



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA**  
**EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



Análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en la interacción planta de papa-fitoplasma “Mexican potato purple top”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES**  
**Y MEDIO AMBIENTE**

PRESENTA

**NADIA RUBÍ DOURIET GÁMEZ**

**GUASAVE, SINALOA, MEXICO; DICIEMBRE 2011**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 08 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Nadia Rubí Douriet Gámez alumno (a) del Programa de Maestría en recursos naturales y medio ambiente con número de registro B091643, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Norma Elena Leyva López y M.C. Rosa María Longoria Espinoza y cede los derechos del trabajo intitulado “Análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en la interacción planta de papa-fitoplasma “Mexican potato purple top””, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección nadia\_douriet@hotmail.com, neleyval@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nadia Rubí Douriet Gámez

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 9:00 horas del día 08 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada: "Análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en la interacción planta de papa-fitoplasma "Mexican potato purple top"".

Presentada por el alumno:

Form with fields for student name: Douriet (Apellido paterno), Gámez (Apellido materno), Nadia Rubí (Nombre(s)). Includes a registration number table: B 0 9 1 6 4 3.

aspirante de: MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Signature of Dra. Norma Elena Leyva López

Signature of M. en C. Rosa María Longoria Espinoza

Signature of Dr. Jesús Méndez Lozano

Signature of Dra. Melina López Méyer

Signature of Dra. Teresa Leticia Espinosa Carreón

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Signature of Dr. Jorge Montiel Montoya

## **AGRADECIMIENTOS A PROYECTOS**

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Biotecnología Agrícola (BIOTECSIN) del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El presente trabajo fue apoyado económicamente a través del CECYT 2009, CECYT 2010 (Con número de registro SIP-2009-0762). El alumno/a Nombre Nadia Rubí Douriet Gámez fue apoyado con una beca CONACyT.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IV
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	V
<b>GLOSARIO</b>	VI
<b>RESUMEN</b>	X
<b>ABSTRACT</b>	XI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	2
1. Cultivo de papa	2
1.1. Importancia nutricional	2
1.2. Importancia económica	2
1.3. Principales plagas y enfermedades de la papa	3
1.3.1. Punta morada de la papa	4
2. Fitoplasmas	5
2.1. Taxonomía	6
2.2. Sintomatología	6
2.3. Fitoplasmas en insecto vector	6
2.4. Localización y distribución de fitoplasmas en las plantas	8
2.5. Organización de los genomas de fitoplasmas	10
2.6. Factores de virulencia	11
2.7. Interacción fitoplasma-planta	13
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	16

<b>IV. HIPÓTESIS</b>	17
<b>V. OBJETIVOS</b>	18
1. Objetivos general	18
2. Objetivos específicos	18
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
1. Materiales	19
1.1. Material vegetal	19
1.2. Oligonucleótidos utilizados	19
2 Métodos	23
2.1. Propagación <i>in vitro</i> de plantas de papa	23
2.2. Extracción de DNA total	23
2.3. Detección molecular de fitoplasmas por PCR anidado	24
2.4. Extracción de RNA total de plantas de papa <i>in vitro</i>	24
2.5. Cuantificación y evaluación de la calidad de RNA total	26
2.6. Detección molecular de genes codificantes para proteínas de virulencia por RT-PCR	27
2.6.1. Síntesis de la cadena complementaria de DNA. Primer paso	27
2.6.2. PCR para la detección de genes codificantes para proteínas de virulencia. Segundo paso	27
2.6.3. Purificación de los productos de PCR	29
2.6.4. Ligación de productos de PCR en el vector de clonación	29
2.6.5. Transformación de células competentes	30
2.6.6. Extracción de DNA plasmídico (minipreps)	30
2.6.7. Secuenciación y análisis	30
2.7. Selección y procesamiento de muestras de plantas de papa <i>in vitro</i> para el análisis de expresión diferencial por PCR en	

tiempo real	31
2.7.1. Plantas infectadas/no infectadas por fitoplasmas	31
2.7.2. Plantas seleccionadas y clasificadas por síntomas	31
2.7.3. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA	32
2.8. Medición de la expresión relativa de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas por PCR en tiempo real	33
2.8.1. Método de determinación de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$	34
2.8.2. Análisis estadístico	35
<b>VII. RESULTADOS</b>	36
1. Síntomas de plantas de papa <i>in vitro</i> infectadas con fitoplasmas	36
2. Detección molecular de fitoplasmas en plantas de papa cultivadas <i>in vitro</i>	37
3. Detección de genes codificantes para proteínas de virulencia utilizando la técnica de RT-PCR	38
3.1. Análisis de secuencias	39
4. Medición de la expresión relativa de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas en plantas infectadas y no infectadas por PCR en tiempo real	40
5. Medición de la expresión relativa de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas en plantas sintomáticas y asintomáticas utilizando la técnica de PCR en tiempo real	43
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	46
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	52
<b>X. LITERATURA CONSULTADA</b>	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Distribución de fitoplasmas en insecto vector	7
<b>Figura 2.</b>	Micrografías electrónicas de cortes longitudinales a través del floema de una planta infectada por fitoplasmas	9
<b>Figura 3.</b>	Síntomas en plantas de papa <i>in vitro</i> infectadas con el fitoplasma “Mexican potato purple top”	36
<b>Figura 4.</b>	Electroforesis de productos amplificados por PCR anidado para detección de fitoplasmas	37
<b>Figura 5.</b>	Detección de genes de virulencia por RT-PCR	38
<b>Figura 6.</b>	Expresión relativa de genes de respuesta ante infección por fitoplasmas en plantas de papa <i>in vitro</i> .	42
<b>Figura 7.</b>	Gráfica de cajas mostrando los radios de expresión relativa de los genes de respuesta ante infección por fitoplasmas en plantas de papa con diferentes síntomas con respecto a plantas asintomáticas	45



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Relación de oligonucleótidos para detección de fitoplasmas por PCR anidado y detección de genes de virulencia por RT-PCR.	21
<b>Cuadro 2.</b>	Relación de oligonucleótidos para el análisis de expresión relativa por PCR en tiempo real	22
<b>Cuadro 3.</b>	Porcentaje de similitud de la secuencia obtenida con las que se encuentran reportadas en la base de datos Gene Bank del NCBI.	39
<b>Cuadro 4.</b>	Expresión relativa de los genes de respuesta ante infección por fitoplasmas en plantas infectadas respecto a plantas no infectadas	41

## GLOSARIO

**Amplicón.** Producto de una reacción de amplificación de DNA.

**Amplificación de DNA.** Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN tanto *in vivo*, en un plásmido, fago u otro vector, como *in vitro* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

**Cultivo *in vitro*.** Crecimiento artificial de microorganismos o tejidos vegetales en un medio nutritivo preparado en recipiente de vidrio o plástico transparente bajo condiciones asépticas.

**DNA (Ácido desoxirribonucleico).** Molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos excepto en algunos tipos de virus (retrovirus). Está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre las pares de bases de nucleótidos complementarios.

**DNA complementario (cDNA).** Molécula de DNA complementaria a una molécula de ARN mensajero que se genera por acción de la enzima transcriptasa inversa.

**DNA polimerasa.** Enzima que interviene en la replicación del DNA para dar a cada célula hija una copia del DNA original en el proceso de la mitosis.

**Electroforesis.** Técnica para separar moléculas iónicas mediante la migración diferencial en un soporte sólido de acuerdo con el tamaño y la carga iónica de las moléculas en el campo eléctrico. Las moléculas separadas se localizan mediante su teñido o revelado

**Elemento criboso.** Serie de células que funcionan como un elemento conductor del floema en las plantas. Las células que lo constituyen están vivas y son alargadas, con paredes terminales inclinadas u horizontales, se disponen continuándose la una a la otra, conectándose a través de sus extremos.

**Expresión relativa.** Número que indica las veces de expresión de un determinado gen en una condición biológica respecto a su expresión en otra distinta que sirve de control.

**Floema.** Es el tejido conductor encargado del transporte de nutrientes orgánicos, especialmente azúcares, producidos por la parte aérea fotosintética y autótrofa, hacia las partes basales subterráneas, no fotosintéticas, heterótrofas de las plantas vasculares

**Gen.** Secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de DNA (o RNA en el caso de algunos virus), que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica. Es la unidad funcional más pequeña del material genético.

**Genoma.** Conjunto de los genes de un individuo o una especie contenida en un juego haploide de cromosomas. Conforman la totalidad de la información genética que posee un organismo.

**Isla de patogenicidad.** Fracción del DNA genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento. Suele estar contenido en plásmidos, y su origen es una transferencia horizontal de material genético.

**Oligonucleótido.** Secuencia corta de DNA o RNA, con cincuenta pares de bases o menos que se utilizan como cebadores en reacciones de amplificación.

**Patógeno.** Agente biológico capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en un organismo, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas.

**PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).** Método para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de DNA a partir de cantidades pequeñas de muestra (una molécula de DNA).

**PCR anidado.** Técnica que comporta dos reacciones en cadena de la polimerasa sucesivas, con dos pares de oligonucleótidos distintos, de tal modo que los

oligonucleótidos utilizados en la segunda PCR, flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena

**PCR tiempo real.** Variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que generalmente se utiliza para cuantificar el producto de amplificación de manera simultánea a la amplificación.

**Plasmodesmo.** Cada una de las unidades continuas de citoplasma que pueden atravesar las paredes celulares, manteniendo interconectadas las células continuas en organismos pluricelulares en los que existe pared celular.

**Proteína.** Biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos que desempeñan un mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos.

**RNA (Ácido ribonucleico).** Ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleotidos involucrado en las síntesis de proteínas.

**RNAm (RNA mensajero).** Cadena de ribonucleotidos que codifica para una proteína específica.

**RT-PCR (PCR en transcripción reversa).** Variante de PCR en donde, inicialmente, una hebra de RNA es retrotranscrita en DNA complementario (cDNA) usando una enzima llamada transcriptasa reversa y el resultado se amplifica en un PCR tradicional.

**Transcriptasa Reversa.** Enzima de tipo DNA polimerasa, que tiene como función sintetizar DNA de doble cadena utilizando como molde RNA, es decir, catalizar la transcripción inversa.

**Síntoma.** Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad

**Transposón.** Secuencia de DNA que puede moverse de un lugar a otro del cromosoma, insertar copias adicionales de ella misma en otros puntos o pasar de un cromosoma a otro.

**Virulencia.** Grado de patogenicidad de un patógeno determinado.

## RESUMEN

Se ha identificado al fitoplasma “Mexican potato purple top” (MPPT) afectando al cultivo de papa en México, provocando grandes pérdidas en su producción. El estudio y control de estos patógenos es difícil por ser parásitos obligados. Sin embargo, en el fitoplasma AY-WB se han identificado genes codificantes para proteínas de virulencia (SAP11 y SAP30) que alteran la fisiología celular y modulan la defensa de las plantas hospederas, por lo que es importante determinar si dichos genes se conservan en el genoma del fitoplasma MPPT. Adicionalmente, el grupo de trabajo cuenta con una biblioteca de cDNAs de genes expresados diferencialmente en plantas de papa *in vitro* en respuesta a la infección por el fitoplasma MPPT. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de expresión de genes asociados con la respuesta de plantas de papa ante la infección por MPPT. Los resultados de RT-PCR sugieren que los genes de virulencia SAP11 y SAP30 no se encuentran conservados en el fitoplasma MPPT. Mediante PCR en tiempo real se determinó el nivel de expresión de diez genes expresados diferencialmente en plantas de papa *in vitro* en respuesta a la infección por el fitoplasma MPPT. Se observó una sobreexpresión de seis de los genes, cuatro que codifican para proteínas involucradas en defensa celular/respuesta a estrés (SAP6, dedo de Zn, HSP90 y EREB), una proteína de transcripción (WRKY) y una proteína de función desconocida. Tres de los genes mantuvieron su nivel de expresión, dos de ellos codifican para proteínas involucradas en defensa celular/respuesta a estrés (Transportador ABC y MCP In) y otro que codifica para una proteína de metabolismo (MDAR). Un gen codificante para una proteína relacionada con defensa celular/respuesta a estrés (Proteína de membrana) disminuyó su nivel de expresión. Por otro lado, no se observaron niveles detectables de expresión de los genes para MDAR, en MCP In y Proteína de membrana en plantas sintomáticas respecto a plantas asintomáticas. Los genes codificantes para SAP6, dedo de Zn, HSP90, EREB, WRKY, Transportador ABC y una Proteína de función desconocida presentaron una inducción en su expresión, por lo que es posible que estén involucrados en mecanismos de defensa en las plantas de papa y en la presencia de síntomas.

## ABSTRACT

The "Mexican potato purple top" (MPPT) Phytoplasma" was identified affecting the potato crop in Mexico, causing great losses in production. The study and control of these pathogens is difficult because they are obligate parasites. However, genes coding for virulence proteins (SAP11 and SAP30) have been identified in AY-WB phytoplasma genome, altering plant cell physiology and modulate the host plant defense. It would be interesting to determine if these phytoplasma-secreted proteins are conserved between different strains and species. Additionally, our working group has a library of cDNAs of differentially expressed genes in potato plants *in vitro* in response to MPPT phytoplasma infection. The aim of this study was to determine the level of expression of genes associated with potato plants in response to MPPT phytoplasma infection. The results of RT-PCR suggest that virulence genes SAP11 and SAP30 are not conserved in MPPT phytoplasma. Real-time PCR was used to determinate the level of expression of ten differentially expressed genes in potato plants *in vitro* in response to phytoplasma infection MPPT. An overexpression was observed of four genes coding for proteins involved in cell defense/stress response (SAP6, Zn finger, EREB and HSP90) one gene coding for a transcription factor (WRKY) and one gene for an unknown function protein. Three genes presented no change in their relative expression; two of them encode proteins involved in cell defense/stress response (ABC Transporter and MCP In) and another one coding for a metabolism protein (MDAR). One gene coding for a protein involved in cell defense/stress response decreased their level of expression (Membrane protein). On the other hand, there were no detectable levels of expression of genes for MDAR, MCP-In and Membrane protein in symptomatic plants compared to asymptomatic plants. Genes coding for SAP6, Zn finger, HSP90, EREB, WRKY, ABC transporter and an unknown function protein showed an induction in their relative expression, so they may be involved in defense mechanisms in potato plants and symptoms presence.

## I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes en México en base a su consumo y valor nutrimental, reflejándose en una alta producción y valor económico.

Uno de los factores limitantes de este cultivo es la presencia excesiva de plagas y enfermedades, generándole al productor altos costos para su erradicación. Por otro lado, existen microorganismos, como los fitoplasmas, que difícilmente pueden ser controlado por medios externos, ya que son patógenos intracelulares. Estos microorganismos han causado enfermedades devastadoras alrededor del mundo a más de 1000 especies de plantas, lo cual ha representado grandes pérdidas económicas para los productores.

Es complicado estudiar a los fitoplasmas detalladamente en comparación con otros microorganismos, debido a que no se han podido cultivar *in vitro* ya que residen en el floema de las plantas infectadas. Sin embargo, a la fecha se tiene información importante acerca de la estructura y composición del genoma de algunos fitoplasmas, así como de secuencias de genomas completos y genes asociados a la virulencia de fitoplasmas.

Las plantas infectadas con fitoplasmas exhiben diversos síntomas asociados a la respuesta de la planta al ataque del patógeno; sin embargo, son pocos los estudios sobre la expresión diferencial de genes durante la interacción de fitoplasmas con su hospedero.

En este trabajo se propone la identificación de genes relacionados a la virulencia de fitoplasmas, así como la cuantificación y análisis de la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de fitoplasmas mediante la técnica de PCR en tiempo real.

