

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

TÍTULO:

SONDEO DE MARCHITEZ BACTERIANA CAUSADA POR *Ralstonia solanacearum* EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.), EN FINCAS DE PRODUCCIÓN COMERCIAL EN LOS DISTRITOS DE TIERRAS ALTAS Y BOQUETE DE CHIRIQUÍ, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

POR:

EDUARDO PITTÍ

8-784-1803

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2016

SONDEO DE MARCHITEZ BACTERIANA CAUSADA POR *Ralstonia solanacearum* EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.), EN FINCAS DE PRODUCCIÓN COMERCIAL EN LOS DISTRITOS DE TIERRAS ALTAS Y BOQUETE DE CHIRIQUÍ, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO EN CULTIVOS TROPICALES

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

APROBADO

ING. SIMÓN VÁSQUEZ, MSc.

DIRECTOR

ING. JOSÉ CARLOS URETA, MSc.

ASESOR

ING. ZYDDI VISSUETTI, MSc.

ASESOR

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi mamá, María Eugenia Rivera de Ricord, a quien le tengo que agradecer todo su amor, enseñanzas, trabajo y dedicación por habernos educado a mí y a mi hermana. Y al amor de mi vida, Katherine, por cambiar mi vida de manera positiva en 180°: *Per aspera ad astra*.

AGRADECIMIENTOS

Todas las personas mencionadas a continuación influyeron de alguna manera en la elaboración de este trabajo de investigación de tesis. Agradeceré por siempre que me hayan dedicado parte de su valioso tiempo.

De la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) sede Chiriquí, a mi director de tesis y asesores: Profesor Simón Vásquez, Profesor José Carlos Ureta y al Profesor Zyddi Vissuetti, por haberme tomado bajo su tutela y guía para realizar esta aventura llamada investigación de tesis. Del Laboratorio de Biología Molecular a la Licda. Rosemary Serrano por sus invaluable contribuciones y enseñanzas.

Del Laboratorio de Suelos de la FCA sede Campus Central, al Dr. Francisco Mora y a la Licda. Berta Carrera por su apoyo con el análisis de suelo.

De la Sección Académica de la FCA en Panamá y Chiriquí, a la Licda. Xiomara Gómez y a la Licda. Gisela Aguirre.

De las instituciones gubernamentales pude contar con la gentileza y el apoyo de la Ing. Ana Álvarez y el Ing. Luis Rodríguez del MIDA de Boquete; y del Dr. Arnulfo Gutiérrez del IDIAP de Cerro Punta.

A los Productores de los distritos de Tierras Altas y Boquete por su enorme contribución al aceptar ser parte de esta investigación.

Por último agradezco a las personas más importantes en mi vida que me han dado apoyo incondicional: a mi novia Katherine, a mis padres María Eugenia y Cecilio, a mi hermana Mónica, a mi tía Liliana; y a mi Tía María Parada y primo Ernesto Tribaldos que me dieron un hogar en David, Chiriquí.

2016. Sondeo de Marchitez Bacteriana Causada por *Ralstonia solanacearum* en Papa (*Solanum tuberosum* L.), en Fincas de Producción Comercial en los Distritos de Tierras Altas y Boquete de Chiriquí, Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

PALABRAS CLAVES: sondeo, marchitez, bacteriana, papa, PCR.

RESUMEN

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias sede Chiriquí de la Universidad de Panamá desde noviembre de 2015 hasta junio de 2016.

El objetivo de este trabajo fue sondear la ausencia o existencia de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* Raza 3 biovar 2 (R3b2) causante de Marchitez Bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en fincas comerciales ubicadas en las tierras altas de la provincia de Chiriquí, mediante la amplificación de secuencias específicas de ADN aplicando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La colecta al azar de tubérculos sintomáticos y asintomáticos se realizó en la temporada seca y en la temporada lluviosa de 2016. Para cada temporada se colectaron 20 muestras. Paralelamente, se realizó un muestreo de suelos en distintos puntos de estos distritos para registrar sus clases texturales y pH.

