A., F.** 2010. Caracterización de Germoplasma Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 385 p.
- Hampton, J.G and Tekrony, D. M.** 1995. Handbook of vigour test methods. 3 ed. Zurich, Suiza. The International Seed Testing Association. 117 p.
- Craviotto, R. M.; Arango-Perearnau, M. R., y Gallo, C.** 2006. Casete de Análisis de Germinación y Sanidad de Semillas. *Seed news* 8-9 pp.
- International Seed Testing Association (ISTA).** 2012. **International Rules for Seed Testing.** ISBN 3-906549-38-0 P.O. BOX 308, 8303 Basserdorf, CH- Switzerland, Suiza. p. 500.
- Kapoor, N., Arya, A., Siddiqui, M. A., Kumar, and H Amir, A.** 2011. Physiological and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *American Journal of Plant Physiology* 6: 28-35.
- Liefting, W. L., Perez-Egusquiza, C. Z., Clover, G. R. G., and Anderson, J. A. D.** 2008. A new *Candidatus* Liberibacter species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92: 1474.
- Liefting, W. L., Sutherland, W. P, Ward, I. L., Paice, L. K, Weir, S. B., and Clover, G. G.** 2009. A new “*Candidatus* Liberibacter” species associated with diseases of Solanaceous crops. *Plant Dis.* 93: 208-214.
- Maguire, J. D.** 1962. Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Pozo-Campodonico, O.** 2004. Importancia económico –social y cultural del chile. Producción y manejo integral del cultivo de chile. Folleto técnico No. 2 CONAPROCH, Tampico, Tamaulipas, México. p. 68.

- Salinas, A. R., Yoldjian, A. M., Cravioto, R. M., and Bisaro, V.** 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 371–379.
- SAS Institute.** 2002 Statistical Analysis System Version 9.0. North Carolina, USA.
- Secor, G. A., Rivera, V. V., Abad, J. A., Lee, M., Clover G. R., and Liefing, L. W.** 2009. Association of *Candidatus Liberibacter solanacearum* with Zebra Chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy and PCR. *Plant Dis.* 93(6):574-586.
- Sun, Q., Wang, J., and Sun, B.** 2007. Advances on seed vigour physiological and genetic mechanisms. *Agricultural Science in China* 6: 1060-1066.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Desde el primer reporte de *Ca. Liberibacter solanacearum* en Nueva Zelanda afectando papa (Liefting, *et al.*, 2008) existen un gran número de reportes de la bacteria afectando este mismo cultivo (Abad, *et al.*, 2008. Munyaneza, *et al.*, 2012) y otras solanáceas como tomate, chile y berenjena en USA, México (Munyaneza, *et al.*, 2009) y centro América, inclusive afectando apio y zanahoria en Europa (Alfaro-Fernández, *et al.*, 2012), todos los síntomas descritos coinciden con el reporte original.

Sin embargo, en México las plantas de chile jalapeño sembradas durante 2009 en los estados de Nayarit y Jalisco tuvieron una reducción del tamaño de la planta durante el ciclo de cultivo, se observó reducción del área foliar, con una ligera proliferación de brotes parecidos a los causados por fitoplasmas. El síntoma más conspicuo fue la deformación del 100% de los frutos y la falta de uniformidad en la maduración dentro del mismo grupo de frutos cosechados. Estos resultados fueron diferentes a los reportados en Nueva Zelanda en el mismo cultivo, ya que la sintomatología puede variar dependiendo del hospedante o a la variedad.

Al comparar los síntomas con los causados por otras especies de *Candidatus Liberibacter* especialmente en cítricos se observa también hojas cloróticas, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteados y clorosis difusa hasta que el amarillamiento en la lámina foliar es generalizado y ocurre la defoliación en frutos.

En limón mexicano se ha observado el fenómeno de maduración irregular iniciando por un color amarillento en la parte basal (Robles-García, *et al.*,

2009.); así como deformación o desarrollo asimétrico de los frutos de naranja dulce de árboles de Yucatán que fueron confirmados como positivos para HLB.