El conocer la forma en la que estos patógenos actúan, produciendo los síntomas característicos que conllevan a su enfermedad, permitirá proponer nuevas estrategias de control efectivas para reducir pérdidas en el cultivo y beneficiar las prácticas agrícolas.



## **II. MARCO TEÓRICO**

### **1. Cultivo de papa**

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una hortaliza perteneciente a la familia de las Solanáceas, así como el tomate (*Solanum Lycopersicum*), chile (*Capsicum annum*) y berenjena (*Solanum melongena*), destacando entre más de 2,300 especies de esta familia. La papa es originaria del altiplano andino en un área que coincide aproximadamente con el sur del Perú. Existen más de 4,000 variedades de papa, lo que muestra la diversidad genética que presenta este cultivo (Borba, 2008). Actualmente se conocen dos subespecies (*tuberosum* y *andígena*) de la especie *S. tuberosum* (Rubio-Covarrubias *et al.*, 2000).

#### **1.1. Importancia nutricional**

La planta de papa es una herbácea de un metro de altura de la que se consume el tubérculo, que es el lugar de reserva de nutrientes el cual tiene alto contenido de carbohidratos lo que la posiciona como un alimento de alto valor energético. La papa aporta proteínas en cantidad similar a los cereales y en mayor proporción que otros tubérculos (Borba, 2008). En contenido de vitaminas, la papa es comparable con otras hortalizas comunes. Cien gramos de papa hervida suministran el 10% de la cantidad diaria recomendada para adultos de tiamina, niacina, ácidos fólico, vitamina B, vitamina C y 50% de ácido ascórbico. En cuanto al contenido mineral, la papa es una fuente moderadamente buena de hierro, fósforo y magnesio, además de una excelente fuente de potasio (Horton, 1992). Además aporta antioxidantes y fibra cuyo consumo ha sido asociada con un buen estatus de salud (Buckenhüskes, 2005).

#### **1.2. Importancia económica**

Según datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por las siglas en inglés para Food and Agriculture Organization), en el año 2008, la papa ocupó el cuarto lugar como cultivo alimentario en el mundo, después del arroz, el trigo y el maíz, con una producción anual de más

de 300 millones de toneladas. En el año 2008, en México se sembraron alrededor de 54 mil hectáreas de las que se obtuvieron aproximadamente 1.5 millones de toneladas. El estado de Sinaloa, es el principal productor nacional, ha logrado, en los últimos años, rendimientos superiores a las 313 mil toneladas (SIAP, 2009).

La producción de papa ha disminuido en los países desarrollados tales como Alemania, Polonia y Estados Unidos, en un promedio uno por ciento al año en los últimos 20 años. Mientras que en los países en desarrollo ha aumentado a una tasa promedio del 5 por ciento anual. Los países asiáticos, en particular China y la India, han impulsado este crecimiento (FAO, 2008).

Aunque México no es el país que más produce y consume papa en el mundo, la tendencia de su cultivo en el país es a la alza (FAO, 2008)

### **1.3. Principales plagas y enfermedades de la papa**

La papa se cultiva por multiplicación vegetativa, esto significa para lo cual se plantan los tubérculos. Este tipo de propagación introduce poca variabilidad genética comparada con el uso de la semilla y debido a ésto ofrece mayores riesgos frente a una posible enfermedad que afecte al cultivo (Borba, 2008). Este cultivo es susceptible a más de 300 plagas y enfermedades que se pueden propagar por medio de la semilla, el suelo, implementos de labranza, insectos vectores y por otros medios (Horton, 1992).

Entre las enfermedades provocadas por bacterias se encuentra la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), la sarna común (*Streptomyces scabies*), la pierna negra (*Erwinia spp.*), entre otras. Entre las principales enfermedades causadas por hongos se encuentra la roña por *Spongospora subterranea*; tizón tardío, que es una de las enfermedades más importantes provocado por *Phytophthora infestans*; esclerotiniosis por *Sclerotinia sclerotiorum* y verrugas por *Synchytrium endobioticum*. Entre los nematodos de importancia para la papa se encuentran *Globodera sp.*, el nematodo del quiste y *Meloidogyne spp.*, el nematodo del nudo radicular. Entre las enfermedades virales se encuentran el *Virus del enrollamiento de las hojas* (PLRV), *Virus del mosaico rugoso* (PVY) y el *Virus del mosaico latente* (PVX) y constituyen en

el mundo los principales patógenos de la papa, debido a las graves pérdidas que estos ocasionan tanto en rendimiento como en calidad. Los insectos plaga que afectan a las plantas de papa son chicharritas (*Empoasca* sp., *Aceratagallia* sp. y *Macrosteles* sp.), pulgones (*Myzus persicae* S. y *Macrosiphum euphorbiae* Thomas), mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* Genn) y el Psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* (Salazar, 1996; Gregory & Andrade, 1996). Este último, al alimentarse de la planta, inyecta una toxina que produce la enfermedad llamada amarillamiento de psílido (Rubio-Covarrubias *et al.*, 2000). Además, *Bactericera cockerelli* es considerado como vector de fitoplasmas y estudios recientes han reportado a este insecto como transmisor de tres grupos diferentes de fitoplasmas (16Srl, 16SrII y 16SrXIII) a plantas de Chile, papa y tomate (García-Negro, 2007).

Otras enfermedades, como el brote de hilo y punta morada de la papa, causadas por fitoplasmas han afectado seriamente los rendimientos en el cultivo de la papa en México.

### **1.3.1. Punta morada de la papa**

La punta morada de la papa (PMP) es considerada como la segunda enfermedad en importancia que afecta a este cultivo, después del tizón tardío, y es causada por el fitoplasma denominado "Mexican Potato purple top" (MPPT), el cual pertenece al grupo 16Srl y es identificado principalmente en el follaje de plantas colectadas en campo (Leyva-López *et al.*, 2002). Esta es una enfermedad de importancia mundial ya que afecta a cultivos en América, Europa, Asia y Australia (Maramorosch, 1998). Los síntomas de la PMP se observaron en México desde 1948 y en los últimos años se ha visto un incremento acelerado de la enfermedad, especialmente en la región centro del país (Cadena *et al.*, 2003). Esta enfermedad ha causado graves pérdidas económicas en otras zonas productoras de papa en México. En estudios recientes para determinar la diversidad y distribución geográfica de fitoplasmas asociados a la punta morada de la papa en México, se encontraron cuatro diferentes grupos de fitoplasmas en dicha enfermedad, el grupo del Amarillamiento del áster (16Srl), el grupo Escoba de Bruja del cacahuete (16SrII), el grupo de la enfermedad X (16SrIII)

y el grupo de la Virescencia de la teresita Mexicana (16SrXIII). El grupo 16SrI se encontró distribuido en todas las regiones productoras de papa del país, el grupo 16SrII se detectó en Guanajuato y Sinaloa, el grupo 16SrIII se encontró en Coahuila y Guanajuato, y el grupo 16SrXIII se detectó solamente en Sinaloa (Santos-Cervantes *et al.*, 2010).

## 2. Fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias patógenas de plantas pertenecientes a la clase de los Mollicutes y que causan daños devastadores a aproximadamente 700 especies de plantas alrededor del mundo, resultando en una significativa afectación económica (Carginale *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2007). Estos patógenos miden de 0.2 a 0.8  $\mu\text{m}$ , con genomas de 530 a 1350 kpb, son pleomórficos y como característica propia de los Mollicutes, carecen de pared celular (Bai *et al.*, 2009). A esta clase también pertenecen los micoplasmas, espiroplasmas, acholeplasmas y entomoplasmas (Razin *et al.*, 1998). Además tienen un bajo contenido de guanina y citosina (G+C) de 23-29 mol% (Carginale *et al.*, 2004), la cual es menor que en otros procariontes que es de 25-80 mol%. Este rasgo impone grandes restricciones a la cantidad de información genética disponible, lo que se traduce en sus complejos requerimientos nutricionales y sus modos de vida parásitos o saprófitos (Llácer *et al.*, 1996).

Los fitoplasmas se transmiten a sus hospederos por medio de insectos vectores que se alimentan de los compuestos del floema de las plantas y se replican intracelularmente tanto en la planta como en el insecto. Esto dado a que estos organismos son parásitos obligados, que necesitan de ambos hospederos para dispersarse como lo han comprobado estudios recientes y esta característica provoca la inhabilidad para poderlos cultivar *in vitro* en medios artificiales (Bai, *et al.*, 2009).

## 2.1. Taxonomía

Superreino: Procariota  
Reino: Monera  
Dominio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Clase: Mollicutes  
Género: *Candidatus* (Ca.) Phytoplasma  
(Hogenhout, 2008)

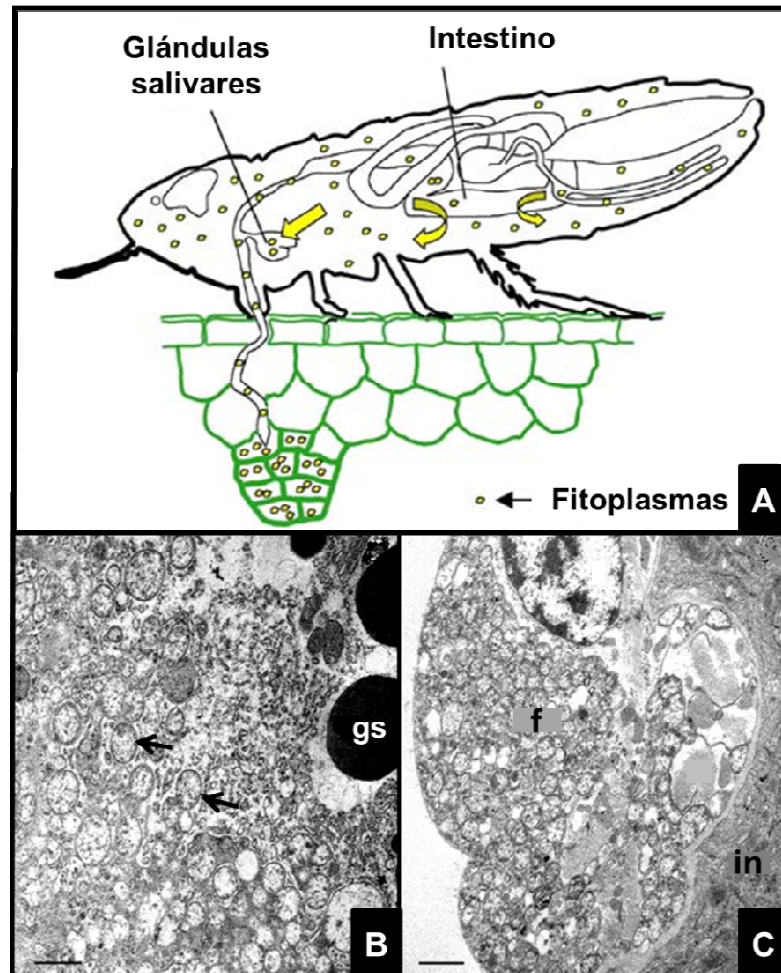
## 2.2. Sintomatología

Los fitoplasmas producen ciertos síntomas en las plantas, los cuales indican su interferencia en el crecimiento y desarrollo normal de la planta. La sintomatología varía con el fitoplasma, la planta hospedera y el estado de infección. Los daños internos pueden causar necrosis de las células del floema y formación en exceso de tejido de floema, resultando en venas dilatadas (Lee *et al.*, 2000). Los daños externos se pueden apreciar en síntomas típicos como la agrupación de brotes axilares en un mismo punto, a lo que se le da el nombre de escoba de bruja; la filodia, al observarse la diferenciación de partes florales en tejidos de hojas; viresencia, cuando las plantas presentan coloración verde en tejidos florales; amarillamiento, esterilidad en las flores, enanismos, apariencia arbustiva al final de los tallos, coloración de rojiza a morada en el ápice, muerte regresiva de ramas en plantas leñosas y declinamiento generalizado (Bertaccini, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008). Las plantas de papa jóvenes infectadas con fitoplasmas presentan, además, síntomas tales como tubérculos áereos y brotes ahilados en los tubérculos (Salazar, 1998).

## 2.3. Fitoplasmas en insecto vector

Los insectos vectores que transmiten fitoplasmas se encuentran en las familias *Cicadellidea*, *Fulgoridea* (chicharritas) y *Psylloidea* (psílidos). Los insectos adquieren a los fitoplasmas al alimentarse de tejido de floema de una planta enferma y

posteriormente los transmiten de ésta a otra planta (Lee *et al.*, 2000; Hanboonsong *et al.*, 2002).



**Figura 1. Distribución de fitoplasmas en insecto vector.** (A) Representación esquemática de la ruta de infección por fitoplasmas en un insecto. (B y C) Micrografías electrónicas de cortes de tejido de un insecto portador de fitoplasmas. (B) Fitoplasmas (flechas) en glándulas salivales cercanas a los gránulos de secreción (gs). (C) Acumulación de fitoplasmas (f) en células musculares alrededor del intestino (in).

Fuente: [www.jic.ac.uk/staff/saskia-hogenhout/insect.htm](http://www.jic.ac.uk/staff/saskia-hogenhout/insect.htm)

En los insectos, los fitoplasmas invaden el intestino y glándulas salivales, entre otros tejidos, donde se acumulan en gran cantidad al replicarse dentro y fuera de las células (Figura 1). Los fitoplasmas tienen que atravesar el intestino y las glándulas salivales para poder llegar a la saliva para una posterior introducción en las hojas de la planta durante la alimentación del insecto, a través de su estilete (Hogenhout *et al.*, 2008). La colonización dentro del insecto puede tomar tres semanas antes de llegar al grado infeccioso, lo que se conoce como período de latencia y puede variar entre especies de insectos. Una vez infectados, los insectos permanecen en ese estado el resto de su ciclo de vida (Christensen *et al.*, 2005).

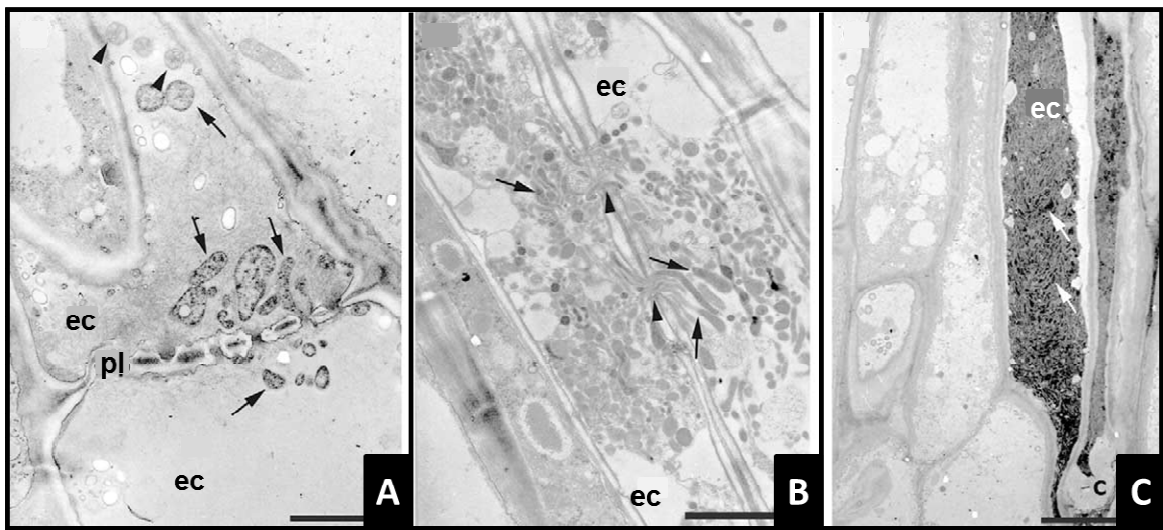
El efecto de los fitoplasmas en los insectos aún no se determina, pero se han encontrado insectos con afectaciones en su estado físico al estar infectados, pero también se pueden beneficiar de este tipo de asociaciones ya que estudios señalan que los insectos muestran en estos casos una mejor capacidad para hibernar y mayor fertilidad y longevidad (Christensen *et al.*, 2005).

