PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Detección de *Candidatus* Phytoplasma en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana L.*) en la Sierra norte y centro del Ecuador.

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

ADRIANA STEPHANIE ENDARA CANTOS

Quito, 2020

CERTIFICACIÓN

Certifico que, la disertación de Microbiología de la candidata Adriana Stephanie Endara Cantos, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Jeniffer Marcela Yánez Altuna, Mtr.

Directora de la Disertación

Quito, 10 de enero de 2020

DEDICATORIA

A Dios, quien permitió que llegue hasta este punto. Sin Él nada habría sido posible.

A mis abuelos, padres y hermanos, son el motor de mi vida.

Con mucho amor.

Adriana

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por permitirme ser testimonio de su promesa. A mis padres Liliam y Diego, por su esfuerzo y sacrificio para que yo pueda culminar mi carrera. A mis hermanos y compañeros de vida Obdry y José David. Son mi ejemplo y soporte, hoy estoy aquí gracias a ustedes.

Agradezco a la Ingeniera Jeniffer Yánez por su confianza y apertura hacia mí, para colaborar en su proyecto de investigación. Gracias por su paciencia, su guía y su amistad.

Al Dr. Martin Marcial por su gran apoyo y buena voluntad en la cooperación de mi trabajo de investigación. Muchas gracias por sus consejos y orientación.

Un especial agradecimiento para el Mtr. Andrés Zabala, por ser además de profesor un amigo y compañero de laboratorio. A Jorge por su amistad, ayuda y atención en este proyecto.

A toda mi familia por su amor y por permitirse ser parte de este sueño también, especialmente a mis abuelos y tíos Rubén y Mónica por su confianza, cariño y apoyo para que pueda culminar esta meta. Esto es por y para ustedes.

A mis compinches y mejores amigos: Lina, Esteban, Nicole, Denisse, Alex, Víctor y Mery. Gracias por su incondicional amistad.

A Kenny, mi compañero y mejor amigo de la universidad. Gracias por tu lealtad y apoyo durante todos estos años.

A mis profesores: Elena Granda, Diana Astorga, Magaly Estrella, Verónica Luna, Jeniffer Yánez, Fernando Santacruz y Josefina Egas por impartir su conocimiento y pasión por esta carrera.

A mis amigos y compañeros de carrera: Alejandro, Irina, Juliana, Lucía, Sebastián, Nicolás, Degsi y principalmente Martín por toda su ayuda y aporte. Ustedes hicieron memorable esta experiencia.

Muchas gracias

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN ..... **¡Error! Marcador no definido.**

ABSTRACT 8

INTRODUCCIÓN.....9

MATERIALES Y MÉTODOS.....11

RESULTADOS 13

DISCUSIÓN.....14

CONCLUSIONES.....18

AGRADECIMIENTOS.....19

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomatología de punta morada en cultivos de uvilla……...…..26

Figura 2. Amplificación de la región 16S rRNA……26

Figura 3. Amplificación de la región de los genes 16S rRNA y 23S rRNA……..27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración y calidad de ADN…….28

Tabla 2. Secuencias de coincidencia BLAST…….28

Detection of *Candidatus* Phytoplasma in golden berry crops (*Physalis peruviana L.*) in the northern Sierra and central Ecuador.

Detección de *Candidatus* Phytoplasma en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana L.*) en la Sierra norte y centro del Ecuador.

Adriana Stephanie Endara Cantos[1]

[1]Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av.12 de octubre 1076 Y Vicente Ramón Roca, Quito- Ecuador.

RESUMEN. - En Ecuador existen más de 400 hectáreas cultivadas de uvilla destinadas a la exportación, generando importantes ingresos económicos al país. *Candidatus* Phytoplasma es el género asignado a las bacterias fitopatógenas que tienen la condición de ser parásitos estrictos del floema de la planta hospedera. Este microorganismo se asocia como el agente causal de la enfermedad de punta morada en el cultivo de papa. En el país, la enfermedad no ha sido reportada en uvilla, sin embargo, estudios realizados sugieren la asociación parasitaria del patógeno con las solanáceas. Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de *Candidatus* Phytoplasma en provincias de la zona norte y centro del Ecuador. Para esto, se tomaron muestras de hojas que presentaban sintomatología similar a la reportada en papa. A partir de éstas, se extrajo ADN que fue cuantificado por espectrofotometría. La región de los genes 16S rRNA y 23S rRNA de *Candidatus* Phytoplasma se amplificó mediante PCR anidada y se obtuvieron tres bandas positivas de un tamaño de 1100 pb. El ADN fue secuenciado mediante el método Sanger y analizado mediante la herramienta BLAST. Las secuencias obtenidas no confirmaron a *Candidatus* Phytoplasma como agente causal. Los resultados de este trabajo no demostraron la presencia de este patógeno en uvilla en el país, sin embargo, ayudarán a la mejora de los protocolos en las pruebas de identificación de este agente patógeno.