Se realizaron extracciones de ADN total de tubérculos de papa y se utilizaron primers o cebadores de secuencias específicas para detectar organismos bacterianos (primers 16S1 y 16S2), para identificar ADN de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (primers PS1 y PS2; OLI1 y Y2) y para constatar la presencia de la Raza 3 biovar 2 (primers 630 y 631) causante de marchitez bacteriana en los trópicos.

Todos los suelos muestreados se clasificaron como franco arenosos. Los valores de pH tuvieron un promedio de 5.4 con un rango de 4.6 a 6.4. Durante la temporada seca, una muestra (perteneciente a Boquete) dio resultados positivos para *R. solanacearum* R3b2. En la temporada lluviosa, una muestra de Boquete y cinco de Tierras Altas dieron resultados positivos para *R. solanacearum*, ninguna muestra dio positivo para R3b2.

R. solanacearum R3b2 fue detectada en una muestra de tubérculo procedente de una finca en el distrito de Boquete, en febrero de 2016. En el distrito de Tierras Altas no se detectó el fitopatógeno causante de Marchitez Bacteriana durante febrero y mayo de 2016.

ABSTRACT

This study was conducted at the Molecular Biology Laboratory, Faculty of Agricultural Sciences, University of Panama, from November 2015 through June 2016.

The objective of this work was to survey the absence or presence of the plant pathogen bacteria *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 (R3b2) that causes Bacterial Wilt on potato crops (*Solanum tuberosum* L.) in commercial farms located in the highlands of the Chiriquí Province, by the amplification of specific DNA sequences using the Polymerase Chain Reaction (PCR). The randomized collection of symptomatic and asymptomatic tuber samples was conducted during the dry and rainy seasons of 2016. For each season, 20 samples were collected. At the same time, soil samples were collected from different locations inside these districts to register soil textures and pH.

Total DNA was extracted from potato tubers and specific DNA primers were used to detect: bacterial organisms (primers 16s1 and 16s2), the *Ralstonia solanacearum* bacteria (primers PS1 and PS2; OLI1 and Y2); and to confirm the presence of Race 3 biovar 2 (primers 630 and 631) which causes Bacterial Wilt in the highlands of tropical agroecosystems.

All soil samples were classified as sandy loam. The values of pH averaged 5.4, ranging from 4.6 to 6.4. During the dry season, one sample (belonging to the Boquete District) was positive for *R. solanacearum* R3b2. During the rainy season, one sample from Boquete and five from Tierras Altas were positive for *R. solanacearum*, none was positive for R3b2.

R. solanacearum R3b2 was detected in one tuber sample from one farm in the Boquete district, in February 2016. In the Tierras Altas district the Bacterial Wilt plant pathogen was not detected during February and May 2016.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Páginas

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Índice de contenido	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Antecedentes	4
1.3 Justificación	4
1.4 Objetivos del estudio.....	5
1.5 Hipótesis	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Generalidades de las bacterias Fitopatógenas	7
2.2 Taxonomía de <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Materiales y Equipos.....	11
3.2 Métodos	13
3.2.1 Puntos Geográficos muestreados	13

3.2.2 Extracción de ADN	15
3.2.3 Amplificación de ADN.....	19
3.2.4 Observación, registro e interpretación de resultados	23
3.2.5 Análisis de Suelo	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Extracción de ADN.....	26
4.2 Resultados de Temporada Seca	27
4.3 Resultados de Temporada Lluviosa.....	31
4.4 Resultados de Análisis de Suelo	36
4.5 Relación de los Resultados Obtenidos con los Puntos Geográficos Muestreados	37
5. DISCUSIÓN.....	40
6. CONCLUSIONES.....	44
7. RECOMENDACIONES	45
8. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Páginas