#### **2.4. Localización y distribución de fitoplasmas en las plantas**

Los fitoplasmas se transfieren con la saliva de los insectos portadores al floema y se distribuyen sistemáticamente en la planta. Estos organismos son pleomórficos y suficientemente pequeños para moverse libremente a través de los elementos cribosos, que son células sin núcleo y citoplasma reducido (Christensen *et al.*, 2005). Así es como lo han propuesto algunas investigaciones en las que se ha encontrado que los fitoplasmas se dispersan secuencialmente de la hoja inoculada al tallo principal, raíces, hojas superiores y después a las hojas inferiores, al hacer experimentos con la interacción de un insecto vector (*Macrostelus striifrons*) infectado con fitoplasmas, en una planta de crisantemo (*Chrysanthemum coronarium*) (Wei *et al.*, 2004).

Es extremadamente difícil determinar si los elementos cribosos contienen nucleótidos u otros compuestos, ya que los métodos de muestreo conocidos llevan a la contaminación de la savia por el contenido de las células acompañantes, que se encuentran unidas y conectadas a las células alargadas del floema (elementos

cribosos) a través de plasmodesmos (Figura 2), que son canales que atraviesan las paredes celulares, facilitando la comunicación intercelular, que tienen una alta actividad metabólica y proveen todos los compuestos para mantener vivos y funcionales a los elementos cribosos y es probable que sea la fuente de suministro de metabolitos necesarios para el ciclo de vida de los fitoplasmas (Christensen *et al.*, 2005; Geydan & Melgarejo, 2006).



**FIGURA 2. Micrografías electrónicas de cortes longitudinales a través del floema de una planta infectada por fitoplasmas.** (A) Fitoplasmas presentando pleomorfismo (flechas) cercanos a los plasmodesmos (pl) que separan dos elementos cribosos (ec). (B) Fitoplasmas (flechas) observados en dos elementos cribosos (ec) y en plasmodesmos (punta de flecha). (C) Elementos cribosos (ec) tapados por fitoplasmas (flechas). Los plasmodesmos están bloqueados por celulosa (c).

Fuente: Christensen, *et al.* (2005)

Estudios realizados por Siddique *et al.* (1998) sobre la distribución de fitoplasmas asociada a la enfermedad de la papaya australiana, demostraron que estos organismos estaban limitados a células identificadas como elementos cribosos maduros carentes de núcleo pero que estaban vivas, ubicados sobre la pared celular. En contraste, no encontraron el mismo resultado en elementos cribosos de tejidos afectados y por lo tanto, muertos. Los fitoplasmas fueron encontrados en tejidos de



demanda de nutrientes como hojas en crecimiento y raíces considerando que la fuente de suministro, es decir las hojas, se mantenían sanas. Esto es debido a que los elementos cribosos son parte del floema de las plantas vasculares y este tejido transporta carbohidratos producidos como resultado de la fotosíntesis y otras sustancias, hacia los meristemos, que demandan nutrientes por ser tejidos en desarrollo y otros sitios que requieren carbohidratos para su funcionamiento (Cronshaw, 1981).

## **2.5. Organización del genoma de fitoplasmas**

El conocer la secuencia del genoma completo de un organismo permite obtener información sobre la biología del mismo, como el conjunto mínimo de genes para su supervivencia, sus necesidades nutricionales, su metabolismo, así como un mayor entendimiento acerca de su patogenicidad y las interacciones con las plantas hospederas. Hasta la fecha ha sido secuenciado el genoma completo de cuatro fitoplasmas (Tran-Nguyen *et al.*, 2007; Kube *et al.*, 2007).

El primer fitoplasma secuenciado fue el '*Candidatus* Phytoplasma asteris', cepa OY-M (Amarillamiento de la cebolla, mutante M), que contiene un cromosoma de 860,631 pb y dos pequeños extracromosomas [EcOYM (5,025 pb) y pOYM (3,932 pb)]. El cromosoma es una molécula de DNA circular con un contenido del 28% de G + C. Este contiene 754 marcos de lectura abierta (ORFs), lo cual constituye el 73% del genoma total; el 66% de estos ORFs tienen una significativa homología con secuencias ya depositadas en el "GenBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Oshima *et al.*, 2004). Se tiene la secuencia completa de otra cepa de *Ca. Phytoplasma asteris*, AY-WB (Amarillamiento del áster-Escoba de Bruja), que contiene un cromosoma de 706,569 pb y cuatro plásmidos [AYWB-pI (3872 pb), AYWB-pII (4009 pb), AYWB-pIII (5104 pb) y AYWB-pIV (4316 pb)]. El cromosoma es una molécula de DNA circular con un contenido del 27% de G + C. Este contiene 671 ORFs, lo cual corresponde al 72% del genoma total (Bai *et al.*, 2006). El tercer genoma secuenciado fue la cepa australiense *Ca. Phytoplasma australiense* y tiene un cromosoma circular de 879,324 pb, con un contenido de G + C del 27% y un

plásmido de 3700 pb, contiene 839 ORFs, lo cual corresponde al 72% del genoma total (Tran-Nguyen *et al.*, 2008). El último genoma secuenciado completamente es el de *Ca. Phytoplasma mali*, el cual tiene un cromosoma lineal y de menor tamaño (601,943 pb), contiene 671 ORFs, con un contenido menor de G + C (21.4%) y no contiene plásmidos extracromosomales (Kube *et al.*, 2008).

Con base a las secuencias conocidas de los fitoplasmas, se ha determinado que carecen de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos, ciclo de los ácidos tricarbóxicos y fosforilación oxidativa, entre otros genes que intervienen en rutas metabólicas claves para la sobrevivencia de estos organismos (Hogenhout *et al.*, 2008). Además, poseen genes que codifican para la síntesis de folatos, los cuales pueden permitir a los fitoplasmas adaptarse a plantas e insectos diferentes (Oshima *et al.*, 2004), explicando así el hecho de que los fitoplasmas sean parásitos obligados y requieran de las células hospederas de plantas e insectos para completar su ciclo de vida.

Las bacterias que afectan a las plantas tienen diferentes tipos de genes de patogenicidad; sin embargo, el genoma de fitoplasmas posee genes no homólogos a los ya conocidos, sugiriendo así que posiblemente existan otros mecanismos relacionados a la virulencia causada por fitoplasmas (Oshima *et al.*, 2004; Xianling *et al.*, 2010). En el análisis del genoma de fitoplasmas se han identificado proteínas consideradas como posibles factores de virulencia.

## **2.6. Factores de virulencia**

Los factores de virulencia, llamados efectores, son sofisticadas proteínas que comparten características de secuencias funcionales y estructurales con las proteínas de muchas células de las plantas hospederas y que interfieren en los procesos tales como el tráfico intracelular, la expresión de genes y las respuestas de defensa de la planta, ante el ataque de patógenos (Bai *et al.*, 2009).

Los fitoplasmas tienen un sistema de secreción funcional llamado Sec-dependiente, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal. Puesto que los fitoplasmas se encuentran

intracelularmente, la maquinaria Sec transloca desde el fitoplasma, la proteína de virulencia con péptido líder a través de la membrana plasmática y es reconocida por una partícula de reconocimiento de la señal, por lo que la proteína es liberada en el espacio citoplasmático (Bai *et al.*, 2009; González-Pedrajo & Dreyfus, 2003).

Existen efectores, identificados en organismos patogénicos, con motivos eucarióticos que se dirigen al núcleo de las células vegetales. Son capaces de unirse a secuencias de DNA de doble cadena, conduciendo a la activación transcripcional. Se han identificado proteínas efectoras que se unen a las regiones promotoras de los genes de las plantas, por lo que activan los genes de resistencia. Esto, en algunas plantas, induce a la susceptibilidad de las plantas al ataque de patógenos, incluso, al ataque de insectos vectores (Chalupowicz *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2009).

Hoshi *et al.* (2009) identificaron un gen codificante para una proteína de secreción del 'Ca. P. asteris', cepa OY-M, capaz de producir síntomas de enanismo y escoba de bruja en plantas infectadas. Esto lo comprobaron mediante la producción de una planta transgénica de *Nicotiana benthamiana* que expresaba constitutivamente el gen *PAM765*, la cual presentó los mismo síntomas que una planta inoculada con el fitoplasma mediante un insecto vector, sugiriendo que dicho gen codifica para un factor de virulencia responsable de los síntomas ocasionados por el fitoplasma. Este hecho, refuerza las especulaciones de que las proteínas de virulencia de fitoplasmas que interfieren con la producción de síntomas, hacen más atractivas a las plantas para el ataque de insectos, al producir un mayor número de hojas, donde estos pueden poner sus huevos y además alimentarse, transmitiendo el patógeno a las plantas, por lo que dichas proteínas están involucradas, además, en el proceso de dispersión de fitoplasmas (Bai, *et al.*, 2009).

Bai *et al.* (2009) identificaron proteínas secretadas por fitoplasmas de la cepa AY-WB de 'Ca. P. asteris', que fueron llamadas SAP (por sus siglas en inglés correspondiente a proteínas secretadas por el fitoplasma AY-WB), las cuales tienen señales de localización nuclear. Se determinó la presencia de SAP11 en el núcleo de las células vegetales en plantas de China aster (*Callistephus chinensis*), por lo cual determinaron que esta proteína manipula el núcleo de las células induciendo los

síntomas propios de plantas infectadas con fitoplasmas, contrario a lo que Bai *et al.* (2007) habían encontrado en las células del insecto vector *Macrostelus quadrilineatus*, en donde encontraron a SAP11, en las células del intestino y glándulas salivales, pero no en su núcleo.

El gen que codifica para la proteína secretada SAP11 se encuentra en una región del fitoplasma que tiene una secuencia repetida de 331 pares de bases y en la cual también se localizan genes encontrados en unidades móviles hipotéticas del fitoplasma AY-WB y otros fitoplasmas. Los genes de esa región codifican para otras proteínas de secreción (Hogenhout, 2008). La localización del gen que codifica la proteína SAP11 en una unidad móvil hipotética está asociada a una isla de patogenicidad en el genoma del fitoplasma, lo cual la hace considerarse como una proteína relacionada a la virulencia de plantas (Bai *et al.*, 2009).

## **2.7. Interacción fitoplasma-planta**

Las plantas no se comportan como hospedadores pasivos frente a los microorganismos con los que interactúa, sino que activa mecanismos de defensa, los cuales son inducidos por todo tipo de patógenos. Algunos de estos mecanismos actúan como barreras físicas y químicas para evitar la infección de los patógenos. La resistencia a enfermedades producidas por patógenos depende de que la planta sea capaz de reconocer al patógeno al inicio del proceso de infección (Agrios, 2005; Gutiérrez-Camarena, 2006).

El reconocimiento del patógeno dispara una gran gama de mecanismos inducibles de defensa que, se supone, contribuyen a la resistencia de la planta. Muchos de estos mecanismos se deben a la activación de la transcripción de genes específicos, conocidos como genes relacionados con la defensa de la planta, cuya regulación ha sido un amplio objeto de estudio (Gutiérrez-Camarena, 2006). Sin embargo, debido a las condiciones en las que los fitoplasmas se desarrollan en las plantas, el estudio de los mecanismos involucrados en la interacción fitoplasma-planta ha sido limitado (Carginale *et al.*, 2004; Albertazzi *et al.*, 2009; De Luca *et al.*, 2010).

Debido a la reducción de sus genomas, los fitoplasmas carecen de la mayoría de los genes necesarios para sintetizar nucleótidos y otros compuestos, por lo que los toman de su entorno. Es por ello que habitan en sitios ricos en nutrientes, por lo cual probablemente han evolucionado retrogresivamente. Así, sintetizan la mayoría de los metabolitos que estos no pueden, tomados de las células hospederas (Oshima *et al.*, 2004).

Las plantas infectadas con fitoplasmas exhiben una serie de síntomas mencionados anteriormente, que sugieren que estos organismos interfieren en el equilibrio de su metabolismo. Los desórdenes inducidos en las plantas enfermas varían con la especie de fitoplasmas y el estado de infección (De Luca *et al.*, 2010). Análisis bioquímicos y basados en herramientas moleculares, han demostrado que dichos desórdenes en el metabolismo están relacionados con el incremento de las concentraciones de azúcares y almidón en hojas, así como en las especies reactivas de oxígeno; un decremento de carbohidratos solubles y almidón en raíces, así como la inhibición de procesos fotosintéticos y la producción de polifenoles, entre otros procesos (Carginale *et al.*, 2004; Camarena-Gutiérrez, 2006; De Luca *et al.*, 2010). Estos efectos pueden resultar en una reducción de la resistencia de la planta ante la infección de fitoplasmas creando condiciones favorables para la supervivencia del patógeno (Zamharir *et al.*, 2011).

Se han llevado a cabo diversos estudios basados en la identificación de genes diferenciales en plantas infectadas con fitoplasmas relacionados con los procesos metabólicos mencionados anteriormente, encontrando tanto un incremento, como una reducción en su expresión respecto a plantas no infectadas. Sin embargo, la vía por la cual los fitoplasmas afectan la expresión de genes de sus hospederos aún no es clara, pero es posible que más de un mecanismo esté a cargo de la activación o inhibición genética en las plantas (De Luca *et al.*, 2010).

En nuestro grupo de trabajo, Longoria-Espinoza (No publicado) elaboró una biblioteca de cDNAs por hibridación sustractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés) proveniente de plantas de papa infectadas y no infectadas con el fitoplasma "Mexican potato purple top" (MPPT); adicionalmente, identificó genes que codifican

para proteínas involucradas en la respuesta ante dicha infección. De esta biblioteca sustractiva de cDNA se obtuvieron y secuenciaron 500 clonas para su posterior comparación con secuencias de proteínas ya reportadas en el Banco de Genes ("Gene Bank database") del Centro Nacional para la Información de Biotecnología ("NCBI, National Center for Biotechnology Information" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, una vez caracterizadas dichas proteínas, fueron clasificadas de acuerdo a su función celular en las plantas. A partir de esto, en la presente tesis se seleccionaron los siguientes genes para ser analizados con más detalle: Monodehidroascorbato reductasa (MDAR), involucrada en el metabolismo celular; Transportador ABC, proteína asociada a membrana, inhibidor de metalocarboxipeptidasas (MCP In), proteína asociada a estrés (SAP6); dedo de zinc, relacionada con defensa celular y respuesta a estrés; Factor de transcripción 33 (WRKY), que como su nombre lo indica, está involucrado en el proceso de transcripción de DNA; una Proteína de choque térmico 90 kDa (HSP90), relacionada con el plegamiento y destino de proteínas; una proteína de respuesta a etileno (EREB) involucrada con regulación sistémica e interacción con el medio ambiente y una proteína de función desconocida.