Palabras clave: uvilla, fitoplasmas, *Candidatus* Phytoplasma, PCR anidada, punta morada.

ABSTRACT. - In Ecuador, there are more than 400 hectares of golden berry crops destined for export, obtaining significant economic income for the country. *Candidatus* Phytoplasma is the genus assigned to phytopathogenic bacteria that have the condition of strict parasites of the phloem of the host plant. This microorganism is associated as the causative agent of witches' broom disease in potatoes. In the country, the disease has not been reported in golden berry crops, however, studies suggest the parasitic association of the microorganism with Solanaceae. For this reason, the present study aimed to determine the presence of *Candidatus Phytoplasma* in provinces of the northern and central Ecuador. For this, samples of golden berry leaves were taken that presented symptoms similar to that of witches' broom in potato. From these, the DNA was extracted and quantified by spectrophotometry. The region of the 16S rRNA and 23S rRNA genes of *Candidatus* Phytoplasma was amplified by nested PCR and three positive bands of 1100 bp size were obtained. The DNA was sequenced by the Sanger method and analyzed by the BLAST tool. The sequences obtained could not be confirmed as *Candidatus* Phytoplasma. The results of this work did not prove the presence of this pathogen in golden berry in this country; however, they will help to improve protocols in the identification tests of this agent.

Keywords: golden berry, phytoplasmas, nested PCR, *Candidatus* Phytoplasma, witches' broom.

INTRODUCCIÓN

La uvilla (*Physalis peruviana L.*), también conocida como uchuva o aguaymanto, es una planta perenne perteneciente a la familia *Solanaceae (*Brito Grandes, Espín, Villacrés, Vaillant, Medina y Aria 2008). Tiene alrededor de 75-90 variedades que se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas altas de Sudamérica, gracias a su alta tolerancia frente a las diferentes condiciones ambientales y a su fácil adaptación a cualquier tipo de suelo (Dostert, Roque, Cano, La Torre y Weigend 2011). La planta de la uchuva generalmente mide entre 45-90 cm de largo, su tallo es recto y ramificado, sus hojas presentan una superficie vellosa de forma acorazonada y su principal característica es el cáliz que se desarrolla durante su fructificación mientras se estira y encierra en su totalidad al fruto (Fisher, Almanza-Merchán y Miranda, 2014). En la actualidad, la uvilla, es considerada un fruto exótico que ha ganado importancia e interés económico, debido a su limitada producción mundial y también, a sus diferentes factores nutricionales. Es una rica fuente de vitaminas C y B, además de proteínas, minerales y fósforo (Cortés, Prieto, y Rozo 2015).

La uchuva, se exporta especialmente a Europa y Estados Unidos (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador] 2017). Esto posiciona al fruto como una potencial fuente de ingresos para los países productores. Ecuador ocupa el segundo lugar en producción y exportación (ProEcuador 2018). Los registros y datos ecuatorianos indican que existen cerca de 200 hectáreas cultivadas de uvilla y se calcula que al menos 10,050 toneladas métricas son destinadas para exportación a sus principales consumidores: Alemania, España, Suiza, Canadá y Reino Unido. De las exportaciones se obtienen rubros de hasta 782,000 USD para el país (Bucheli y González 2014). Los datos

de ProEcuador (2018) muestran que el país presentó una tasa de crecimiento del 40 % anual en exportaciones de uvilla en el 2017.

La uvilla como todo cultivo, se ve afectada por plagas y enfermedades producidas por microorganismos que influyen en los costos de producción y pueden reducir el nivel de exportación que el país maneja, si no son identificadas y tratadas de una forma eficaz y a tiempo (López y Rodríguez 2017).

En el último año, varios productores de uvilla han observado sintomatología similar a la presentada por la punta morada en papa (PMP) (Rivadeneira et al. 2015). Esta es una enfermedad emergente ocasionada por *Candidatus* Phytoplasma, microorganismo que se transmite por vectores de la familia *Psyllidae* (Almeyda, Sánchez y Garzón 2008).