Tabla 1. Secuencias de primers, pesos moleculares y referencias	21
Tabla 2. Programas de PCR específicos para cada pareja de primers	21
Tabla 3. Resultados de PCR en muestras de febrero de 2016.....	27
Tabla 4. Resultados de PCR en muestras de mayo de 2016.....	31
Tabla 5. Resultados del Análisis de Suelo	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Código alfanumérico para identificar muestras.....	14
Figura 2. Corte y pesado de muestras de tubérculo de papa.....	15
Figura 3. Lisis celular del tejido de papa.....	16
Figura 4. Precipitación de proteínas y lípidos	17
Figura 5. Eliminación de isopropanol, adición de Buffer de lavado y T.E...	18
Figura 6. Termocicladores	19
Figura 7. Cámara de transferencia (PCR).....	20
Figura 8. Confección de gel de agarosa para electroforesis	23
Figura 9. Amplicones y marcadores	24
Figura 10. Repeticiones de extracciones de ADN	26
Figura 11. Electroforesis de PCR con primers 16S1 y 16S2, temporada seca parte 1.....	28
Figura 12. Electroforesis de PCR con primers 16S1 y 16S2, temporada seca parte 2.....	28
Figura 13. Electroforesis de PCR con primers PS1 y PS2, temporada seca	29
Figura 14. Electroforesis de PCR con primers OLI1 y Y2, temporada seca	29
Figura 15. Electroforesis de PCR con primers 630 y 631, temporada seca.	30
Figura 16. Electroforesis de PCR con primers 16S1 y 16S2, temporada lluviosa parte 1	32
Figura 17. Electroforesis de PCR con primers 16S1 y 16S2, temporada lluviosa parte 2	32
Figura 18. Electroforesis de PCR con primers PS1 y PS2, temporada lluviosa parte 1	33
Figura 19. Electroforesis de PCR con primers PS1 y PS2, temporada lluviosa parte 2	33
Figura 20. Electroforesis de PCR con primers OLI1 y Y2, temporada lluviosa parte 1.....	34
Figura 21. Electroforesis de PCR con primers OLI1 y Y2, temporada lluviosa parte 2.....	34
Figura 22. Electroforesis de PCR con primers 630 y 631, temporada lluviosa	35
Figura 23. Puntos geográficos de colecta de tubérculos en los distritos de Tierras Altas y Boquete.....	37
Figura 24. Puntos geográficos del distrito de Boquete donde se encontraron resultados positivos para <i>R. solanacearum</i> R3b2	38
Figura 25. Punto geográfico de Cerro Punta donde se encontraron resultados positivos para <i>R. solanacearum</i> , negativos para R3b2.....	39

1. INTRODUCCIÓN

La papa constituye el quinto cultivo más producido en el mundo y es uno de los alimentos básicos de la humanidad. La planta de papa desarrolla un tubérculo rico en carbohidratos que constituyen el 75 % de su masa seca total, tiene una buena proporción de biomasa comestible y es una importante fuente de calorías con altos rendimientos por área de superficie. Adicionalmente aporta micronutrientes, vitaminas y minerales que son esenciales para la salud.

La FAO (2008) estima que dos tercios de la producción mundial de papa son consumidos de alguna forma por los humanos, el resto se utiliza para alimentación animal y en un sinnúmero de industrias como la farmacéutica, de textiles, e incluso tiene potencial para la producción de biocombustible a base de etanol.

En Panamá, para el Censo Agropecuario de 2011 de la Contraloría General de la República, se reportaron 1,287 hectáreas sembradas de papa en todo el país y la cosecha fue de 15,142 toneladas.

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* 1995 es un fitopatógeno bacteriano ampliamente distribuido en los trópicos, sub-trópicos y en regiones templadas cálidas donde puede ser una limitación significativa en la producción de papa.

Tiene un amplio rango de hospederos, incluyendo malezas y se ha clasificado en cinco razas dependiendo del rango de huéspedes y en cinco biovars dependiendo de su reacción a pruebas químicas. En países tropicales se han reportado pérdidas del rendimiento de hasta 75 % como consecuencia de esta patología (Wale y otros, 2008, p. 24)

La bacteria invade a las plantas hospederas a través de su sistema radicular, colonizando los vasos xilemáticos en el sistema vascular. Las plantas infectadas pueden sufrir de amarillamiento, enanismo, marchitamiento y regularmente producen una muerte rápida. Este patógeno puede causar infecciones latentes, en las que hay altas poblaciones pero la bacteria no manifiesta síntomas de enfermedad (Sánchez *et al*, 2008).

Tomando en cuenta que el costo de la semilla de papa puede representar hasta el 18 % de los costos de producción (MIDA, 2013) y que el manejo integrado de la marchitez bacteriana se fundamenta en la utilización de semillas de cultivares resistentes, es imperativo que se realicen muestreos de los lotes de semilla para detectar oportunamente la incidencia de la enfermedad con técnicas precisas y confiables.