Los fitoplasmas son organismos patógenos que causan enfermedades devastadoras en muchos cultivos alrededor del mundo, entre ellos el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) que es de gran importancia económica en el país y particularmente en el estado de Sinaloa. Debido a que estos organismos no se pueden cultivar *in vitro* para su manipulación y estudio, se tiene poca información acerca de su interacción con las plantas hospederas. Sin embargo, debido a la disponibilidad del genoma completo de cuatro fitoplasmas, se han estudiado y clasificado secuencias que codifican proteínas consideradas como posibles factores de virulencia que producen la enfermedad en las plantas infectadas y es importante conocer si se conservan entre diferentes cepas y especies de fitoplasmas, tales como el de MPPT. Además, debido a la introducción de métodos moleculares para identificación de genes que responden ante la infección de fitoplasmas, es posible analizar su nivel de expresión para así poder llegar a un mayor entendimiento acerca de los mecanismos moleculares relacionados en la interacción fitoplasma-planta de papa.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los fitoplasmas son organismos patógenos que causan enfermedades devastadoras en muchos cultivos alrededor del mundo, entre ellos el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) que es de gran importancia económica en el país y particularmente en el estado de Sinaloa. Debido a que estos organismos no se pueden cultivar *in vitro* para su manipulación y estudio, se tiene poca información acerca de su interacción con las plantas hospederas. Sin embargo, la disponibilidad del genoma completo de cuatro fitoplasmas, y otros estudios recientes han identificado y caracterizado secuencias que codifican para proteínas consideradas como posibles factores de virulencia que alteran la fisiología celular de las plantas y modulan la defensa de las plantas hospederas, por lo que es importante determinar si dichos genes se conservan en el genoma del fitoplasma MPPT. Adicionalmente, el grupo de trabajo cuenta con una biblioteca de cDNAs de genes expresados diferencialmente en plantas de papa *in vitro* en respuesta a la infección por el fitoplasma MPPT.

Además, debido a la introducción de métodos moleculares para identificación, caracterización y cuantificación de genes expresados diferencialmente ante la infección de fitoplasmas, es posible conocer los mecanismos moleculares relacionados en la interacción fitoplasma-planta de papa.

#### **IV. HIPÓTESIS**

1. Genes codificantes para proteínas consideradas como posibles factores de virulencia se conservan en el fitoplasma “Mexican potato purple top”
2. Genes seleccionados a partir de una biblioteca de cDNAs asociados con la respuesta de plantas de papa ante la infección por el fitoplasma “Mexican potato purple top” se expresan diferencialmente en plantas infectadas con respecto a no infectadas.



## **V. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Determinar el nivel de expresión de genes involucrados en la interacción planta de papa-fitoplasma “Mexican potato purple top”.

### **2. Objetivos específicos**

1. Identificar genes que codifican para proteínas de virulencia involucrados en el proceso de infección del fitoplasma “Mexican potato purple top” en plantas de papa cultivadas *in vitro*.
2. Medir el nivel de expresión de genes seleccionados a partir de una biblioteca de cDNAs asociados con la respuesta de defensa de plantas de papa ante la infección por el fitoplasma “Mexican potato purple top” en plantas infectadas con respecto a no infectadas.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Materiales**

#### **1.1. Material vegetal**

El material vegetal utilizado fueron plantas de papa de la variedad Fianna cultivadas *in vitro*, provenientes de brotes de tubérculos positivos para fitoplasmas, y libres de otros patógenos. El fitoplasma presente en las plantas de papa cultivadas *in vitro* pertenece al grupo 16Srl denominado “Mexican Potato purple top phytoplasma” (MPPT) (Tesis Doctoral Longoria-Espinoza, en proceso).

#### **1.2. Oligonucleótidos utilizados**

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron distintos juegos de oligonucleótidos. La detección de fitoplasmas se realizó por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) anidado, utilizando los oligonucleótidos específicos R16mF2, R16mR1, R16F2n y R16R2 (Cuadro 1), localizados en la región 16S rRNA (Gundersen & Lee, 1996), cuya técnica se detalla en la apartado VI, sección 2.3. Para la detección de genes de virulencia se llevó a cabo la técnica de RT-PCR (PCR en transcripción reversa) utilizando los oligonucleótidos AYWB370F y AYWB370R (Cuadro 1), que amplifican el gen de la proteína de virulencia SAP11; así como los oligonucleótidos AYWB402Fy AYWB402R (Cuadro 1), que amplifican el gen de la proteína de virulencia SAP30. También se amplificó el gen actina como control de la reacción de RT-PCR (Apartado VI, sección 2.6) y para la confirmación de la técnica de síntesis de cDNA (Apartado VI sección 2.7.3.) utilizando los oligonucleótidos Act2F y Act2R (Cuadro 1) (Bai *et al.*, 2009). Los oligonucleótidos mencionados fueron sintetizados por “Sigma-Aldrich”.

Para determinar la expresión relativa de genes involucrados en la respuesta de defensa de la planta de papa ante la infección del fitoplasma MPPT, se llevó a cabo la técnica de PCR en tiempo real. Se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de los genes de interés (MDAR, Transportador ABC, Proteína asociada a membrana, MCP In, SAP6, Dedo de Zn, WRKY, HSP90, EREB y una proteína de

función desconocida), reportadas como marcadores de secuencias etiquetadas (ESTs, del inglés *Expressed sequence tag*) en la base de datos Gene Bank del NCBI (Longoria-Espinoza y Leyva-López, 2010). El diseño de oligonucleótidos se hizo utilizando el programa “The ProbeFinder software” (versión 2.45; Universal ProbeLibrary, Roche). Los oligonucleótidos codificantes para el gen actina (Cuadro 2), se diseñaron con el programa “Primer3” (versión 0.4.0; Primer-Blast, NCBI) a partir de la secuencia reportada por Drouin y Dover (1991). Los oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real fueron sintetizados por “Roche Applied Science” y sus características se detallan en la Cuadro 2.

**Cuadro 1. Relación de oligonucleótidos para detección de fitoplasmas por PCR anidado y detección de genes de virulencia por RT-PCR.**

<b>NOMBRE DEL OLIGO</b>	<b>SECUENCIA 5'→3'</b>	<b>TAMAÑO AMPLICÓN</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>R16mF2</b>	CATGCAAGTCGAACGGA	1450 pb	Gundersen & Lee, 1996
<b>R16mR1</b>	CTTAACCCCAATCATCGA		
<b>R16F2n</b>	GAACGGCGGTGTGTACAAACCC	1250 pb	
<b>R16R2</b>	TGACGGGCGGTGTGTACACCCG		
<b>AYWB370F</b>	GCGAGATCTTCACCTAAAAAGAATCTAGTG	270 pb	Bai <i>et al.</i> , 2009
<b>AYWB370R</b>	GCTGTGCGACTTATTTTTTAGAATCATCAGGTTGTTTTGAAG		
<b>AYWB402F</b>	GCGAGATCTACTTGTATAATAATTCTGAAGG	302 pb	
<b>AYWB402R</b>	GCGGTGCGACTTATTTTTCTTTTTATTAGGTTTTG		
<b>Act2F</b>	ATCGTCAGGGTGAAAGA	300 pb	Zabaleta <i>et al.</i> , 2008
<b>Act2R</b>	ATACCGGGGAACATGGTAGT		

**Cuadro 2. Relación de oligonucleótidos para el análisis de expresión relativa por PCR en tiempo real**

NOMBRE OLIGOS	ANOTACIÓN	ACCESIÓN	SECUENCIA 5'→3'	TAMAÑO (nt)	TM (°C)	TAMAÑO AMPLICÓN (pb)	OBSERVACIONES
<b>Act3'F</b>	<i>S. tuberosum</i> PoAc58 gene for actin	X55749	GGGGACCACACCACCTAATA	20	60	97	Diseñados a partir de la secuencia del gen Actina en <i>Solanum tuberosum</i> (Drouin y Dover, 1991)
<b>Act3'R</b>			GGGACGTTGAAAACCTGGAA	20	60		
<b>MDARF</b>	Monodehydroxiascorbate reductase	HS106804	GGGCGGTAACATCACAGAAC	20	60	60	Diseñados a partir de secuencias ESTs producto de biblioteca SSH de cDNA de plantas de papa <i>in vitro</i> infectadas con el fitoplasma MPPT (Longoria-Espinoza, 2011)
<b>MDARR</b>			ACCGAGCTCCCTAGATCCAT	20	60		
<b>T-ABCF</b>	Phosphate ABC transporter I family member 17	HS106738	AAACAGCATGCCAATCTTCC	20	60	93	
<b>T-ABCR</b>			TGGGAACCATCTTCCAACCTC	20	60		
<b>Prot-MembF</b>	Putative Membrane related protein	HS106777	CCCCCATTCGAATCGTTAAAA	20	59	62	
<b>Prot-MembR</b>			CGAAACCCTCTTCTCTTCTGC	21	60		
<b>MCP-InF</b>	Metalloprotease inhibitor precursor	HS106801	TCGCCCTTTACGATCAATTC	20	60	98	
<b>MCP-InR</b>			GCACGGGGTAGGGTATTTTT	20	60		
<b>SAP6F</b>	Stress-associated protein 6	HS106758	TGCCTTCCTCAATACAAGTGC	21	59	61	
<b>SAP6R</b>			TCGAAGAACCAGAGGTCCAT	20	59		
<b>ZnFF</b>	Uncharacterized zinc finger protein	HS106788	CTAATCAAGGTTGCCGAAGC	20	59	63	
<b>ZnFR</b>			GGCTGCCTCAGTCAACAGTA	20	59		
<b>Fac33F</b>	WRKY type Transcription factor 33	HS106757	GCTTCTTGGATTTTCACTACCTTT	24	59	66	
<b>Fac33R</b>			GATGATGGATACAATTGGAGGAA	23	60		
<b>HSP90F</b>	Heat shock protein 90	HS106768	CAACGCAGAGAACTCCATCA	20	59	65	
<b>HSP90R</b>			ACTTGTCATTCTTGCTGCATCA	23	59		
<b>EREBF</b>	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-12	HS106742	CCCTTTCCTTGGATCACGTA	20	60	63	
<b>EREBR</b>			GGGTATCAGACAGCGTCCTT	20	59		
<b>UnkonwnF</b>	Unknown sequence	HS106781	GCCCTCTAATCCGATTTTCC	20	60	88	
<b>UnkonwnR</b>			TCAGGTGTTTTCAGAATCGAGA	22	60		

## **2. Métodos**

### **2.1. Propagación *in vitro* de plantas de papa**

Las plantas de papa sanas e infectadas con fitoplasmas se propagaron periódicamente (cada 30 o 40 días), cortando los tallos por esquejes con un entrenudo, quitando hojas, peciolos y raíces. Se colocaron en cajas magenta con medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido, se sellaron y se colocaron en cámara de crecimiento a temperatura a 25°C, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Al momento del corte de las plantas para su propagación, se tomaron muestras de aproximadamente 0.3 gramos de tejido de cada planta las cuales fueron colocadas en tubos "Eppendorf" de 1.5 ml para posteriores análisis.

### **2.2. Extracción de DNA total**

Para la extracción de DNA total de tejido (tallos y entrenudos) tanto de la planta como del patógeno, se utilizó el método del CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio) al 3% propuesto por Zhang *et al.* (1998) con algunas modificaciones hechas por Leyva-López *et al.* (1999). Cada muestra fue macerada mecánicamente dentro del tubo de 1.6 ml, el cual contenía 200 µl de buffer CTAB 4% (1.4 M de NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.2% de mercaptotanol) previamente disuelto a 60 °C.

Una vez macerado el tejido se adicionaron 600 µl de CTAB y se incubó a 60°C por 30 minutos, agitándose por inversión cada 5 min. Después se agregaron 600 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión varias veces. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se transfirió la fase superior acuosa a otro tubo previamente etiquetado. Se adicionaron 20 µl de RNAsa (1µg/ µl) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Posterior a la incubación se adicionaron 600 µl de isopropanol al 100% a -20°C para precipitar el DNA y se centrifugó por 8 min a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó por 4 min a 13 000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó

secar la pastilla que contenía el DNA. Finalmente, se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C.

### **2.3. Detección molecular de fitoplasmas por PCR anidado**

Las muestras de DNA de plantas de papa se analizaron por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidado con la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brazil), utilizando los oligonucleótidos universales R16mF2 y R16mR1 para la primera reacción y R16F2n y R16R2 (Cuadro 1) para la segunda reacción, que amplifican un fragmento esperado de 1450 pb y 1250 pb, respectivamente, de la región 16SrDNA de fitoplasmas para identificar plantas infectadas y no infectadas por fitoplasmas. Además de las muestras de DNA total, se incluyó un control positivo interno y un control negativo para evitar resultados falsos.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador automático (iCycler-BioRad) y sujeto a las siguientes condiciones: 94°C por 4 min; 35 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C por 1 min, 60°C 1min y 72°C por 2 min; un ciclo a 72°C durante 5 min y 4°C hasta su enfriamiento. Para la reacción del PCR anidada se utilizó el mismo protocolo que en la primera reacción, sólo se cambió la temperatura de 60°C a 55°C y se utilizó como muestra el producto de PCR de la reacción anterior diluida con una relación 1:30 en agua bidestilada (Santos-Cervantes, 2009).

Se realizó un análisis electroforético para la detección de fitoplasmas utilizando como muestra el producto de PCR anidado el cual se cargó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5µg/ml) que se corrió en TAE 1X. Se incluyó un marcador de peso molecular para determinar que el tamaño de las bandas obtenidas coincidiera con el tamaño esperado del fragmento.

### **2.4. Extracción de RNA total de plantas de papa *in vitro***

Para la extracción del RNA total se utilizaron tallos y entrenudos de plantas de papa *in vitro* infectadas y no infectadas con el fitoplasma MPPT.

Los explantes provenientes de dichas plantas se cortaron en pequeños trozos  $\leq 0.5$  cm se colocaron en tubos de 1.6 ml, agregando 50  $\mu$ l de RNAlater, (RNAlater®Tissue Collection Applied Biosystems) la cual es una solución utilizada para estabilizar y proteger el RNA en muestras de tejido fresco, pasada una hora se eliminó totalmente la solución estabilizadora y se secó completamente el tejido colocándolo de otro tubo. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de RNA para la cual se adicionaron 175  $\mu$ l de solución de lisis y 25  $\mu$ l de Plant RNA isolation (Plant RNA Isolation Aid, Applied Biosystems) que se une a los contaminantes, tales como polifenoles y polisacáridos que están normalmente presentes en los tejidos vegetales. Se maceró totalmente el tejido con pistilos estériles, se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante que contenía el RNA y se colocó en un nuevo tubo de 1.6 ml y se adicionó un volumen equivalente de etanol al 64% (aproximadamente 500  $\mu$ l) y se homogenizó por inversión. La solución resultante se agregó a un filtro ensamblado en un tubo nuevo, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto, el filtro se separó y se eliminó la fracción líquida que pasó por el filtro. Se adicionaron 700  $\mu$ l de solución de lavado #1 al centro del filtro y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto; se retiró el filtro y se colocó en un tubo nuevo para adicionar 500  $\mu$ l de solución de lavado # 2/3, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto, se adicionó de nuevo una alícuota de 500  $\mu$ l de solución de lavado # 2/3 repitiendo el lavado. La columna se colocó en un tubo estéril libre de RNasas y se etiquetó correctamente, se adicionaron 50  $\mu$ l de solución de elución precalentada a 70-80 °C y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 segundos. Se tomó 10  $\mu$ l de la solución obtenida y se agregó al centro del filtro y se centrifugó de nuevo, con la finalidad de obtener una máxima recuperación de RNA total

El RNA total obtenido se sometió a un tratamiento con DNasa (DNA-free™ Kit, Applied Biosystems) con la finalidad de eliminar residuos de DNA genómico. Se adicionaron 5  $\mu$ l de Buffer de DNase 10X y 1  $\mu$ l de rDNase I a la solución de RNA total, y se mezcló cuidadosamente por pipeteo. Se Incubó a 37 °C por 30 minutos, posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ l del inactivador de la enzima (DNase Inactivation Reagent), se mezcló por pipeteo cuidadosamente, se incubó por 2 minutos a



temperatura ambiente mezclando cuidadosamente de manera ocasional, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1.5 minutos, se transfirió el sobrenadante con mucho cuidado a un tubo nuevo correctamente etiquetado estéril y libre de RNasas y almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5. Cuantificación y evaluación de la calidad de RNA total

Se tomaron 2  $\mu\text{l}$  de RNA total obtenido y 2  $\mu\text{l}$  de agua estéril Milli-Q y 1  $\mu\text{l}$  de buffer de carga (colorante G) para el análisis de calidad por electroforesis, realizado en gel de agarosa al 2% teñido con una solución de bromuro de etidio, a un voltaje de 75 V durante 1:20 hrs. Los fragmentos de RNA total generados se visualizaron con luz UV en un fotodocumentador de imágenes (Geldoc, Biorad, USA).