Candidatus Phytoplasma es el género asignado para describir a bacterias fitopatógenas pertenecientes a la clase *Mollicutes.* Estos microorganismos, que no son cultivables *in vitro,* se caracterizan por carecer de pared celular, poseer un genoma relativamente pequeño. Su tamaño y crecimiento dependen de la capacidad de desarrollo de los tubos cribosos en donde se localizan, además de su condición de parásitos estrictos del floema de la planta hospedadora (Gutiérrez y De la Torre 2008). Debido a que estos microorganismos no son cultivables, los métodos de identificación pueden comprender técnicas moleculares, serológicas y de microscopía electrónica (Reveles, Velásquez y Mauricio 2014).

Estudios realizados en cultivos de papa *(Solanum tuberosum),* identifican a *Candidatus* Phytoplasma como el agente causal de la enfermedad de la punta morada en el país. Esta patología puede llegar a causar daños graves e incluso la pérdida total del cultivo (Crizón 2017; Rivadeneira et al. 2015). La investigación realizada por Lifting, Weir, Pennycook y Clover (2009), estableció la asociación parasitaria que tiene este microorganismo con

la familia de las solanáceas. Actualmente, no existen estudios sobre *Candidatus* Phytoplasma en cultivos de *Physalis peruviana* en Ecuador. En este contexto, el objetivo del presente estudio es aportar con nuevos datos sobre la presencia de este patógeno en cultivos de uvilla en la Sierra norte y centro del Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área y muestreo de investigación.- El campo de estudio se limitó a cuatro localidades que corresponden a las provincias de Pichincha (Tabacundo), Imbabura (Hualzaquí y Niño Jesús) y Cotopaxi (Sigchos). El muestreo aleatorio estratificado se focalizó únicamente a plantas que probablemente estaban enfermas con punta morada tanto de papa como de uvilla. Se colectaron alrededor de 300 hojas con enrollamiento prematuro, amarillamiento o clorosis, coloración púrpura foliar, formación de tubérculos aéreos y acortamiento de los entrenudos. Las muestras fueron transportadas en fundas herméticas selladas y etiquetadas, en cadena de frío para su análisis inmediato en laboratorio.

Procesamiento de las muestras.- Las hojas recolectadas de uvilla y papa se lavaron con agua destilada estéril durante un minuto, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % durante cinco minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril durante un minuto. El enjuague con agua destilada estéril se repitió 3 veces. Las muestras se almacenaron a -20 °C, en fundas herméticas debidamente selladas e identificadas. Las muestras pueden almacenarse hasta máximo seis meses (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria 2016).

Identificación molecular del fitoplasma.- El ADN se extrajo a partir de las muestras con sintomatología característica de la enfermedad como enanismo, clorosis, coloración púrpura foliar y enrollamiento prematuro en las hojas. En la obtención del ADN se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification, se utilizó el protocolo para tejidos de plantas

sugerido por el fabricante (Pomega 2019). La concentración del ADN fue analizada por espectrofotometría (α 260 nm) usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se amplificó la región comprendida entre los genes 16S rRNA, utilizando los *primers* universales 16S1 (5' TGAGAATGGATAAGAGGCTC 3') 16S2 (5' TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG 3') y se utilizó el protocolo descrito por Araujo (2017) cuyas condiciones fueron: 35 ciclos en un termociclador automático a 94 ° C durante 40 segundos, 55 ° C durante 40 segundos y 72 ° C durante 40 segundos, seguido de un paso final de extensión a 72 °C durante 40 segundos. Los productos de PCR fueron visualizados a través de electroforesis en el gel de agarosa al 2% a 80 voltios durante 60 minutos con sus respectivos controles positivo, negativo y marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder Invitrogen ® en un fotodocumentador de luz UV.

Posteriormente, mediante una nueva PCR en su variante anidada, se realizó una nueva amplificación de la región de los genes 16S rRNA y 23S rRNA con los productos de PCR positivos obtenidos de la primera amplificación, utilizando los cebadores universales P1 (5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3') y P7 (5' CGTCCTTCATCGGCTCTT 3') junto con los cebadores específicos R16F2n (5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3') y R16R2 (5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCG 3'). Después de probar los protocolos de Caicedo et al. (2015) y de Araujo (2017), se utilizó el establecido por Castillo, Paltrinieri, Buitrón, y Bertaccini (2018) con modificaciones. La PCR se realizó durante 40 ciclos en un termociclador automático a 94 ° C durante 1 min, 54 ° C durante 1 min (63 ° C para PCR anidada) y 72 ° C durante 2 min, seguido de un paso final de extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X a 80 voltios durante 90 minutos con su

respectivo marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder Invitrogen ® y fueron visualizados en un fotodocumentador de luz UV. Estos fueron purificados y secuenciados mediante el método de Sanger por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas mediante el programa de Análisis Genético Molecular Evolutivo versión 7.0 (MEGA7, por sus siglas en inglés) con la herramienta *ClustalW* (Kumar, Stecher y Tamura, 2015). Finalmente, las secuencias obtenidas fueron analizadas con la base de datos disponible en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante la herramienta informática básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) (De Jonghe, Deeren, Goedefroit y Ronse, 2019).