Algunos de los métodos empleados para la detección de *R. solanacearum* en papa incluyen serología, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y frotis en medios de cultivo (Wale y otros, 2008, p. 25).

1.1 Planteamiento del problema

En cuanto a la importancia económica, *R. solanacearum* es considerado como un patógeno cuarentenario tanto en Europa como en las Américas. Se ha establecido cero tolerancia para este patógeno y causa daño económico en tres maneras diferentes: (i) por pérdida directa del cultivo durante su desarrollo y almacenamiento (ii) por el rechazo de lotes infectados de semilla y de medidas de control, y (iii) por la pérdida de mercados de exportación y dificultad en el desarrollo de nuevos mercados. El hallazgo de un solo tubérculo infectado puede resultar en consecuencias económicas enormes, no solo para el productor individual sino para un área entera de productores de semilla (Vreugdenhil *et al*, 2007).

“Desde una perspectiva global, *R. solanacearum* es, después de *Phytophthora infestans* (Tizón tardío), probablemente el patógeno económicamente más importante en la papa. En las regiones tropicales y subtropicales, la incidencia de marchitez bacteriana puede ser muy alta y resulta en altas pérdidas del rendimiento. Se ha encontrado que la incidencia de infecciones latentes en la semilla puede ser tan alta como 15 a 19 % (Pradhanang *et al.*, 2000)” (Vreugdenhil *et al*, 2007).

1.2 Antecedentes

En años recientes la detección de *R. solanacearum* en lotes de semilla de papa proveniente de algunos países de la Unión Europea y de EEUU provocó la restricción de importación de semilla de papa. El IDIAP inauguró en el 2015 un programa de producción de semilla de papa, integrando técnicas de propagación *in vitro* para asegurar materiales de propagación libres de la enfermedad.

1.3 Justificación

Son pocos o inexistentes los estudios sobre la presencia de marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* en los campos de producción de papa de tierras altas y que lleguen a determinar que se trata de cepas de Raza 3 biovar 2, vinculada a los climas frescos de los trópicos con altitudes mayores a 2,500 msnm.

Los métodos tradicionales para detectar *R. solanacearum* son la inspección visual del material de siembra y siembra selectiva seguida por caracterización bioquímica. Debido a la dispersión internacional de esta bacteria a través de la infección latente, se requieren métodos de detección más sensitivos y rápidos para controlar la propagación de este patógeno a nuevas áreas.

1.4 Objetivos del Estudio

1.4.1 Objetivo General

Realizar un sondeo de la presencia de *R. solanacearum* Raza 3 biovar 2 (R3b2), asociada al cultivo de papa en climas frescos, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.4.2 Objetivos Específicos

- Evidenciar la existencia de organismos bacterianos en tubérculos de papa extraídos de fincas de producción comercial mediante las secuencias específicas del gen endógeno 16S rRNA (primers 16s1 y 16s2).
- Detectar la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en los campos mediante el uso de los pares de primers PS1 – PS2 y OLI1 – Y2.
- Constatar la presencia de *Ralstonia solanacearum* R3b2 en los campos mediante el uso de los primers 630 - 631.

1.5 Hipótesis

Ho: con la implementación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se confirma la ausencia de la bacteria fitopatógena *R. solanacearum* R3b2 en campos de producción comercial de papa en los distritos de Tierras Altas y Boquete.

Ha: con la implementación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se confirma la presencia de la bacteria fitopatógena *R. solanacearum* R3b2 en campos de producción comercial de papa en los distritos de Tierras Altas y Boquete.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de las Bacterias Fitopatógenas

De los cientos de miles de especies de bacterias, relativamente pocas son patógenos importantes de la papa. Sin embargo, las que sí atacan al cultivo de papa, llegan a manifestarse como unas de las enfermedades más agresivas. Algunas de las razones son: Primero, las bacterias tienen el potencial de multiplicarse rápidamente si persisten condiciones favorables, incrementando el inóculo y la presión de la enfermedad en un corto periodo de tiempo. Segundo, los patógenos bacterianos son muy contagiosos y se esparcen rápidamente. Tercero, durante las primeras etapas del desarrollo de algunas enfermedades causadas por patógenos, la infección podría estar latente o no detectada. Cuarto, las enfermedades bacterianas son difíciles de controlar, por ejemplo, hay pocas opciones de químicos o antibióticos que sean útiles (Wale *et al*, 2008).