La concentración y pureza del RNA total obtenido se determinaron por la medición de su absorbancia a 230, 260 y 280 nm por medio de análisis de espectrofotometría. Se calculó el ratio de las lecturas de absorbancia de  $A_{260} / A_{230}$ , cuyo valor debe ser mayor o igual a 2, para asegurar que la muestra no estuviera contaminada con polifenoles y polisacáridos. También se determinó el ratio de las lecturas de absorbancia de  $A_{260} / A_{280}$  el cual debe ser de un valor de 1.7 a 2.1, que indica que el RNA no tiene contaminación por proteínas, según lo estipulado en el protocolo del kit de extracción de RNA (Ambion).

Se prepararon diluciones de cada muestra con una relación 1:100 en buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8.1 mM EDTA). La concentración se calculó utilizando la siguiente relación:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Factor de dilución} \times 40$$

Donde:

- Factor de dilución =  $\frac{\text{Volumen total de dilución}}{\text{Volumen de RNA diluido}}$
- 1 unidad de  $A_{260} = 40\mu\text{g ssRNA/ml}$

## **2.6. Detección molecular de genes codificantes para proteínas de virulencia por RT-PCR**

### **2.6.1. Síntesis de la cadena complementaria de DNA. Primer paso**

Posterior a la extracción del RNA total de plantas infectadas y no infectadas se procesaron las muestras mediante la técnica de RT-PCR. Como primer paso se llevó a cabo la síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) a partir del RNA total, utilizando la enzima transcriptasa reversa Smart M-MLV-RT (Clontech) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, así como los oligonucleótidos de reversa de los genes que codifican para las proteínas de virulencia SAP11 (AYWB370R) y SAP30 (AYWB402R) (Cuadro 1). Además, se utilizó el oligonucleótido de reversa Act2R (Cuadro 1) del gen actina como control de la reacción. El primer paso consistió en una mezcla con 300 ng de RNA total de cada muestra, 2 µl del primer reversa de cada gen a una concentración de 20 µM y se agregó agua destilada estéril para llevar a un volumen de 10 µl. La mezcla se incubó por 3 minutos a 70°C. Posteriormente, a cada tubo se le agregó una mezcla que contenía 4 µl de First-Strand Buffer 5X, 2µl de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 2 µl de ditioneitol (DTT) 100 mM, y 1µl de inhibidor de RNasas; posteriormente se agregó 1 µl de enzima Smart M-MLV-RT a cada tubo y se incubaron a 42°C por 60 minutos y después a 70°C por 15 minutos.

### **2.6.2. PCR para la detección de genes codificantes para proteínas de virulencia. Segundo paso**

Posterior a la síntesis de cDNA, se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar los genes que codifican para las proteínas de virulencia SAP11 y SAP30. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático (iCycler-BioRad). Para amplificar el gen que codifica la proteína SAP11 (AYWB370) se llevó a cabo una mezcla con 2.5 µl de Buffer 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido AYWB370F y AYWB370R (Cuadro 1) a 10 pmol/µl, 0.2 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/ µl; Invitrogen), 1.5 µl de cDNA y agua destilada estéril para obtener un volumen final de 25 µl. Las

condiciones del termociclador fueron las siguientes: 95°C por 4 min; 35 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 1 min, un gradiente de temperatura de 69°C a 79°C por 45 seg y 72°C por 1 min; un ciclo a 72°C durante 5 min y 4°C hasta su enfriamiento.

Para amplificar el gen que codifica la proteína SAP30 (AYWB402) se llevó a cabo una mezcla con 2.5 µl de Buffer 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.8 µl de dNTPs 10 mM, 0.8 µl de cada oligonucleótido AYWB402F y AYWB402R (Cuadro 1) a 10 pmol/µl, 0.2 µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 1.5 µl de cDNA y agua destilada estéril para obtener un volumen final de 25 µl. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 95°C por 4 min; 35 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 1 min, un gradiente de temperatura de 65°C a 70 °C por 45 seg y 72°C por 1 min; un ciclo a 72°C durante 5 min y 4°C hasta su enfriamiento. El gradiente de temperatura se llevó a cabo para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos.

Se amplificó el gen actina como control de la reacción, llevando a cabo una mezcla con 2.5 µl de Buffer 10X, 2.0 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 1.25 µl de cada oligonucleótido Act2F y Act2R (Cuadro 1) a 10 pmol/µl, que amplifican un fragmento de 300 pb; 0.2 µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 1 µl de cDNA y agua destilada estéril para obtener un volumen final de 25 µl. Las condiciones del termociclador automático fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos; 1 ciclo a 72°C por 5 minutos

Se utilizó el gen actina como control de la reacción, ya que es de expresión constitutiva en todas las células vegetales independientemente del tejido, edad u otra condición de la planta (Zabaleta *et al.*, 2008). Como control positivo para amplificar el gen actina se sometió a la misma reacción una muestra de DNA genómico de una planta de papa *in vitro* no infectada.

El producto de PCR se observó en un gel de agarosa al 1% por la técnica de electroforesis.

### **2.6.3. Purificación de los productos de PCR**

La purificación de los productos de PCR se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor del Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega).

Se corrió un gel de agarosa con las muestras utilizando protocolos descritos anteriormente en este trabajo. Este fue observado en un transiluminador con emisiones de luz UV. El tiempo de irradiación para cortar las bandas fue el mínimo. Al tubo Eppendorf con la banda de interés se le agregaron 10  $\mu$ l de “membrane binding solution” por cada 100 mg de gel de agarosa (v:v), se agitó en vortex, la mezcla se incubó de 50-60°C hasta que la agarosa se disolvió por completo agitando cada 2 minutos para aumentar el radio de contacto. Se transfirió la mezcla del gel disuelto a la columna ensamblada y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto y se eliminó el líquido que pasó al tubo colector, posteriormente se lavaron las columnas y se le adicionaron 700  $\mu$ l de solución de lavado y se centrifugó de nuevo a 14,000 rpm por 1 minuto; se eliminó lo retenido en el tubo colector, el lavado se repitió ahora con 500  $\mu$ l de solución de lavado y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó cuidadosamente lo retenido en el tubo colector y se centrifugó nuevamente con la columna ensamblada por 1 minuto a 14,000 rpm. Cuidadosamente se transfirió la columna a un tubo nuevo y se le adicionaron 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna cuidando de no picar la membrana con la punta de la pipeta. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y después se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Finalmente se decantó la microcolumna y se almacenó el DNA de a -20°C. Para corroborar la recuperación del DNA, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% para visualizar la banda de DNA.

### **2.6.4. Ligación de productos de PCR en el vector de clonación**

Una vez purificados los fragmentos de DNA de fitoplasmas amplificados por PCR se ligaron en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector System (Promega Corporation). El vector pGEM-T posee en los extremos una base de timinas y el fragmento amplificado por PCR extremos con adeninas, que por complementariedad

y con la acción de la enzima ligasa permite el recirculamiento del vector con el fragmento amplificado. La reacción de ligación se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 5 µl de DNA amplificado por PCR purificado, 0.5 µl del vector (25 ng/ µl) 7.5 µl de Buffer de clonación (2X), 1 µl de T4 DNA ligasa (3U/ µl) y 1.0 µl de agua bidestilada estéril, en un volumen total de reacción de 15 µl. Posteriormente la reacción se incubó a 4°C durante toda la noche y se almacenó a - 20°C hasta su utilización.

#### **2.6.5. Transformación de células competentes**

El producto de la ligación se utilizó en el proceso de transformación de *Escherichia coli* DH $\alpha$  (Promega) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para el proceso de transformación se utilizaron cajas petri (dos por cada ligación) con LB sólido, ampicilina (100 mg/ml), IPTG (200ng/mL) (isopropil- $\beta$  D-tiogalactopiranosida) y X-Gal (20ng/mL). (5-bromo-4cloro-3i-ndoli- $\beta$ -D galactopiranosida).

#### **2.6.6. Extracción de DNA plasmídico (minipreps)**

Para verificar si las células tenían el fragmento de interés insertado en el vector, se realizó un PCR directamente de las colonias, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para amplificar el gen de interés. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%.

Para realizar la extracción del DNA plasmídico se crecieron las células recombinantes (de color blanco) por 16 horas en LB líquido con ampicilina a 37°C y agitación a 250 rpm. Posteriormente se procedió a la extracción del DNA plasmídico (el vector con el fragmento del fitoplasma insertado), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit.

#### **2.6.7. Secuenciación y análisis**

La secuenciación de clonas se realizó utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, empleando un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied

Biosystems, Foster City, CA) en el laboratorio de Química de DNA del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias reportadas en el Banco de genes (GenBank) del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI-National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nih.gov/>), empleando el programa BLAST-N de dicho sitio para conocer el porcentaje de identidad genética existente con secuencias ya reportadas y depositadas en el banco.

## **2.7. Selección y procesamiento de muestras de plantas de papa *in vitro* para el análisis de expresión diferencial por PCR en tiempo real**

### **2.7.1. Plantas infectadas/no infectadas por fitoplasmas**

Para llevar a cabo un análisis de la expresión diferencial de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas en plantas de papa, se clasificaron en infectadas y no infectadas, para lo cual se tomó tejido de tallos y entrenudos de plantas se llevó a cabo una extracción de DNA por el método de CTAB y una detección de fitoplasmas por PCR anidado, siguiendo la metodología indicada en el apartado VI secciones 2.2 y 2.3, respectivamente. Una vez que las plantas se clasificaron en infectadas y no infectadas por fitoplasmas, se tomó nuevamente tejido para posteriores análisis

### **2.7.2. Plantas seleccionadas y clasificadas por síntomas**

Se seleccionaron y clasificaron por triplicado aquellas plantas de papa *in vitro* que presentaban síntomas asociados a enfermedades fitoplásmicas, como escoba de brujas, raíces aéreas, tubérculos aéreos y amarillamiento (Figura 1), así como plantas que no presentaban síntomas. Se tomaron muestras de tejido de tallos en puntos cercanos al síntoma de interés para posteriores análisis.

### 2.7.3. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Se realizó una extracción de RNA a cada una de las plantas seleccionadas con el Kit Plant RNA Isolation Aid (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, como se indica en el apartado VI, sección 2.4, así como una cuantificación y evaluación de la calidad de RNA total como se indica en la el apartado VI, sección 2.5.

Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA a cada una de las muestras de RNA total utilizando Oligo-dT y la enzima transcriptasa reversa Smart M-MLV-RT (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante como se indica en el apartado VI, sección 2.6.1.

La concentración y pureza del cDNA obtenido se determinó por la medición de su absorbancia a 260 y 280 nm por medio de análisis de espectrofotometría. Se calculó el ratio de las lecturas de absorbancia de  $A_{260} / A_{280}$  el cual debe ser de un valor de 1.7 a 2.1, que indica que el RNA no tiene contaminación por proteínas.

Se prepararon diluciones de cada muestra con una relación 1:100 en buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8.1 mM EDTA). La concentración se calculó utilizando la siguiente relación:

$$[\text{cDNA } \mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Factor de dilución} \times 33$$

Donde:

- Factor de dilución =  $\frac{\text{Volumen total de dilución}}{\text{Volumen de cDNA diluido}}$
- 1 unidad de  $A_{260} = 33\mu\text{g ssDNA/ml}$

Para determinar la síntesis exitosa de cada cDNA de muestras de plantas de papa, se llevó a cabo un PCR utilizando los oligonucleótidos para amplificar el gen actina, llevando a cabo una mezcla con 2.5  $\mu\text{l}$  de Buffer 10X, 2.0  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0.5  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM, 1.25  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido, Act2F y Act2R (Cuadro 1) a 10 pmol/ $\mu\text{l}$ , que amplifican un fragmento de 300 pb; 0.2  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerasa

(Invitrogen), 1 µl de cDNA y agua destilada estéril para obtener un volumen final de 25 µl. Las condiciones del termociclador automático fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos; 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

## **2.8. Medición de la expresión relativa de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas por PCR en tiempo real**

Se llevó a cabo un análisis de la expresión relativa de diez genes que codifican proteínas involucradas en la respuesta de defensa de plantas de papa ante la infección del fitoplasma MPPT (MDAR, Transportador ABC, Proteína asociada a membrana, MCP In, SAP6, Dedo de Zn, WRKY, HSP90, EREB y una proteína de función desconocida) por la técnica de PCR en tiempo real.

Se llevó a cabo un primer análisis de dichos genes a nivel de RNA mensajero, usando un cDNA proveniente de una planta infectada y de una planta no infectada por fitoplasmas, analizadas por PCR anidado, para lo que se utilizaron tres réplicas técnicas. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de los mismos genes en plantas que presentan distintos síntomas asociados a enfermedades fitoplásmicas, los cuales son el síntoma de escoba de bruja, amarillamiento, presencia de tubérculos aéreos y presencia de raíces aéreas, utilizando tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por muestra.

Las reacciones constaron de un volumen final de 10 µl, compuestos por 5 µl de SYBR GREEN PCR Master Mix (Qiagen), 1 µL de cada oligonucleótido (200 nM) (Cuadro 2), 1 µL de ADNc (50 ng) y 2 µl de agua Milli-Q. La PCR constó de las siguientes condiciones: 95 °C por 5 min, 45 ciclos a 95 °C por 5 seg, 60 °C por 10 seg, así como un paso de variación de temperatura de 70 a 90 °C para obtener una curva de disociación (*Melt step*), realizados en una máquina Rotor–Gene Q (Qiagen) y usando el software Rotor–Gene Q – Pure detector versión 1.7 (Qiagen) para la obtención de los datos.



La relación de la expresión de cada gen se calculó mediante la función  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (método presentado por PE Applied Biosystems [Perkin Elmer, Forster City, CA.

### 2.8.1. Método de determinación de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

El “método delta-delta”, está basado en una ecuación presentada por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forter City, CA). Se trata de un modelo matemático para comparar resultados de expresión relativa entre tratamientos, en PCR en tiempo real, cuya ecuación puede ser expresada de la siguiente manera:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-[\Delta Ct \text{ muestra planta infectada} - \Delta Ct \text{ muestra planta no infectada}]}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$\Delta Ct$  muestra planta infectada = Ct gen de interés – Ct gen normalizador, obtenidos de la amplificación en la muestra experimental.

$\Delta Ct$  muestra no infectada = Ct gen de interés – Ct gen normalizador, obtenidos de la amplificación en la muestra no infectada.

La eficiencia de amplificación en tiempo real, tanto del gen de interés como del gen de referencia, con un valor  $E = 2$ , es la condición óptima sobre todo cuando son idénticas entre sí.

La cuantificación relativa siempre está basada en un transcrito de referencia. (Pfaffl, 2001).

Los rangos de expresión considerados como significantes se encuentran en los rangos  $>1.5$  veces ó  $< 0.67$  veces (Liu, *et al.*, 2007), o bien, en un rango de 1.5 a -1.5 veces de cambio en la expresión.