RESULTADOS

Cuantificación de ADN.- A partir de las muestras colectadas de uvilla y papa con sintomatología característica de la enfermedad (Figura 1), se extrajo el ADN y mediante espectrofotometría se obtuvieron lecturas que corresponden a concentraciones desde los 31.9 hasta los 182.1 ng/µL. La pureza del ADN alcanzó valores de 1.5 hasta 1.92 indicando que la mayoría de las muestras presentaron rangos aceptables (Tabla 1). Las lecturas del ADN no presentaron buena calidad en relación a las absorbancias entre 260/280, sin embargo, las muestras fueron consideradas para amplificar los genes, ya que, la mayoría se mantenía en el rango aceptable de lectura de 1.8 a 2.0 (Tabla 1).

Caracterización genética.- El ADN de las muestras fue amplificado en la región comprendida entre los genes 16S rRNA y 23S rRNA de su genoma. De las 300 muestras colectadas inicialmente, únicamente 87 presentaron amplificación positiva por los cebadores 16S1 y 16S2, obteniendo bandas de un tamaño de 315 pb, evidenciados en gel de agarosa al 2% (Figura 2). De estas 87 muestras, solo tres amplificaron con los

cebadores P1/P7 y R16F2n y R16R2, generando amplicones de un tamaño de 1100 pb y evidenciados en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X (Figura 3). Estos tres productos potencialmente positivos, obtenidos de la PCR anidada produjeron secuencias que fueron editadas y los consenso obtenidos, fueron analizados mediante la herramienta BLAST, pero, no presentaron coincidencia con la identidad del fitoplasma *Candidatus* Phytoplasma (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El aporte de nuevos datos sobre la presencia o ausencia de agentes patógenos, posibles causantes de enfermedades en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana L.*), permite a productores, exportadores y autoridades contar con información para instaurar planes de prevención primaria en las zonas productoras de una forma eficaz y así, reducir posibles pérdidas económicas a mediano y largo plazo.

La punta morada es una enfermedad emergente en países como Colombia, Honduras y México y afecta potencialmente a la familia de las solanáceas. La literatura sugiere que el principal agente causal de esta enfermedad es *Candidatus* Phytoplasma, sin embargo, estudios realizados por Leyva, Ochoa, Leal y Martínez (2002), en cultivos de papa en México, identificaron dos distintos tipos de fitoplasmas en la misma planta hospedera. Esto sugiere que puede existir más de un fitoplasma asociado a la misma enfermedad provocando una infección mixta.

En Honduras, el estudio realizado por Espinoza, Rivera, Brown y Weller (2014), reporta como el agente causal de la enfermedad de punta morada en papa a *Candidatus Liberibacter solanacearum.* Todos los reportes coinciden en que esta enfermedad puede provocar pérdidas significativas de los cultivos.

Los fitoplasmas con frecuencia son difíciles de detectar e identificar, principalmente por la distribución desigual en el floema de la planta hospedera, por la baja cantidad del patógeno en la planta y por la falta de métodos estandarizados que permitan determinar la identidad del microorganismo de una forma más sencilla. La punta morada fue reportada en Ecuador, por primera vez en cultivos de papa, por Caicedo et al. (2015), identificando a *Candidatus* Phytoplasma como el agente causal de la enfermedad. Actualmente en Ecuador, las zonas productoras de uvilla en la sierra comparten las zonas de cultivo con la papa, potenciando así, la propagación y diseminación de dicha enfermedad entre estas dos solanáceas.

La presente investigación inició a partir de la recolección de muestras tanto de uvilla como de papa en las provincias de Cotopaxi, Imbabura y Pichincha, pertenecientes a la zona norte y centro de la Sierra de Ecuador. Las hojas colectadas de las plantas probablemente enfermas con punta morada, presentaron principalmente síntomas como enanismo, enrollamiento prematuro, clorosis o coloración purpura foliar, descartando previamente, la presencia de problemas de nutrición relacionados con la deficiencia de magnesio y zinc (Martínez, Sarmiento, Fischer y Jiménez 2009). Como se mencionó con anterioridad, esta es una enfermedad emergente de difícil detección, sin datos en cultivos de uvilla en el país, actualmente, se desconoce si otros órganos de la planta como las semillas pueden presentar sintomatología característica de esta enfermedad, pudiendo propagar la enfermedad en cultivos de una forma asintomática (Himeno et al. 2014).