2.2 Taxonomía de *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum E.F. Smith se clasifica:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Ralstoniaceae

Género: *Ralstonia*

Especie: *Ralstonia solanacearum*, (NCBI,

2011)

Vreugdenhil *et al* (2007) afirma:

(...) *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (Anteriormente *Pseudomonas* y *Burkholderia solanacearum*) causa marchitez bacteriana, también conocida como pudrición parda (Hayward, 1991). Esta enfermedad es una limitación mayor en la producción de papa en las regiones tropicales y subtropicales, pero también se ha convertido en una amenaza en los países templados de Europa (Janse, 1996). La bacteria es Gram-negativa, no formadora de esporas, aeróbica, móvil y es un bacilo. Crece relativamente rápido, con colonias siendo visibles a dos días de haber sido cultivadas en medio nutritivo de agar.

Vreugdenhil *et al* (2007) también sostiene que *R. solanacearum* tiene un rango amplio y diverso de hospederos. Tradicionalmente se ha clasificado informalmente en cinco Razas en base a la diferencia del rango de huéspedes y en seis Biovares en base a características bioquímicas y fisiológicas (He y Hua, 1985; Fegan y Prior, 2005). Los Biovares 1 al 4 y las cepas de Raza 1 y 3 causan marchitez bacteriana en papa. El Biovar 2 es sinónimo de Raza 3 e incluye cepas adaptadas a regiones templadas y frescas en grandes altitudes en áreas subtropicales.

Las cepas del Biovar 2 principalmente tienen el inóculo inicial en semillas de papa que son genéticamente y fenotípicamente homogéneas. Las cepas de papa de los Biovares 1, 3 y 4 son agrupadas en la Raza 1 y son su inóculo inicial proviene principalmente del suelo de las regiones tropicales.

“La marchitez típica causada en las plantas por *R. solanacearum* pareciera ser mayormente por la obstrucción del sistema vascular por grandes cantidades de polisacáridos extracelulares (PSEs) producidos por la bacteria (Schell, 1996; Genin y Boucher, 2002)” (Vreugdenhil *et al* 2007).

En campo los síntomas causados por *R. solanacearum* son marchitez, enanismo, amarillamiento del follaje y colapso de los tallos. Las cepas virulentas de *R. solanacearum* colonizan el tejido vascular donde producen grandes cantidades de PSEs. La obstrucción del sistema vascular interfiere con el movimiento del agua y resulta en marchitamiento. Al colocar secciones infectadas de tallo en agua, se pueden observar finas hebras blancas de exudado bacteriano que rezuma de los haces vasculares cortados, es un diagnóstico característico de la enfermedad.

“Los síntomas de marchitez bacteriana se desarrollarán con altas densidades bacterianas en condiciones de alta humedad y temperaturas mayores a 25°C. La resistencia de algunos cultivares a la marchitez bacteriana es dependiente de la temperatura y varía con la cepa bacteriana. Algunos cultivares de papa que muestran resistencia a bajas temperaturas se vuelven susceptibles a altas temperaturas (French, 1994).” Vreugdenhil *et al* (2007).

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En el año 1983 Kary Mullis y colegas, iniciaron una revolución científica con la invención y puesta en práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés *Polymerase Chain Reaction* o PCR). El PCR como tecnología estableció muchas aplicaciones específicas y diversas que han crecido desde su invención. El PCR ha jugado un papel fundamental como tecnología aplicada en la era genómica que experimentamos hoy en día. El poder de analizar secuencias genómicas completas de moléculas específicas ha utilizado el PCR como la base de diversas técnicas analíticas (Bustin, 2009).

La habilidad de poder secuenciar el genoma de diversas especies y de discriminar entre individuos de una misma especie ha necesitado del PCR como un componente fundamental (Bustin, 2009).