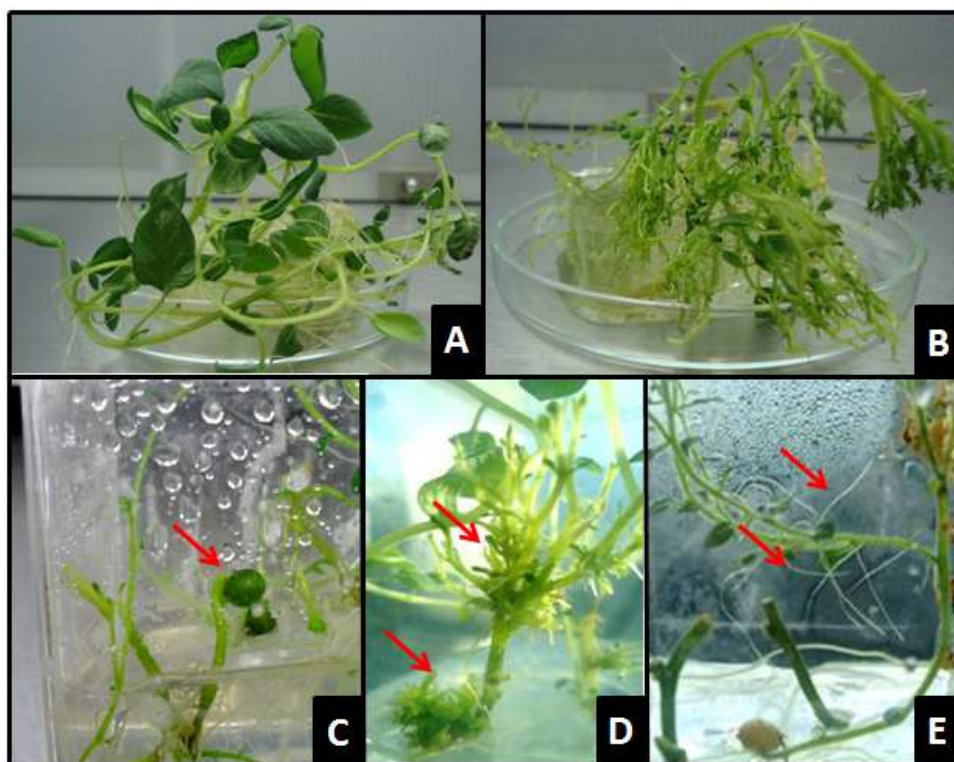
### **2.8.2. Análisis estadístico**

Para analizar estadísticamente los resultados de la expresión relativa de genes de respuesta en plantas de papa ante la infección por el fitoplasma MPPT a nivel de síntomas, se llevó a cabo un análisis de medias de Tukey con un nivel de significancia del 5%, usando los valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de cada réplica biológica analizada, presentando los diferentes síntomas (Amarillamiento, tubérculos aéreos, escoba de bruja y raíces aéreas). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus (versión 2.0, Statistical Corp). Los resultados se muestran gráficamente por medio de gráficas de cajas que brinda el mismo paquete estadístico.

## VII. RESULTADOS

### 1. Síntomas de plantas de papa *in vitro* infectadas con fitoplasmas

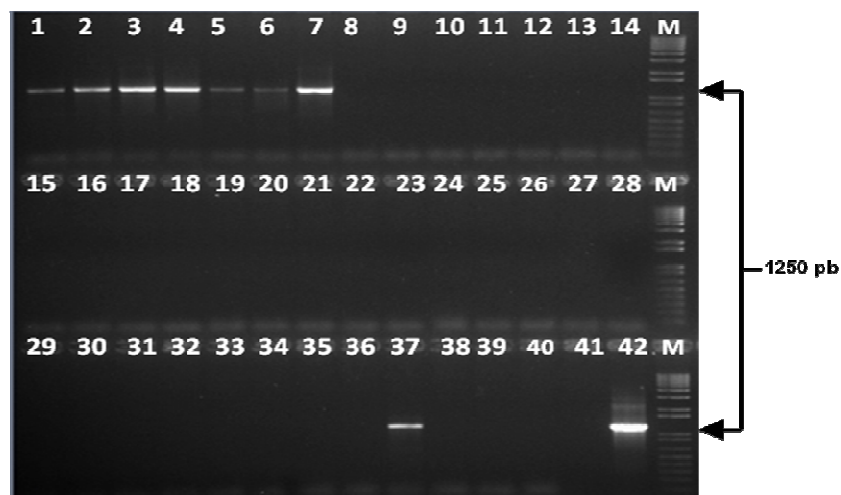
En el establecimiento de plantas de papa *in vitro*, indicado en el apartado VI, sección 2.1, se obtuvieron plantas infectadas y no-infectadas con fitoplasmas. Las plantas positivas para fitoplasmas presentaron síntomas característicos de la enfermedad de manera similar a lo observado en campo (Figura 3), tales como escoba de brujas, brotes ahilados, tubérculos aéreos, amarillamiento, raíces aéreas.



**Figura 3. Síntomas en plantas de papa *in vitro* infectadas con el fitoplasma “Mexican potato purple top”.** Se muestran plantas asintomáticas (A) y sintomáticas (B). Específicamente se observaron los síntomas (flechas rojas) de tubérculos aéreos (C), escoba de brujas, amarillamiento (D) y raíces aéreas (E).

## 2. Detección molecular de fitoplasmas en plantas de papa cultivadas *in vitro*

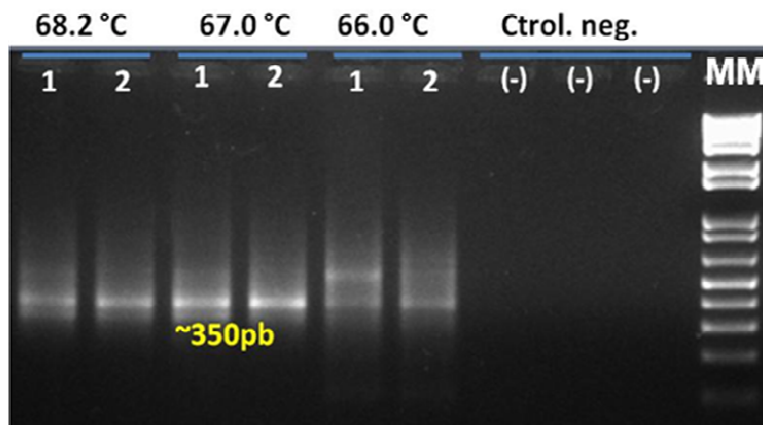
Implementando la técnica de PCR anidada y usando como templado el DNA de muestras de plantas de papa cultivadas *in vitro*, así como el par de oligonucleótidos R16mF2/R16mR1 seguidos por R16F2n/R16R2 (Cuadro 1), se identificaron 8 plantas infectadas con fitoplasmas, mostrando una banda correspondiente al tamaño esperado de fragmentos de aproximadamente 1250 pb, producto del PCR anidado, coincidiendo con el control positivo (Figura 4, carriles 1-7 y 37)



**Figura 4. Electroforesis de productos amplificados por PCR anidado para detección de fitoplasmas.** Carriles 1-40: muestras de plantas de papa; carril 41: control negativo (-); carril 42: control positivo (+); M: marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies, Brasil).

### 3. Detección de genes codificantes para proteínas de virulencia utilizando la técnica de RT-PCR.

Mediante la técnica de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican el gen AYWB402 (Cuadro 1) que codifica para la proteína SAP30 (Bai, *et al.*, 2009) se amplificó un fragmento de aproximadamente 350 pb en muestras de plantas sintomáticas y no sintomáticas (Figura 5). Se llevó a cabo un gradiente de temperaturas las cuales fueron desde 65°C a 70°C. Las temperaturas a las cuales los oligonucleótidos utilizados se hibridaron con la cadena molde de cDNA y amplificaron el fragmento obtenido fueron a 66°C, 67°C y 68.2°C, siendo la temperatura de 67°C a la cual se obtuvo un fragmento de mayor intensidad.



**Figura 5. Detección de genes de virulencia por RT-PCR** Se obtuvo un fragmento de 350pb en muestras de plantas sintomáticas (carriles 1) y no sintomáticas (carriles 2) a diferentes temperaturas de alineamiento; (-): corresponden a los controles negativos de la reacción; M: marcador de peso molecular de 1Kb

Según Bai *et al.* (2009) el fragmento esperado de esta amplificación es de 220 pb, lo cual fue distinto en este resultado, por lo que era importante conocer la secuencia de dicho fragmento para corroborar que se amplificó el gen codificante para la proteína de virulencia SAP30.

No se amplificó el fragmento esperado correspondiente al gen AYW370 que codifica para la proteína SAP11 llevando a cabo la técnica de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican dicho gen (Cuadro 1).

### 3.1. Análisis de secuencias

La secuenciación del fragmento obtenido con los oligonucleótidos AYWB402F y AYWB402R (Cuadro 1) y su análisis por comparación con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI mostró una similitud de 97 a 99% de con secuencias de genes estructurales en plantas (Cuadro 3), sugiriendo que el gen AYWB402 que codifica para la proteína de virulencia SAP11, no se encuentra conservado en los genomas de diferentes fitoplasmas.

**Cuadro 3. Porcentaje de similitud de la secuencia obtenida con las que se encuentran reportadas en la base de datos Gene Bank del NCBI.**

ACCESIÓN	DESCRIPCIÓN	NCBI %
AF088849.1	<i>Capsicum chinense</i> , gen 25S RNA ribosomal, secuencia parcial	99%
AF479172.1	<i>Nicotiana tabacum</i> , gen 26S RNA ribosomal, secuencia completa	98%
EU161982.1	<i>Solanum lycopersicum</i> , gen 25S RNA ribosomal, secuencia completa	97%
X13557.1	Tomate, gen 25S RNA ribosomal	97%

#### **4. Medición de la expresión relativa de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas en plantas infectadas y no infectadas por PCR en tiempo real**

Para determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para MDAR, un transportador ABC, Proteína asociada a membrana, MCP In, SAP6, proteína dedo de zinc, WRK, HSP90, EREB y una proteína de función desconocida, en plantas de papa *in vitro* infectadas y no infectadas por fitoplasmas, se llevó a cabo una reacción de PCR en tiempo real y se utilizó al gen actina como normalizador de la reacción.

Tomando en cuenta que los radios de expresión considerados como significantes se encuentran en los rangos  $>1.5$  veces ó  $< 0.67$  veces (Liu *et al.*, 2007), o bien, en un rango de 1.5 a -1.5 veces de cambio en la expresión, tenemos que seis de los diez genes analizados presentaron una sobreexpresión en la planta infectada con fitoplasmas respecto a la no infectada, uno bajó su nivel de expresión y tres genes mantuvieron su nivel de expresión en ambas condiciones (Cuadro 4). El gen para EREB se expresó 22.9 veces en la planta infectada con respecto a la no infectada, WRKY tuvo una sobreexpresión de hasta 34.7 veces mientras que aquel que codifica para la proteína dedo de zinc se expresó 20.5 veces en la planta infectada. Los genes para SAP6, HSP90 y una proteína de función desconocida se sobreexpresaron 3.9, 2,9 y 2.8 veces más en la planta infectada, respectivamente.

El gen codificante para una proteína de membrana presentó una inhibición en su regulación, presentando un radio de 0.28 veces de expresión en la planta infectada con respecto a la no infectada (ó -3.57 veces de reducción en la expresión); mientras que los otros tres genes restantes no presentaron cambio en la condición infectada con respecto a la no infectada. El gen de la proteína inhibidora de metalocarboxipeptidasas (MCP In) tuvo un valor de expresión relativa de 0.69 veces, el gen de Monodehidroxiascorbato reductasa (MDAR) de 1.40 veces y el gen codificante para un transportador ABC (T-ABC) de 1.44 veces en la planta infectada con respecto a la planta no infectada por fitoplasmas (Cuadro 4, Figura 6).

**Cuadro 4. Expresión relativa de los genes de respuesta ante infección por fitoplasmas en plantas infectadas respecto a plantas no infectadas**

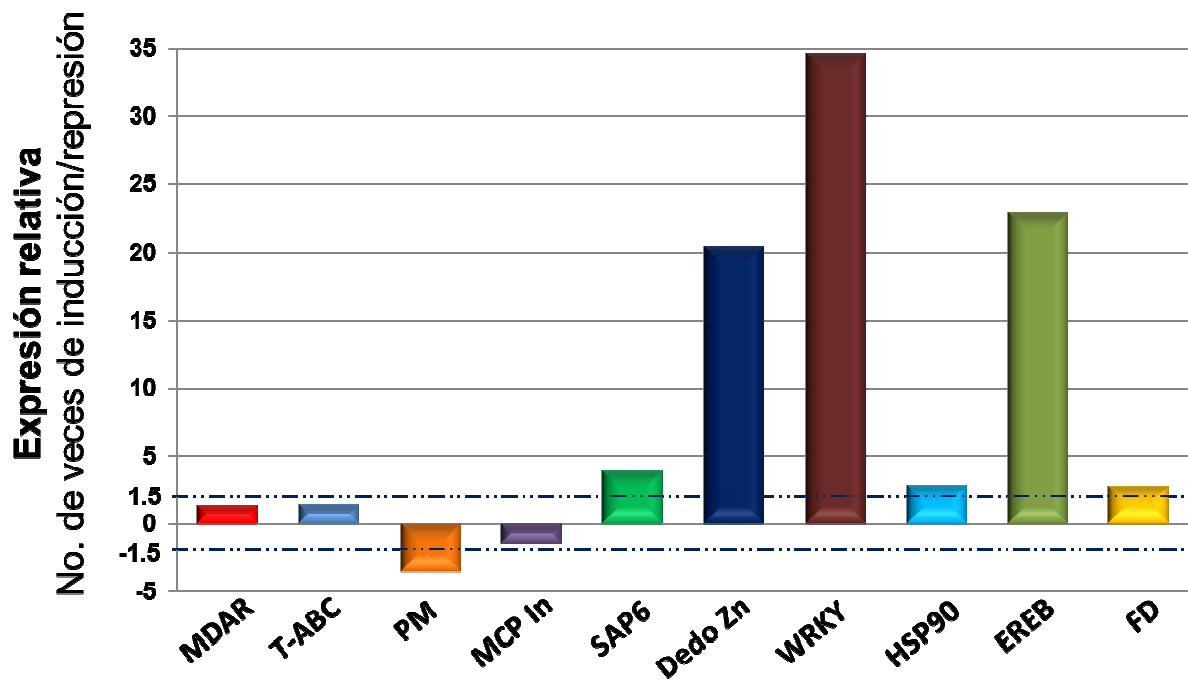
<b>GEN</b>	<b>EXPRESIÓN RELATIVA INF/NO INF <sup>1</sup></b>	<b>NO. DE VECES DE CAMBIO EN LA EXPRESIÓN <sup>2</sup></b>
<b>MDAR</b>	1.40	1.40
<b>Transportador ABC</b>	1.44	1.44
<b>*Proteína asociada a membrana</b>	0.28	-3.57
<b>MCP In</b>	0.69	-1.44
<b>*SAP 6</b>	3.90	3.90
<b>*Dedo de Zinc</b>	20.50	20.50
<b>*WRKY</b>	34.70	34.70
<b>*HSP90</b>	2.90	2.90
<b>*EREB</b>	22.90	22.90
<b>*Proteína de función desconocida</b>	2.80	2.80

<sup>1</sup>. INF: Condición infectada, NO INF: Condición no infectada

<sup>2</sup>. Los valores se obtuvieron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizando a actina como el gen normalizador y la condición no infectada como referencia.

\* Genes que muestran una expresión diferencial relativa, ya sea un aumento o disminución en su nivel de expresión en plantas infectadas respecto a las no infectadas.