La lectura de las muestras de ADN mediante la técnica de espectrofotometría mostró rangos con variaciones aceptables de pureza, si bien, la mayoría de las muestras mantuvo una relación mayor a 1,6 (Tabla 1), algunas de ellas eran inferiores a este rango o perdían pureza conforme transcurría el tiempo de almacenamiento en congelación. En el presente trabajo de investigación, las lecturas de ADN se realizaron entre dos y hasta tres veces

después de un lapso de 30 minutos entre cada lectura, confirmando la variación de rangos en cada muestra, pudiendo influir de esta manera en los resultados de amplificación. Esto se puede asociar al método de extracción de ADN utilizado y la rápida degradación del mismo, posiblemente por la presencia de productos orgánicos resultantes de la misma extracción o a la presencia de una enzima degradadora presente en la muestra (Dhaliwal 2013). El estudio realizado por Araujo (2017), sugiere que, el tejido utilizado para la extracción de ADN debe estar en buen estado y no presente deshidratación, es decir que, en la medida de lo posible, transportar la planta completa como muestra, para no disminuir la cantidad del fitoplasma en el sistema vascular. La temperatura y el horario de toma de muestra en campo también juegan un papel fundamental, ya que, los fitoplasmas son microorganismos de baja tolerancia a las altas temperaturas y como mecanismo de defensa se redistribuyen en el sistema vascular de la planta dificultando así su localización (García 2004).

El análisis molecular realizado mediante PCR convencional mostró amplicones de tamaños esperados, 315 pb (Figura 2), la validez de la PCR pudo ser confirmada junto con los controles positivos *(Bacillus subtilis)* y negativos (*Trichoderma* spp.) respectivamente. De las 300 muestras evaluadas, 87 resultaron positivas para la amplificación del gen 16S rRNA, lo que confirma la presencia de ADN bacteriano (Araujo 2017). Por otro lado, en el caso de la PCR anidada se observaron en el gel, los amplicones de tamaños aproximados a 1100 pb (Figura 3). De esta última, únicamente tres muestras resultaron positivas para la amplificación de la región de los genes 16S rRNA y 23S rRNA. La efectividad de esta prueba no pudo ser confirmada debido a la limitante de los controles positivos. Crizón (2017), Caicedo et al. (2015) y Castillo et al. (2018) reportan la presencia de fitoplasma en cultivos de papa en Ecuador, sin embargo, todos los análisis moleculares fueron realizados en laboratorios del extranjero, lo cual

restringe el acceso a controles que corroboren la validez de los resultados obtenidos en esta investigación (Comunicación personal, Mauricio Crizón y Carmen Castillo).

Finalmente, los amplicones tentativamente positivos fueron secuenciados por el método de Sanger en Macrogen, quienes sugieren que las muestras enviadas para la secuenciación deben tener una mejor concentración de ADN (Macrogen 2019). Lamentablemente, y aunque los distintos protocolos fueron probados en al menos 750 reacciones de PCR, las secuencias no corresponden con la identidad de *Candidatus* Phytoplasma y, por tanto, no pudo ser confirmado molecularmente como el agente causal de la enfermedad de "punta morada" en cultivos de uvilla.

Si bien los resultados de la amplificación concuerdan con los resultados reportados por Castillo et al. (2018), estos son inconsistentes en relación con la identidad de las secuencias. El presente estudio sugiere además que, puede existir más de un fitoplasma presente en la infección, que el agente causal de la enfermedad sea un *Candidatus* diferente al reportado en papa en el país, que la sensibilidad de la prueba por PCR anidada es baja, y que la calidad y pureza del ADN deben ser más altas para lograr mejores resultados. En el caso de existir más de un fitoplasma presente se sugiere que, los productos de PCR anidada sean clonados para una detección más efectiva (Leyva, Ochoa, Leal y Martínez 2002).