Bustin (2009) afirma:

El conocimiento de los genomas ha creado la habilidad de identificar secuencias que representan genes codificadores que constituyen los planos para la construcción de proteínas. Es de gran interés científico estudiar la regulación de estos mensajes de genes codificadores de moléculas ribonucleicas (ARNm). El estudio de la expresión de genes ha llevado a un mejor entendimiento de diferentes estados biológicos que existen en distintos tipos de tejidos, reflejando sus diferentes funciones. Los cambios en la expresión de genes proveen una percepción a las diferencias funcionales y moleculares subyacentes que existen entre tejidos muertos y tejidos vivos.

Según SENASICA (2014):

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular (...) cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta a partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las polimerasas del ADN para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es necesario realizar previamente la extracción de ADN de la bacteria de partes vegetales y/o crecimiento de bacterias en medios de cultivo procedentes de muestras de suelo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- Hojas de bisturí
- Tubos Eppendorf (Tubos de microcentrífuga) de 1.5 y 0.2 ml
- Varilla de policia
- Micropipetas y sus puntas correspondientes
- Buffer 2 X CTAB
- Buffer CTAB
- Mercapto-Etanol
- Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1)
- Isopropanol
- Buffer de lavado (Etanol-acetato de amonio)
- Buffer Tris-EDTA (TE)
- Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE)
- Kits de amplificación de ADN
- Secuencias de primers
 - 16s1 - 5' - TgAgAATggATAAgAggCTC - 3'
 - 16s2 - 5' - TgTTgTTCCCCTCCCAAggg - 3'
 - OLI1 - 5' - ggggTAgCTTgCTACCTgCC - 3'
 - Y2 - 5' - CCCACTgCTgCCTCCCgTAggAgT - 3'
 - PS1 - 5' - AgTCgAACggCAgCGGGGG - 3'
 - PS2 - 5' - ggggATTCACATCggTCTTgCA - 3'

- 630 - 5' - ATACAgAATTCgACCGgCACg - 3'
- 631 - 5' - AATCACATgCAATTCgCCTACg - 3'

- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Baño María
- Agitador Vortex
- Microcentrífuga
- Cámara de electroforesis horizontal
- Transluminador UV
- Lentes con protección de rayos U.V.
- Guantes de nitrilo
- Termociclador
- Cámara fotográfica

3.2 Métodos

Esta investigación fue realizada en cinco etapas: 1) Puntos Geográficos Muestreados, 2) Extracción de ADN, 3) Amplificación de ADN y 4) Observación, captura e interpretación de los resultados, 5) Análisis de suelo

3.2.1 Puntos Geográficos Muestreados

Con la colaboración de las direcciones del MIDA de Boquete y del IDIAP de Cerro Punta se pudo crear un enlace con los productores de papa de estos distritos en la provincia de Chiriquí, República de Panamá. Se visitaron distintas fincas de producción comercial de papa y a cada productor se le informó sobre el objetivo de esta investigación en cuanto al sondeo de marchitez bacteriana, conocida como *dormidera* por su efecto de marchitamiento, causada por *Ralstonia solanacearum*. En total se visitaron seis productores en el distrito de Boquete y siete productores en el distrito de Tierras Altas, haciendo un total de 13 fincas visitadas. La colecta de tubérculos de papa fue realizada en el año 2016 en dos temporadas climatológicas (seca y lluviosa).

La colecta correspondiente a la temporada seca se llevó a cabo en los días 17 y 18 de febrero en los distritos de Boquete y Cerro Punta respectivamente. La colecta de la temporada lluviosa se realizó en los días 23 y 24 de mayo en los distritos de Boquete y Cerro Punta respectivamente.

Para cada temporada se colectaron 20 muestras, 6 de Boquete y 14 de Cerro Punta. Debido a que *Ralstonia solanacearum* Raza 3 biovar 2 en algunos casos

está presente en los tubérculos sin manifestar signos fitopatológicos, se colectaron tubérculos de plantas sintomáticas y asintomáticas al azar.