El análisis molecular que se realizó con la región 16S rDNA y clonación, es recomendada para este grupo de bacterias difíciles de cultivar y para laboratorios cuyas detecciones están basadas principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación y secuenciación (Hansen, et al., 2008), esta metodología permitió la identificación de *Ca. Liberibacter solanacearum* con un 98% de máxima identidad en las semillas de chile jalapeño.

La identificación con diferentes marcadores moleculares puede aportar mayor información sobre lo ya identificado. Los genes de una proteína transmembranal que se encuentra en todos los seres vivos en este caso de los procariotes es la proteína *SecY* para bacterias Gram positivas y *EcSecY* para bacterias Gram negativas, *SecY*, son altamente conservado, es un gen de una sola copia y su utilidad en filogenia ha sido revalorada en bacterias Gram negativas, Gram positivas y fitoplasmas (Lee *et al.*, 2006). Con estos genes los resultados de la secuenciación y clonación resultaron positivos para *CaLso* con una máxima identidad del 99%.

Por otro lado la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* mediante los iniciadores específicos OA2/OI2c (Liefing, *et al.*, 2009) resultó de gran importancia porque con el análisis molecular se logró confirmar los resultados obtenidos con el uso del gen ribosomal 16S rRNA, y los iniciadores *SecY* y *EcSecY*.

Lo que significa que la bacteria no se encuentra limitada solamente a los tubos cribosos del floema, sino puede encontrarse en las estructuras vasculares

rudimentarias de la semilla. El estudio realizado para la detección espacial de *CaLso* dentro de la semilla se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido. El uso de esta técnica para este estudio resultó adecuada ya que se logró identificar la ubicación de la bacteria dentro de la semilla en una estructura llamada micrópilo, el micrópilo por la función que desempeña pudo ser la ruta de entrada para el patógeno, lo cual tiene relación con lo descrito por (Sinclair, 1989) que dice que la infección de la semilla puede ocurrir sistemáticamente a través del sistema vascular o indirectamente a través del micrópilo de la semilla y la infección puede resultar por más de un proceso y afectarla considerablemente (Agarwal, *et al* 1997). También podemos mencionar que la calidad fisiológica de las semillas es un atributo muy importante para determinar el funcionamiento de la semilla al momento de la siembra o en el almacenamiento, para esto se toma en cuenta el vigor y la germinación (Hampton, 2002).

El estudio realizado en este trabajo demuestra que la semilla utilizada en los campos de Jalisco y Nayarit mostró una disminución en la velocidad de la germinación así como en el porcentaje de germinación durante las pruebas de Germinación Estándar y la prueba de vigor en comparación con la semilla de chile jalapeño utilizada como testigo. Lo que significa que la semilla no cuenta con una buena calidad fisiológica, la cual se está viendo afectada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Estos resultados permiten establecer que *Ca. Liberibacter solanacearum* puede encontrarse en la semilla y a través de ella puede convertirse en un medio de diseminación a otros cultivos o áreas libres de este patógeno. Por medio de estas metodologías se puede establecer que las semilla no cumplen con las reglas fitosanitarias requeridas para el comercio internacional, es decir semilla destinada para siembra. Por lo que las medidas fitosanitarias deben tenerse en consideración durante el ciclo de producción, almacenamiento, importación y exportación de semillas de chile.

En este sentido podemos mencionar que la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* en semillas de chile jalapeño en México, crea una nueva visión sobre la transmisión que hasta el momento se ha reportado para esta bacteria; lo que nos invita a realizar un estudio del comportamiento de la bacteria bajo diferentes condiciones abióticas, la reacción de las diferentes variedades comerciales, así como el estudio de los fenómenos naturales que podrían estar influyendo en los mecanismos de infección y diseminación de la bacteria, y por otro lado realizar análisis moleculares con nuevos iniciadores dirigidos a otras regiones del genoma de *Candidatus Liberibacter solanacearum* que nos permitan detectar diferentes haplotipos de la bacteria como lo encontrado en tomate o mutaciones que le permitan una mayor adaptabilidad en nuevos hospedantes o medios de transmisión.