**Figura 6. Expresión relativa de genes de respuesta ante infección por fitoplasmas en plantas de papa *in vitro*.**

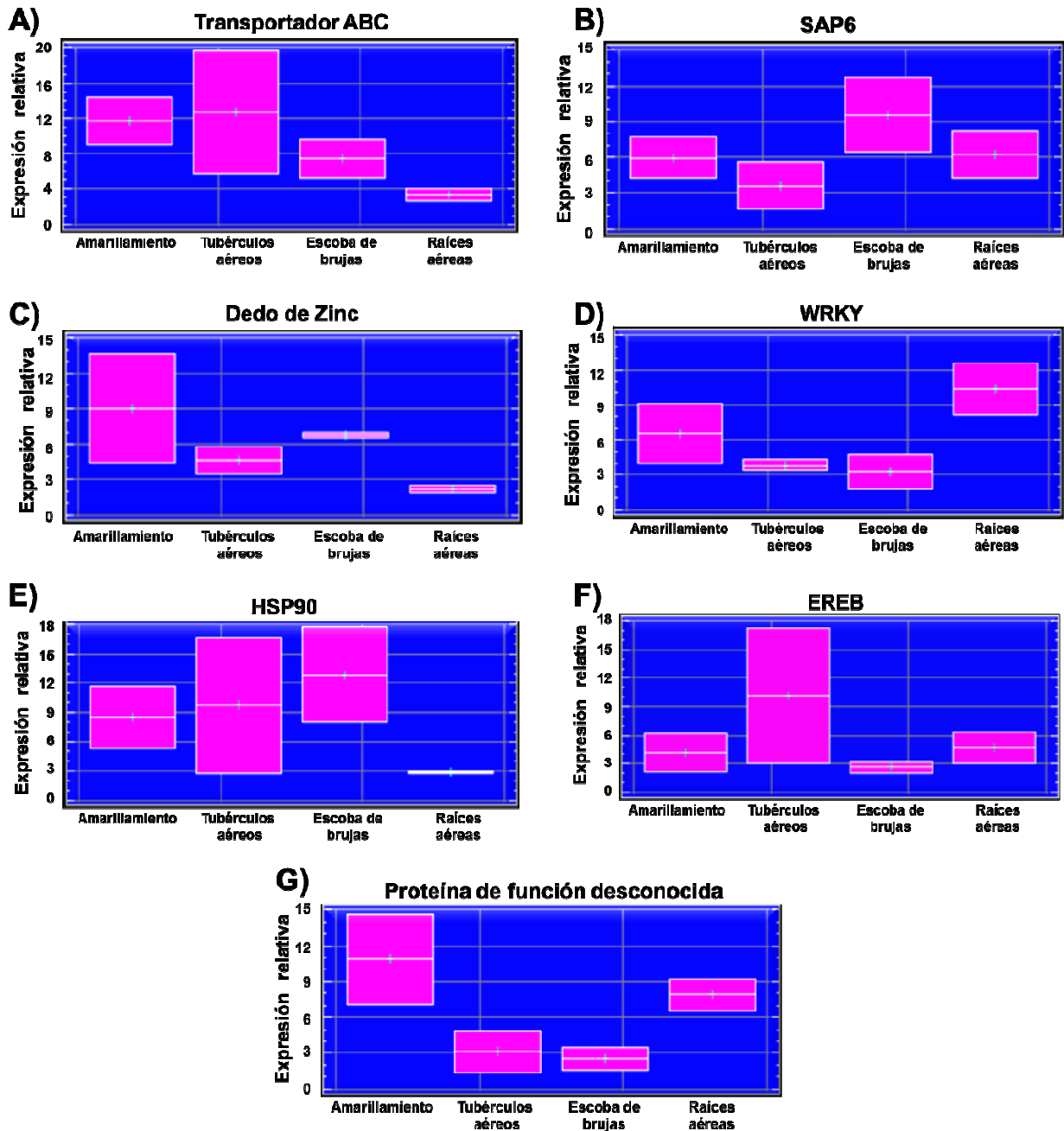
Los genes con valores de número de veces de cambio en la expresión (inducción/represión) comprendidos entre las dos líneas punteadas (1.5 y -1.5), son considerados como genes sin cambio en su expresión entre las condiciones infectada y no infectada por fitoplasma MPPT. MDAR.- monodehidroxiascorbato reductasa. T-ABC, transportador ABC; PM, proteína de membrana; MCP In, inhibidor de metalocarboxipeptidasas; SAP6, proteína asociada a estrés; dedo Zn, dedo de zinc; WRKY, factor de transcripción 33; HSP90, proteína de choque térmico de 90 kDa; EREB, proteína de respuesta a etileno; FD, proteína de función desconocida.

## **5. Medición de la expresión relativa de genes de respuesta ante la infección de fitoplasmas en plantas sintomáticas y asintomáticas utilizando la técnica de PCR en tiempo real.**

Para determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para las proteínas MDAR, un transportador ABC, proteína asociada a membrana, MCP In, SAP6, dedo de zinc, WRK, HSP90, EREB y una proteína de función desconocida, en plantas de papa *in vitro* que presentaron diferentes síntomas (amarillamiento, tubérculos aéreos, escoba de bruja y raíces aéreas) se llevó a cabo una reacción de PCR en tiempo real utilizando el cDNA de plantas clasificadas por síntomas utilizando tres réplicas biológicas para cada reacción así como tres réplicas técnicas para cada gen a medir. Como control se utilizó cDNA de una planta de papa *in vitro* no sintomática. El gen actina fue utilizado como normalizador de la reacción.

En la reacción para medir el nivel de expresión de los genes para MDAR, MCP In y proteína de membrana utilizando los cDNA de plantas sintomáticas y asintomáticas no se observó una inducción en la expresión de ninguno de los genes antes mencionados. Por otro lado, las reacciones para la medición de expresión de los genes codificantes para transportador ABC, SAP6, dedo de zinc, WRKY, HSP90, EREB y una proteína de función desconocida presentaron una sobreexpresión en cada una de las réplicas antes mencionadas (plantas sintomáticas) con respecto a la muestra control (planta asintomática), presentando el mismo patrón de expresión de los resultados obtenidos en el análisis de los mismos genes en plantas infectadas y no infectadas por fitoplasmas (Apartado VII, sección 4), sin embargo presentaron variaciones en sus niveles de expresión para cada síntoma. El gen codificante para un transportador ABC, no presentó cambios en su nivel de expresión en el análisis anterior, mientras que al analizar su expresión en tejido cercano a los síntomas presentes en las plantas de papa *in vitro*, este gen presentó una sobreexpresión, con respecto a las plantas asintomáticas (Figura 8A). Por otra parte, el gen que codifica para SAP6 presentó una mayor sobreexpresión en el síntoma de escoba de brujas y su expresión fue relativamente menor en plantas con síntoma de tubérculos aéreos.

La expresión relativa de SAP6 fue similar en plantas con síntomas de amarillamiento y raíces aéreas, con respecto a plantas asintomáticas (Figura 8B). El gen codificante para la proteína dedo de zinc tuvo radios de expresión similares en plantas con amarillamiento, tubérculos aéreos y escoba de bruja, con respecto a plantas asintomáticas; su sobreexpresión fue relativamente menor en síntomas de raíces aéreas. (Figura 8C). El gen codificante para WRKY tuvo un valor de expresión relativa mayor en el síntoma de raíces aéreas, en comparación con las plantas que presentaron síntomas de amarillamiento, tubérculos aéreos y escoba de bruja, en las cuales los radios de expresión fueron similares, esto con respecto a plantas asintomáticas (Figura 8D). El gen que codifica para la proteína HSP90 presentó radios de expresión similares en síntomas de amarillamiento, tubérculos aéreos y escoba de brujas, mientras que su radio de expresión en síntoma de raíces aéreas fue menor que los antes mencionados (Figura 8E). El gen codificante para EREB no presentó diferencias estadísticas en su expresión en los cuatro síntomas; sin embargo, en la Figura 8F, se puede observar que en el síntoma de tubérculos aéreos hubo una alta variación en las réplicas biológicas analizadas, llegando a presentar radios de expresión relativa elevados en comparación con los presentados en los síntomas de amarillamiento, escoba de bruja y raíces aéreas (Figura 8F). El gen codificante para una proteína de función desconocida presentó altos valores de expresión relativa en plantas con síntomas de amarillamiento y raíces aéreas en comparación con los valores obtenidos del análisis de dicho gen en plantas con síntomas de tubérculos aéreos y escoba de bruja (Figura 8G).



**FIGURA 8.** Gráfica de cajas mostrando los radios de expresión relativa de los genes de respuesta ante infección por fitoplasmas en plantas de papa con diferentes síntomas con respecto a plantas asintomáticas. Se realizó un análisis de medias para cada gen utilizando un nivel de significancia de 0.05. Genes analizados: transportador ABC (A), SAP6 (B), dedo de Zinc (C), WRKY (D), HSP90 (E), EREB (F) y una proteína de función desconocida (G). Síntomas: amarillamiento, tubérculos aéreos, escoba de bruja y raíces aéreas. Se usó actina como gen normalizador y a una planta no-sintomática como control.

## VIII. DISCUSIÓN

La papa es un cultivo afectado por diferentes patógenos como nematodos, virus, bacterias y fitoplasmas. En México, la segunda enfermedad de mayor importancia afectando a este cultivo, después del tizón tardío producida por *Phytophthora infestans* (Martínez-Soriano *et al.*, 1999), es la punta morada de la papa (PMP), causada por el fitoplasma "Mexican potato purple top (MPPT) (Santos-Cervantes *et al.*, 2010). Esta enfermedad ha causado pérdidas de hasta un 100% en algunas regiones productoras de papa del noreste de México.

Los fitoplasmas son un grupo importante de patógenos de plantas que se asocian con enfermedades en numerosas especies alrededor del mundo, causando graves pérdidas en su producción (Carginale *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2007; De Luca *et al.*, 2010; Dickinson, 2010). A pesar de su gran impacto económico negativo en los cultivos que afecta y asociado a sus características biológicas únicas, los fitoplasmas son los patógenos de plantas menos caracterizados (Albertazzi *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2009; Dickinson, 2010).

El empleo de técnicas moleculares en la detección de fitoplasmas en diferentes hospederos, así como los avances en el análisis de cuatro genomas secuenciados (*Candidatus* Phytoplasma asteris, *Ca.* Phytoplasma asteris, *Ca.* Phytoplasma australiense, *Ca.* Phytoplasma mali) han permitido encontrar secuencias asociadas con factores de virulencia (Bai *et al.*, 2009; Hoshi *et al.*, 2009).

El objetivo de este trabajo fue detectar los genes codificantes para las proteínas de virulencia SAP11 (AYWB370) y SAP30 (AYWB402) encontrados primeramente en el fitoplasma AY-WB, (Bai *et al.*, 2009), en donde se plantea la hipótesis de que dichas secuencias se encuentran conservadas en los diferentes fitoplasmas; sin embargo, es importante mencionar que con base a los diferentes análisis realizados (ver materiales y métodos) no se encontraron dichos genes en las plantas de papa *in vitro* infectadas con el fitoplasma MPPT, lo que permite sugerir que tales genes involucrados como factores de virulencia en el fitoplasma AY-WB, no se encuentran conservados en el fitoplasma MPPT.

El análisis de las secuencias del genoma de cuatro fitoplasmas ha permitido la identificación de unidades móviles, también conocidas como transposones, en el genoma de éstos, lo que les permite adaptarse a diferentes hospederos y condiciones nutricionales, estos pueden evolucionar constantemente (Francis *et al.*, 2004), por lo que posiblemente sea la causa que no se encuentren conservados estos genes entre los diferentes fitoplasmas. Por otra parte es importante mencionar que debido a que no se cuenta con la secuencia del genoma completo del fitoplasma en estudio y a la poca información publicada, es difícil predecir *in silico* posible genes codificantes para proteínas de virulencia o diseñar oligonucleótidos dirigido a amplificar secuencias de potenciales genes de virulencia. .

En este trabajo se amplificó un fragmento de aproximadamente 350 pb utilizando los oligonucleótidos que amplifican el gen codificante para la proteína de virulencia SAP30 (AYWB402). A pesar de no ser el fragmento esperado de 220 pb, se consideró la probabilidad de que se tratara del gen de interés, ya que éste, en el genoma del fitoplasma AYWB, se encuentra localizado en secuencias repetidas y asociadas a transposones (Hogenhout, 2008; Bai *et al.*, 2009), por lo que es probable que en el genoma del fitoplasma MPPT se encontrara también repetido o hubiera cambiado su tamaño a causa de las inserciones de los transposones. Sin embargo, otra posible explicación de la no amplificación de los genes de las proteínas SAP30 (AYWB402) y SAP11 (AYWB370), es que al haber cambios en las secuencias asociadas a islas de patogenicidad, los genes pueden ser truncado impidiendo la correcta hibridación del par de oligonucleótidos y por lo tanto la amplificación del fragmento de DNA esperado.

Por otro lado, el mecanismo de infección de patógenos en una planta activa una respuesta que involucran la transcripción de genes relacionados con la defensa de la planta, cuya regulación ha sido ampliamente estudiada. Los síntomas que presentan las plantas infectadas por fitoplasmas se relacionan con estos mecanismos que sugieren que dichos organismos interfieren en el equilibrio de su metabolismo (Gutiérrez-Camarena, 2006; De Luca *et al.*, 2010). Es por esto que en este trabajo se analizó la expresión diferencial de genes involucrados con la

respuesta de las plantas ante el ataque de patógenos en plantas de papa *in vitro* infectadas y no infectadas con el fitoplasma MPPT así como en plantas sintomáticas (amarillamiento, tubérculos aéreos, escoba de brujas y raíces aéreas) y asintomáticas.

La expresión del gen codificante para la proteína monodehidroascorbato reductasa (MDAR) no tuvo un cambio en su expresión en la planta infectada con fitoplasmas respecto a la no infectada. La proteína MDAR se ha relacionado con las especies reactivas de oxígeno, involucrada en la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como una respuesta hipersensitiva al ataque de hongos y bacterias, entre otros organismos (Camarena-Gutiérrez, 2006). Trabajos recientes han reportado que en plantas infectadas con fitoplasmas se ha observado un incremento en las especies reactivas de oxígeno, produciendo una alta concentración de  $H_2O_2$  en los elementos cribosos del floema de las plantas; sin embargo, la acumulación de dichas especies son insuficientes para desencadenar por completo la resistencia a la enfermedad (Musetti *et al.*, 2007). El hecho de que no se haya observado un cambio en la expresión diferencial de este gen en las plantas infectadas con respecto a las no infectadas se pudiera deber a que en el estado fenológico de la planta en el cual se tomó la muestra, los mecanismos de defensa transitorios al patógeno tales como la producción de  $H_2O_2$ , ya habían bajado su sobreexpresión. También es probable, que debido a las condiciones a las cuales se encuentran las plantas en estudio (*in vitro*), tengan una producción constante en los niveles de las especies reactivas de oxígeno para poder sobrevivir, ya que se encuentran en constantes condiciones de estrés.

Las proteínas de membrana están involucradas en el primer paso de reconocimiento de patógenos en una planta. De acuerdo a lo reportado por Lebrun-García *et al.* (2006), se relacionó una proteína de membrana en *Nicotiana benthamiana* al reconocimiento de proteína de virulencia de *Phytophthora cryptogea*, induciendo la cascada de señalización que activó mecanismos de defensa contra el patógeno, por lo que no se pudo llevar a cabo la infección de hongo en la planta. Este caso es contrario a lo observado en este trabajo, ya que en el caso de

*Nicotiana benthamiana* se observó una represión de la proteína de membrana en la planta infectada respecto a la no infectada, posiblemente por mecanismos de ataque del fitoplasma, de manera que este no fue reconocido y se llevó a cabo la infección.

Los inhibidores de proteasas son comunes en plantas y son activados en contra de las proteasas del tracto digestivo de los insectos y su expresión en las plantas es activada por las heridas producidas durante la alimentación de los insectos y son parte importante de su sistema de defensa. Se ha demostrado que los inhibidores específicos de carboxipeptidasas se acumulan en respuesta a las heridas de hojas en plantas de tomate y papa (Villanueva *et al.* 1998). Si bien los fitoplasmas son transmitidos a las plantas principalmente mediante insectos vectores al alimentarse de las plantas, en este trabajo no se mostró un aumento en la expresión del gen que codifica para la proteína MCP In (Inhibidor de metalocarboxipeptidasas), puesto que las plantas de papa tomadas como modelo de estudio están bajo condiciones controladas y se encuentran infectadas por fitoplasmas a través la propagación *in vitro*. Sería interesante medir la expresión de este gen en bioensayos de infección por insectos vectores, en los cuales se esperaría su sobreexpresión.