La sensibilidad y especificidad de la PCR en su variante anidada no fue la esperada, debido a que, las secuencias de los productos amplificados no coincidieron con la identidad del microorganismo. Esto posiblemente es debido a las siguientes razones: contaminación cruzada durante la transferencia de los productos de amplificación de la primera ronda a un segundo tubo de reacción, contaminación de ADN proveniente del entorno, y contaminación por el producto amplificado (Ahrens y Seemuller 1992). Se

puede minimizar las posibles fuentes de contaminación, distribuyendo correctamente las zonas y el flujo de trabajo en el laboratorio especialmente para el análisis molecular, ya que, juegan un papel importante en la prevención de cualquier tipo de contaminación del entorno en las muestras. El cambio constante de guantes y la limpieza profunda de superficies pueden ser consideradas como soluciones al momento de trabajar con esta prueba. Si una de estas se ve alterada, podrían estimarse como una potencial fuente de contaminación, dando como resultado que, se amplifique la secuencia incorrecta y generando así falsos positivos (Alhudaib y Rezk 2014).

Por otro lado, las variaciones de las secuencias nucleotídicas de los productos amplificados también juegan un papel fundamental en la PCR anidada, debido a que, estas pueden inducir a errores en la hibridación con los cebadores disminuyendo así considerablemente la sensibilidad de la prueba (Girsova et al., 2008).

Cabe destacar que, si bien la PCR anidada es una técnica que aumenta la sensibilidad de la PCR convencional, la desventaja de esta prueba es la posibilidad de contaminación también es mayor debido a las razones antes expuestas, además que, esta no posibilita la cuantificación de la cantidad inicial de ADN blanco que presenta la muestra analizada (Delic 2012). En base a los resultados obtenidos en este estudio se sugiere que se realicen otro tipo de pruebas disponibles para la identificación de este patógeno, que por tiempo y presupuesto no pudieron ser llevadas a cabo en esta investigación tales como: microscopía electrónica, técnicas de serología como ELISA y prueba de LAMP.

CONCLUSIONES

En la presente investigación no se pudo confirmar la identidad de *Candidatus* Phytoplasma como el agente causal de la enfermedad de punta morada en cultivos de uvilla de muestras obtenidas de las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura. La

sensibilidad y la especificidad de la PCR anidada en el presente trabajo no fue la esperada, obteniendo como resultado, la amplificación con posibles falsos positivos. La información obtenida en el presente estudio servirá potencialmente para que futuros ensayos sean exitosos, mejorando las condiciones de las pruebas y minimizando así las posibles fuentes de contaminación o errores dentro de los protocolos.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó con la colaboración y apoyo financiero del proyecto PUCE: Diagnóstico de las enfermedades y de plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana L.*) en el Ecuador, dirigido por Mtr. Jeniffer Yánez, directora del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Adicionalmente, un especial agradecimiento al Dr. Martin Marcial, al Mtr. Andrés Zabala por su aporte y buena voluntad en el desarrollo de esta investigación y también a la empresa Terrafertil por facilitar el acceso a las fincas y a los muestreos realizados durante este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahrens U, Seemuller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polimerase chain reaction that amplifies a sequence of the16S rRNA gene. Phytopatology, 82(2), 828-832. Diponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto88n08_828.PDF

Alhudaib K, Rezk, A. 2014. Molecular characterization of phytoplasma associated disease in tomato (Lycopersicun esculentum) in Saudi Arabia. International Journal of Virology. 1 0:180-191.

Almeyda I, Sánchez J, Garzón J. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. Agricultura técnica en México, 34(2), 141-150. Diponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172008000200001&lng=es&tlng=es

Araujo K., Cambrón J, Cruz J, Ronces L, López J, Torres J. 2018. Compilación de oligonucleótidos para la detección y clasificación de fitoplasmas. Agronomía Mesoamericana, 29(3), 673-694.

Brito B, Espin S, Villacrés E, Vaillent F, Medina G, Badillo, F. 2008. Uvilla (Physalis peruviana L.). Características físicas y nutricionales de la fruta importantes en la investigación y elaboración de pulpas, jugos, concentrados y postres. INIAP, 1-2. Diponible en: http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2623

Bucheli B, González A. 2014. Zonificación agroecológica económica del cultivo de uvilla (Physalis peruviana L.) en el Ecuador a escala 1:250.00 Resumen Ejecutivo. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 1-14. Diponible en: http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/zae/uvilla.pdf

Caicedo J, Crizón M, Pozo A, Cevallos A, Simbaña A, Rivera L, et al. 2015. First report of 'Candidatus phytoplasma aurantifolia' (16SrII) associated with potato purple top in San Gabriel-Carchi, Ecuador. New Disease Reports. 32:20