Desde el primer reporte de *Ca. Liberibacter solanacearum* en Nueva Zelanda afectando papa (Liefting, *et al.*, 2008) existen un gran número de reportes de la bacteria afectando este mismo cultivo (Abad, *et al.*, 2008. Munyaneza, *et al.*, 2012) y otras solanáceas como tomate, chile y berenjena en USA, México (Munyaneza, *et al.*, 2009) y centro América, inclusive afectando apio y zanahoria en Europa (Alfaro-Fernández, *et al.*, 2012), todos los síntomas descritos coinciden con el reporte original.

Sin embargo, en México las plantas de chile jalapeño sembradas durante 2009 en los estados de Nayarit y Jalisco tuvieron una reducción del tamaño de la planta durante el ciclo de cultivo, se observó reducción del área foliar, con una ligera proliferación de brotes parecidos a los causados por fitoplasmas. El síntoma más conspicuo fue la deformación del 100% de los frutos y la falta de uniformidad en la maduración dentro del mismo grupo de frutos cosechados. Estos resultados fueron diferentes a los reportados en Nueva Zelanda en el mismo cultivo, ya que la sintomatología puede variar dependiendo del hospedante o a la variedad.

Al comparar los síntomas con los causados por otras especies de *Candidatus Liberibacter* especialmente en cítricos se observa también hojas cloróticas, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteados y clorosis difusa hasta que el amarillamiento en la lámina foliar es generalizado y ocurre la defoliación en frutos.

En limón mexicano se ha observado el fenómeno de maduración irregular iniciando por un color amarillento en la parte basal (Robles-García, *et al.*, 2009.); así como deformación o desarrollo asimétrico de los frutos de naranja dulce de árboles de Yucatán que fueron confirmados como positivos para HLB.

El análisis molecular que se realizó con la región 16S rDNA y clonación, es recomendada para este grupo de bacterias difíciles de cultivar y para laboratorios cuyas detecciones están basadas principalmente en la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR), clonación y secuenciación (Hansen, et al., 2008), esta metodología permitió la identificación de *Ca. Liberibacter solanacearum* con un 98% de máxima identidad en las semillas de chile jalapeño.

La identificación con diferentes marcadores moleculares puede aportar mayor información sobre lo ya identificado. Los genes de una proteína transmembrana que se encuentra en todos los seres vivos en este caso de los procariotes es la proteína SecY para bacterias Gram positivas y EcSecY para bacterias Gram negativas, SecY, son altamente conservado, es un gen de una sola copia y su utilidad en filogenia ha sido revalorada en bacterias Gram negativas, Gram positivas y fitoplasmas (Lee *et al.*, 2006). Con estos genes los resultados de la secuenciación y clonación resultaron positivos para CaLso con una máxima identidad del 99%.

Por otro lado la detección de *Ca. Liberibacter solanacearum* mediante los iniciadores específicos OA2/OI2c Y Lsof/OI2c (Liefting, *et al.*, 2009) resultó de gran importancia porque con el análisis molecular se logró confirmar los resultados obtenidos con el uso del gen ribosomal 16S rRNA, y los iniciadores SecY y EcSecY.

Lo que significa que la bacteria no se encuentra limitada solamente a los tubos cribosos del floema, sino puede encontrarse en las estructuras vasculares rudimentarias de la semilla.

El estudio realizado para la detección espacial de CaLsoF dentro de la semilla se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido. El uso de esta técnica para este estudio resultó adecuada ya que se logró identificar la ubicación de la bacteria dentro de la semilla en una estructura llamada micrópilo, el micrópilo por la función que desempeña pudo ser la ruta de entrada

para el patógeno, lo cual tiene relación con lo descrito por (Sinclair, 1989) que dice que la infección de la semilla puede ocurrir sistemáticamente a través del sistema vascular o indirectamente a través del micrópilo de la semilla y la infección puede resultar por más de un proceso y afectarla considerablemente (Agarwal, *et al* 1997).