No se detectó expresión de los genes que codifican para MDAR, proteína de membrana y MCP In, al analizar su expresión relativa en plantas sintomáticas respecto a plantas asintomáticas. Esto es, posiblemente, porque sólo se expresan en etapas tempranas de la infección por fitoplasmas, ya que están involucrados con respuestas de defensa de la planta ante el ataque de patógenos (Camarena-Gutiérrez, 2006; Lebrun-García *et al.*, 2006; Villanueva *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que los transportadores ABC se activan para el transporte de varios productos naturales en las plantas, como metabolitos secundarios, con el fin de mantener una regulación en el tráfico de nutrientes; además, tienen un papel importante en la defensa de las plantas, así como su intervención en sistemas de señalización (Jasinski *et al.*, 2009). En este trabajo, el gen codificante para un transportador ABC no tuvo cambios en su expresión en una planta infectada con fitoplasmas, respecto a la planta no infectada; esto podría ser debido a que, cuando la planta se encuentra infectada, su metabolismo busca mantener un balance en el



transporte de nutrientes para la estabilidad de la planta. Además, puede existir una importante interacción entre este tipo de genes de plantas y los genes de fitoplasmas, ya que estos organismos patógenos, en su mayoría, no producen la muerte en las plantas, sino que las mantienen ya que utilizan la maquinaria de estas para poder sobrevivir, reproducirse y transportarse a otras plantas cuando llegan insectos a alimentarse de ellas. Sin embargo, se indujo la expresión de este gen en plantas sintomáticas con respecto a plantas asintomáticas, con una mayor tendencia en los síntomas de tubérculos aéreos y amarillamiento. Esto puede ser debido a que dichos síntomas están involucrados con un desbalance en el movimiento de nutrientes dentro de la planta (Christensen *et al.*, 2005; De Luca *et al.*, 2010), por lo que la sobreexpresión del gen transportador ABC posiblemente dio lugar a un acarreo de nutrientes hacia los entrenudos, dando lugar a la formación de tubérculos aéreos en las axilas de la planta.

La expresión de genes codificantes para proteínas asociadas a estrés (SAP) y proteínas dedo de zinc han sido reportada como respuesta de las plantas a diferentes tipos de estreses abióticos, como deshidratación, salinidad, presencia de metales pesados, entre otros (Davletova *et al.*, 2005; Solanke *et al.*, 2009). Estos resultados podrían coincidir con los observados en este trabajo, ya que las plantas de papa usadas como modelo de estudio se encontraban en condiciones de estrés por tratarse de un cultivo *in vitro*; sin embargo, tomando en cuenta que se observó una inducción en los radios de expresión de los genes codificantes para las proteínas SAP6 y dedo de zinc en las plantas infectadas por el fitoplasma MPPT respecto a las plantas no infectadas y, además, se observó el mismo patrón de expresión de dichos genes en las plantas sintomáticas respecto a aquellas que no presentaron síntomas, estando todas bajo las mismas condiciones, se sugiere que estos genes están involucrados en las respuestas de las plantas ante la infección del fitoplasma MPPT. Además, se ha observado una expresión diferencial de genes codificantes para proteínas dedo de zinc en trabajos enfocados a interacciones planta-patógeno (Albertazzi *et al.*, 2009).

En trabajos recientes, se ha observado una inducción en la expresión de genes codificantes para factores de transcripción durante la infección del fitoplasma

Bois Noir en plantas de vid, entre los cuales se encuentra el factor de transcripción WRKY, relacionándolo con la senescencia de la planta y con defensa ante la presencia de patógenos (Albertazzi et al., 2009). Los genes pertenecientes a la familia WRKY participan en la respuesta de la planta estrés biótico como heridas producidas por insectos o infecciones desarrolladas por patógenos. Estos genes codifican para factores de transcripción, que a su vez regulan la respuesta fisiológica de la planta (Marín-Argüello y Negaresh, 2009). De acuerdo a lo observado en este trabajo y coincidiendo con trabajos previos, se sugiere que el gen codificante para el factor de transcripción WRKY está involucrado con la respuesta de defensa ante la presencia fitoplasma MPPT en plantas de papa.

El etileno es una fitohormona que afecta al desarrollo de la planta y es un regulador clave en la respuesta a estrés biótico y abiótico, ya que se acumula en las plantas durante la infección de patógenos (Agrios, 2005). El etileno activa la expresión de genes codificantes para proteínas de respuesta al etileno (EREB), que a su vez activa la transcripción de genes involucrados con la defensa de la planta (Park et al., 2001), sugiriendo que, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, El gen que codifica para EREB está involucrado en las respuesta de defensa ante el ataque de patógeno en este modelo de estudio. Estos resultados se relacionan con el trabajo reportado por Zamharir et al. (2011) en el cual se observó una sobreexpresión de genes codificantes para factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés por infección de fitoplasmas en plantas de cítricos infectadas por fitoplasmas.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. No se detectó, por la técnica de RT-PCR secuencias homólogas a los genes de virulencia identificados en el fitoplasma de AY-WB, por lo que se sugiere que dichos genes no se encuentran conservados en el fitoplasma MPPT.
2. Los genes codificantes para un transportador ABC, SAP6, dedo de Zinc, WRKY, HSP90 y EREB, que fueron sobreexpresados en plantas infectadas con respecto a las no infectadas, pudieran estar involucrados en mecanismos de defensa en las plantas de papa, y en la presencia de síntomas
3. Los genes que codificantes para las proteínas MDAR, MCP In y proteína de membrana pueden estar involucrados en procesos de reconocimiento del patógeno, por lo que se sugieren análisis de expresión genética de los mismos en plantas con una infección temprana por el fitoplasma MPPT.
4. Este estudio permite un mejor entendimiento acerca de los mecanismos molecular involucrados durante la interacción planta de papa-fitoplasma, lo que sirve para desarrollar nuevas estrategias para contrarrestar el ataque de estos patógenos y reducir las pérdidas en los cultivos en las prácticas agrícolas.

## X. LITERATURA CONSULTADA

- Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Tagliafico, E., Stefani, E. & Pecchioni, N. 2009. **Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection.** Plant Science. 176, 792-804
- Bai, X., Correa, V. R., Toruño, T. Y., Ammar E., Kamoun, S., & Hogenhout, S. A. 2009. **AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei.** The American Phytopathological Society. 22, 18–30.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., & Hogenhout, S. A. 2006. **Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts.** J. bacteriol. 188, 3682-3696.
- Bertaccini, A. 2007. **Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology.** Frontiers in Bioscience. 12, 673-689
- Borba, N. 2008. **La papa: un alimento básico.** RAP-AL, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para Latinoamérica. Uruguay
- Buckenhüskes, H. J. 2005. **Nutritionally relevant aspects of potatoes and constituents.** In: Haverkort, A. J. & P. C (eds). **Potato in progress: Science meets practice.** Wageningen Academic Publishers The Netherlands. 17-38.
- Cadena-Hinojosa, M. A., Guzmán-Plazola, R., Díaz-Valasis, M., Zavala-Quintana, T. E., Magaña-Torres, O. S., Almeida-León, I. H., López-Delgado, H., Rivera-Peña, A., & Rubio-Cobarrubias, O. 2003. **Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de**

- papa en valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y Distrito Federal, México.** Revista Mexicana de Fitopatología 21, 248-259.
- Carginale, V., Maria, G., Capasso, C., Ionata, E., La Cara, F., Pastore, M., Bertaccini, A. & Capasso, A. 2004. **Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display.** Gene 332, 29-34.
- Cheng, S. H., Seemann, J. R. 1998. **Extraction and purification of RNA from plants tissue enriched in polysaccharides.** Methods in molecular biology. 86, 27-32.
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schuiz, A. 2005. **Phytoplasmas and their interactions with hosts.** Plant Sci. 10, 526-534.
- Cronshaw, J. 1981. **Ploem structure and function.** Plant. Physiol. 32:465-484.
- De Luca, V., Capasso, C., Capasso, A., Pastore, M., & Carginale V. 2010. **Gene expression profiling of phytoplasma-infected Madagascar periwinkle leaves using differential display.** Mol Biol Rep. DOI 10.1007/s11033-010-9964-x.
- Dickinson, M. 2010. **Mobile units of DNA in phytoplasma genomes.** Mol. Microbiol. 77, 1351-1353.
- Francis, I., Holsters, M. & Vereecke, D. 2010. **The gram-positive side of plant-microbe interactions.** Environment Microbiology. 12, 1-12.
- Geydan, T. D., Melgarejo, L. 2006. **Plasmodesmos: estructura y función.** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Colombia
- González-Pedrajo, B., Dreyfus, G. 2003. **Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia.** Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto Bioquímica.

Fac Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria. DF, MÉXICO.

Gregory, P., & Andrade, H. 1996. **Principales Enfermedades, Nematodos e Insectos de la Papa**. Lima, Perú. Centro Internacional de la papa/servicio Nacional de Sanidad Agraria. ISBN 92-9060-188-4.

Gundersen, D. E. y Lee, I-M. 1996. **Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs**. *Phytopatology. Medit.*, 35, 144-151.

Gutiérrez-Camarena, G. 2006. **Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos**. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. 12, 25-30

Hanboonsong, Y., Suwanwong, U., & Panyim, S. 2000. **Distribution of phytoplasma in sugarcane with white leaf disease and in the insect vector of the disease studied by using transmission electron microscopy**. *Proceedings life science 7th Asia-Pacific Electron Mycroscopy Conference, Singapore*. pp. 326-327.

Hogenhout S. A., Oshima, K., Ammar E., Kakizawa, S., Kingdom, H. N. & Namba, S. 2008. **Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects**. *Molecular Plant Pathology*. 9, 403-423.

Horton, D. 1992. **La papa: producción, comercialización y programas**. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. Págs. 42, 99-101.

Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y. & Namba, S. 2009. **A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(15):6416-21.

- Jasinski, M., Banasiak, J., Radom, M., Kalitkiwicz, A. & Figlerowicz, M. 2009. **Full-size ABC transporter from the ABCG subfamily in *Medicago truncatula*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 921-931.
- Kube, M., Shneider, B., Reinhardt, R., Sheeüller, E. 2007. **First look into the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma mali' in comparison to 'Candidatus Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB.** *Bulletin of Insectology*. 60, 113-114.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt, R., & Seemüller, E. 2008. **The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'.** *BMC Genomics* 9:306.
- Lee, I. M., Davis, R. E., & Gundersen, D. E. 2000. **Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes.** *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 221-555.
- Leyva-López, N. E., Aguilar-Rojas, O., Leal-Klevezas, D. S., and Martínez-Soriano, J. P. 1999. **Presence of phytoplasmas in Mexican cacti.** *Phytopathology*. 89, 545 A.
- Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S. & Martínez-Soriano, J. P. 2002. **Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico.** *Can. J. Microbiol.* 48, 1062-1068.
- Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., & Bello, A. 1996. **Patología Vegetal.** Sociedad Española de Fitopatología. España.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C. & Harrison, J. 2007. **Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots.** *The Plant Journal*. 50, 529–544.

- Marín-Argüello, I., y Negareh, S. 2009. **Presencia de genes (WRKY) asociados a la respuesta al estrés biótico en cacao de Nicaragua.** *Agronomía mesoamericana* 20, 41-46.
- Maramorosch, K. 1998. **Current status of potato purple top wilt.** *Intern. J. Trop. Plant Disease.* 16, 61-72.
- Musetti, R., Marabottini, R., Badiani, M., Martini, M., Sanita si Toppi, L., Borselli, S., Borgo, R., Osler, R. 2007. **On the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease.** *Plant Biology.* 34, 750, 758.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Susuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., & Namba S. 2004. **Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma.** *Nature Publishing Group.* 36, 27-29.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A., Hayashi, Y., Kagiwada, S. & Namba, Shigetou. 2007. **Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus Phytoplasma asteris*.** *Molecular Plant Pathology.* 4, 481-489.
- Pfaffl, M. W. 2001. **A new mathematical model for quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acid Research.* 29, 2002-2007.
- Razin S., Yogev D. y Naot, Y., 1998. **Molecular biology and pathology of micoplasmas.** *Microbiology Molecular Revision,* 62, 1094-1156.
- Rubio-Cobarrubias, O. A., Rangel-González, J. A., Magallanes-González, J. V., Díaz- Hernández, C., Zavala-Quintana, T. E., Rivera-Peña, A., Cadena-Hinojosa, M., Rocha-Rodríguez, R., Ortiz-Trejo, C., López-Delgado, H., Díaz-Valassis, M. y Paredes-Tenorio, A. 2000. **Manual para la Producción de Papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.** Centro de



- Investigación Regional del Centro. Libro Técnico No. 1. División Agrícola. Págs. 3, 4, 29-45.
- Sandoval, Z. E., Rojas L. A. 2005. **Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal**. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. D. F. México. Pág 206.
- Santos-Cervantes, M. E. 2009. **Distribución y cuantificación de fitoplasmas asociados a enfermedades de papa en las principales zonas productoras de México**. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Santos-Cervantes, M.E. J.A Chávez-Medina, J. Acosta-Pardini, G.L. Flores-Zamora, J. Méndez-Lozano, and N.E. Leyva-López. 2010. **Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico**. Plant Disease. 94, 388-395.
- Salazar, L. F. 1996. **Los virus de la papa y su control**. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima Perú. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. Pág 6.
- Siddique, A. B. M., Guthrie, J. N., Walsh, K. B., White, D. T., and Scott, P. T. 1998. **Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback**. Plant Disease. 82,1112-1120.
- Solanke, A., Sharma, M., Tyagi, A., Sharma, A. 2009. **Characterization and phylogenetic analysis of environmental stress-responsive SAP gene family encoding A20/AN1 zinc finger proteins in tomato**. Molecular Genetics & Genomics. 282, 153–164.
- Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., & Gibb, K. S. 2007. **An overview of the genome sequence of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ – Australian strain**. Bulletin of Insectology 60 (2): 111-112

- Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., & Gibb, K. S. 2008. **Comparative Genome Analysis of '*Candidatus Phytoplasma australiense*' (Subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' Strains OY-M and AY-WB.** J. Bacteriol. 190:3979-3991.
- Villanueva, J., Canals, F., Prat, S., Ludevid, D., Querol, E. & Avilés, F. 1998. **Characterization of the wound-induced metallocarboxypeptidase inhibitor from potato.** FEBSS Letters, 440, 175-182.
- Wei, W., Kakisawa, S., Susuki, S., Jung, H-Y., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T. y Namba S. 2004. **In Plant Dynamic Analysis of *Onion Yellow* *Phytoplasma*. Using Localized by Insect Transmission.** Phytopathology, 94, 244-250.
- Ji, X., Gai, T., Lu, B., Zheng, Ch. & Mu, Z. 2010. **Shotgun proteomic analysis of mulberry dwarf phytoplasma.** Proteome Science, 8:20.
- Zabaleta V. M., Yaya-Lancheros, M. L., Chaparro-Giraldo, A. 2008. **Comparación de dos kits de RT-PCR en la detección de ARNm de dos genes endógenos de papa (*Solanum tuberosum* spp. Andígena).** Revista Colombiana de Biotecnología. 10, 104-110 pp.
- Zamharir, M., Mardi, M., Alavi, S., Hasanzadeh, N., Nekouei, M., Zamanizadeh, H., Alizadeh, A. & Salekdeh, G. 2011. **Identification of genes differentially expressed during interaction of Mexican lime tree infected with "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*".** BioMed Central Microbiology. 11, 1471-2180