Castillo C, Paltrinieri S, Buitrón J, Bertaccini A. 2018. Detection and molecular characterization of a 16SrI-F phytoplasma in potato showing purple top disease in Ecuador. Australasian Plant Pathology, 47(3), 311-315. doi:10.1007/s13313-018-0557-9

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. 2016. Fitoplasmas. Secretaria de la convención internacional de proteccion fitosanitaria, 1-16. Diponible en: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP_12_2016_Es_2017-01-11.pdf

Cortés G, Prieto G, Rozo W. 2015. Caracterización bromatológica y fisicoquímica de la uchuva [Physalis peruviana L.] y su posible aplicación como alimento nutraceútico. Ciencia en desarrollo, 6(1), 87-97.

Crizón M. 2017. Identificación molecular del fitoplasma causante de la punta morada de la papa y ensayos de resistencia sistémica adquirida. Universidad Central del Ecuador, 1-79. Diponible en: http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13057/1/T-UCE-0004-43-2017.pdf

Delić, D. 2012. Polymerase chain reaction for phytoplasmas detection. Bosnia y Herzegovina: s.n.

De Jonghe K., Deeren A, Goedefroit T, Ronse A. 2019. First report of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' on elm in Belgium. Plant Disease, 1-6. doi:https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2271-PDN

Dhaliwal A. 2013. Extracción y Purificación de ADN. Rutgers University, 191. Disponible en: http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html

Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. 2011. Hoja botánica: Aguaymanto (Physalis peruviana L.). Botconsult GmbH, 3-4. Diponible en: http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Aguaymanto_2012.pdf

Fisher G, Almanza-Merchán P, Miranda, D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (Physalis peruviana L.). Revista Brasileira de Fruticultura, 1-4. doi:http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13

Garcia M. 2004. Detección, transmición y Caracterización del Fitoplasma asociado a la enfermedad del decaimiento del peral. Universidad Autónoma de Barcelona, 1-146.

Girsova N, Bottner K, Mozhaeva K, Kastalyeva T, Owens A, Lee I. 2008. Molecular detection and identification of group 16SrI and 16SrXII phytoplasmas associated with diseased potatoes in Russia. Plant Disease Journal. 92(4):654

Gutiérrez G, De la Torre, R. 2008. Fitoplasmas: Síntomas y características moleculares. Chapingo Serie Ciencias Forestalearaus y del Ambiente, 14(2). Diponible en: http://www.scielo.org.mx/pdf/rcscfa/v14n2/v14n2a2.pdf

Himeno M, Kitazawa Y, Yoshida T, Maejima K., Yamaji Y, Oshima K., et al. 2014. Purple top symptoms are asocciated with reduction of leaf cell death in phytoplasmainfected plants. Scientific Reports. 4:4111

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution (submitted).

Leyva N, Ochoa J, Leal D, Martínez J. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. Canadian Journal of Microbiology, 48, 1062-1068.

Liefting L, Weir B, Pennycook S, Clover G. 2009. 'Candidatus Liberibacter solanacearum',associated with plants in the family Solanaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology(59), 2274-2276. doi:10.1099/ijs.0.007377-0

López D, Rodríguez, I. 2017. Capacidad y potencial exportador de la Uchuva,Gulupa, Granadilla y Pitahaya en Colombia;2012-2016 (Tesis de pregrado). Universidad del Rosario.

Macrogen Inc. [Internet]. 2018 [31]. Seúl (Corea): Macrogen Inc.; [citado 2019 dic 20]. Disponible en: https://dna.macrogen.com/esp/

Martínez F, Sarmiento J, Fischer G, Jiménez F. 2009. Síntomas de deficiencia de macronutrientes y boro en plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Agron. Colomb. 27, 169-178.

ProEcuador. 2017. Boletín de análisis de mercados internacionales. Instituto de Promoción de Exportaciones de Inversiones, 1. Diponible en: https://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2017/02/PROEC_AM2017_ENERO_FEBRERO.pdf

ProEcuador. 2018. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos – APHIS propone la importación de uvillas frescas del Ecuador. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Diponible en: https://www.proecuador.gob.ec/el-departamento-de-agricultura-de-estados-unidos-aphis-propone-la-importacion-de-uvillas-frescas-del-ecuador/

Promega. 2019. Technical Manual. Promega, 12. Diponible en: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?la=en

Reveles L, Velásquez, R, Mauricio J. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1-49.