La calidad fisiológica de las semillas es un atributo muy importante para determinar el funcionamiento de la semilla al momento de la siembra o en el almacenamiento, para esto se toma en cuenta el vigor y la germinación (Hampton, 2002).

El estudio realizado en este trabajo demuestra que la semilla utilizada en los campos de Jalisco y Nayarit muestra una disminución en la velocidad de la germinación así como en el porcentaje de germinación durante las pruebas de Germinación Estándar y la prueba de vigor en comparación con la semilla de chile jalapeño utilizada como testigo. Lo que significa que la semilla no cuenta con una buena calidad fisiológica, la cual se está viendo afectada por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

Estos resultados permiten establecer que *Ca. Liberibacter solanacearum* puede encontrarse en la semilla y a través de ella puede convertirse en un medio de diseminación a otros cultivos o áreas libres de este patógeno. Por medio de estas metodologías se puede establecer que las semilla no cumplen con las reglas fitosanitarias requeridas para el comercio internacional, es decir semilla destinada para siembra. Por lo que las medidas fitosanitarias deben tenerse en consideración durante el ciclo de producción, almacenamiento, importación y exportación de semillas de chile.

En este sentido podemos mencionar que la presencia de *Ca. Liberibacter solanacearum* en semillas de chile jalapeño en México, crea una nueva visión

sobre la transmisión que hasta el momento se ha reportado para esta bacteria; lo que nos invita a realizar un estudio del comportamiento de la bacteria bajo diferentes condiciones abióticas, la reacción de las diferentes variedades comerciales, así como el estudio de los fenómenos naturales que podrían estar influyendo en los mecanismos de infección y diseminación de la bacteria, y por otro lado realizar análisis moleculares con nuevos iniciadores dirigidos a otras regiones del genoma de *Candidatus Liberibacter solanacearum* que nos permitan detectar diferentes haplotipos de la bacteria como lo encontrado en tomate o mutaciones que le permitan una mayor adaptabilidad en nuevos hospedantes o medios de transmisión.

8.1 LITERATURA CITADA

- Abad, J. A., Bandhla, M., French-Monar, R. D., Liefiting, L. W., and Clover, G. R. G.** 2008. First report of the detection of '*Candidatus Liberibacter*' species in Zebra chip disease-infected potato plants in the United States. *Plant Dis.* 93:108.
- Agarwal, V. K., and Sinclair, J. B.** 1997. *Principles of Seed Pathology*, 2.ed. Boca Raton: CRC, 538 pp.
- Alfaro-Fernández, A., Cebrián, M. C., Villaescusa, F. J., Hermoso de Mendoza, A., Ferrándiz, J. C., Sanjuán, S., and Font, M. I.** 2012. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrot in mainland Spain. *Plant Dis.* 96:582.
- Hampton, J.G and Tekrony, D. M.** 1995. *Handbook of vigour test methods*. 3 ed. Zurich, Suiza. The International Seed Testing Association. 117 p.
- Liefiting, L. W., Perez-Egusquiza, Z. C., Clover, G. R. G., and Anderson, J. A. D.** 2008. A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Dis.* 92:1474.
- Liefiting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., and Clover, G. R. G.** 2009. A new *Candidatus Liberibacter* species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 93:208-214.
- Lee, I. M., Bottner, K. D., Secor, G and Rivera, V. V.** 2006a. '*Candidatus phytoplasma americanum*', a phytoplasma associated with purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and evolutionary y Microbiology* 56, 1593-1597.
- Munyaneza, J. E., and Henne, D. C.** 2012. Leafhopper and psyllid pests of potato. *Biology of major pests*. Texas, Estados Unidos. p 81-89.

- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Garzón-Tiznado, J. A., and Cárdenas-Valenzuela, O. G.** 2009. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in Mexico. *Plant Dis.* 93:1076.1.
- Robles-García, P. y Sánchez, A. H.** 2009. Programa Nacional Para la Detección del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) En México. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA.
- Sinclair, J. B.** 1989. Mechanisms for seed in soy bean. IV Conferencia Mundial de Investigación de soya. Buenos Aires. Argentina. P. 820-825.