Rivadeneira J, Bolaños C, Garcés S, Tello C, Ochoa J, Insuasti M, Cuesta X. 2015. La Punta Morada de la Papa en la Sierra Norte del Ecuador? Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 96-98. doi:10.13140/RG.2.1.3974.1922

FIGURAS



Figura 1. Sintomatología característica de la enfermedad de punta morada en cultivos de *Physalis peruviana L.* A) Planta de uvilla con enanismo y enrollamiento prematuro de las hojas. B) Hojas con manchas cloróticas. C) Hojas con coloración púrpura foliar y clorosis.

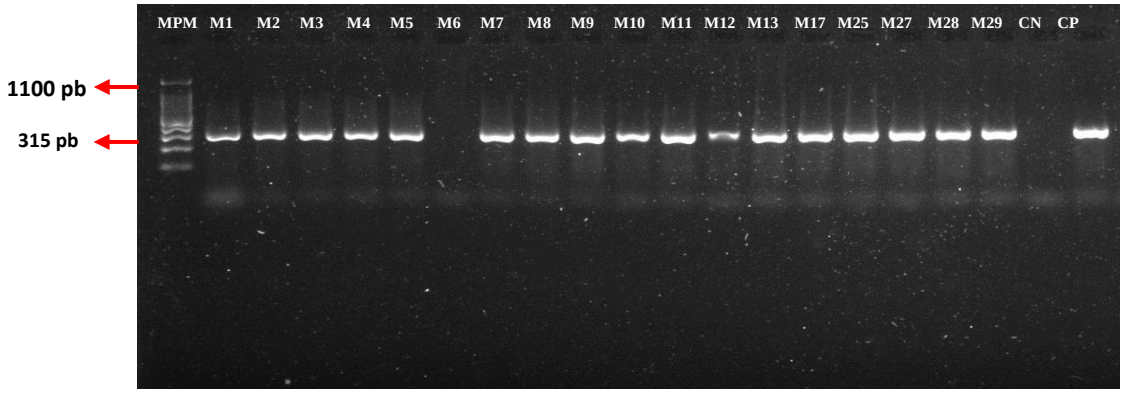


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Amplificación de la región 16S rRNA (315 pb) M= Muestra, CN= Control Negativo, CP= Control Positivo y MPM= Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder Invitrogen ®.

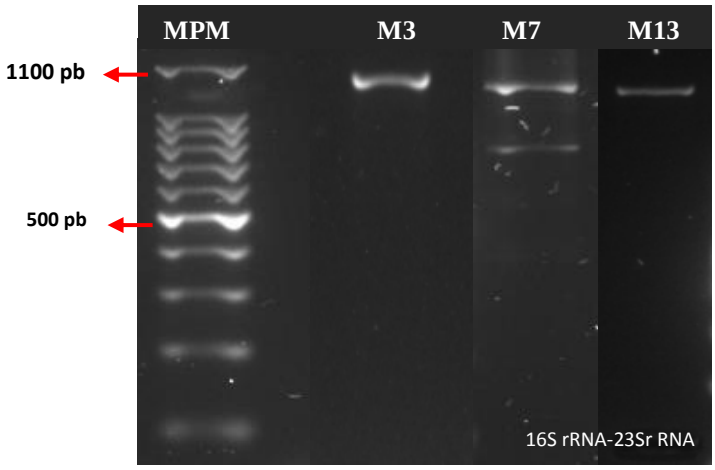


Figura 3. Gel de agarosa 1,5%. Muestra la amplificación de la región de los genes 16S rRNA y 23S rRNA (1100 pb) M= Muestra, y MPM= Marcador de peso molecular1 Kb DNA Ladder Invitrogen ®.

TABLAS

Tabla 1. Concentración y calidad de las muestras de ADN obtenidas en la zona norte y centro de Ecuador.

Código de la muestra	Concentración (ng/µl)	260/280	260/230
3	83.6	1.84	1
7	124.8	1.81	1.13
13	42.7	1.53	0.88
17	39.7	1.5	1.16
25	31.9	1.58	0.76
7n	44.2	1.55	0.81
13N	74.8	1.84	1.15
17N	182.1	1.98	2.84
8 H	101.7	1.83	0.84
10 H	72.4	1.81	0.77

Tabla 2. Secuencias de coincidencia BLAST correspondientes a la identidad de los productos de PCR amplificados.

# ACCESO	IDENTIDAD	% IDENTIDAD
JQ455969.1	Uncultured bacterium clone 069100_404 16S ribosomal RNA gene	100
AC062015.7	Homo sapiens BAC clone CTD-2031E17 from 2, complete sequence	99
KT375691.1	Fungal sp. strain J4E1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence.	100