Con el propósito de tener una vinculación directa de las muestras colectadas en campo y las muestras de laboratorio, se designó un código alfanumérico para cada muestra de campo. El código se estableció indicando tres tipos de información: a) lugar de colecta; b) mes y día (primera letra del mes y día); guion; c) número de muestra del lugar de colecta (Figura 1). Las bolsas plásticas con cierre de cremallera donde se colocaron los tubérculos fueron rotuladas con este código alfanumérico.

a

Tubo	Muestra	Tubo	Muestra
21B	BF17-1	32B	CPF18-6
21C	BF17-1	32C	CPF18-6
22B	BF17-2	33B	CPF18-7
22C	BF17-2	33C	CPF18-7
23B	BF17-3	34B	CPF18-8
23C	BF17-3 BF17-3 hectárea	34C	CPF18-8
24B	BF17-4	35B	CPF18-9
24C	BF17-4	35C	CPF18-9
25B	BF17-5	36B	CPF18-10
25C	BF17-5	36C	CPF18-10
26B	BF17-6	37B	CPF18-11
26C	BF17-6	37C	CPF18-11
27B	CPF18-1	38B	CPF18-12

b

Lugar de colecta	Mes	Día	Número de muestra	Código
B (Boquete)	Febrero	17	1	BF17-1
CP (Cerro Punta)	Febrero	18	1	CP18-1
B (Boquete)	Mayo	23	1	BM23-1
CP (Cerro Punta)	Mayo	24	1	CPM24-1

Figura 1. Código alfanumérico para identificar las muestras colectadas en campo: a) bitácora con los códigos anotados para la colecta de febrero de 2016; b) clave del código para identificar cada muestra.

3.2.2 Extracción de ADN

Al día siguiente después de las colectas de tubérculos se realizaron las extracciones de ADN con el protocolo CTAB. Se utilizó el Protocolo Estándar de Extracción de ADN (Hu, 2002).

Con la ayuda de un bisturí se extrajo una sección cuadrada de tejido vegetal del área del estolón y se procuró tener una masa de 0.2 g para cada muestra. La sección extraída fue cortada en trozos más pequeños para facilitar el macerado. Cada muestra de tejido vegetal fue colocada en un microtubo previamente autoclavado y rotulado (Figura 2).



Figura 2. Corte, pesado de 0.2 g de tubérculo de papa (área del estolón) y su colocación en microtubos previamente autoclavados y rotulados.

Para la lisis celular del tejido de papa, a cada microtubo se le añadieron 100 μ L del Buffer CTAB. Con una varilla metálica se maceraron los pedazos de papa. Se agregaron 900 μ L más de Buffer CTAB y en la campana de gases se le adicionó a cada muestra 2 μ L de 2-mercaptoetanol.

Se homogenizaron las muestras con el agitador Vortex y luego se colocaron en el Baño María durante 30 minutos a 65°C (Figura 3) para la digestión del ADN.



Figura 3. Lisis celular del tejido de papa: a) adición del buffer CTAB y macerado; b) aplicación de 2-mercaptoetanol; c) homogenización en el agitador Vortex; d) digestión en baño maría durante 30 minutos a 65°C.

Culminada la digestión del ADN, se removieron las muestras del Baño María y se adicionaron 400 μ L de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) en la campana de gases para separar el ADN de proteínas y lípidos. Las muestras se homogenizaron en el Vortex y se centrifugaron durante siete minutos a 13,000 r.p.m. Con una micropipeta se extrajeron aproximadamente 400 μ L del sobrenadante, teniendo cuidado de no extraer la fase inferior y utilizando una punta nueva de la micropipeta para cada muestra (Figura 4).



Figura 4. Precipitado de proteínas y lípidos: a) adición de cloroformo-álcohol isoamílico; b) centrifugado de las muestras; c) transferencia del sobrenadante a microtubos nuevos.

Luego de la transferencia del sobrenadante a tubos limpios, se repitió la adición de 400 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico, homogenización, centrifugación y transferencia del sobrenadante. Se llenaron los microtubos con isopropanol (almacenado en un congelador), se agitaron manualmente y se dejaron reposar las muestras durante una hora en el congelador para su precipitación.

Luego de haberse precipitado el ADN, se centrifugaron las muestras durante seis minutos a 12,000 r.p.m. para formar un pellet y luego se eliminó el isopropanol por decantación. Se dejaron secar los microtubos al aire durante cinco minutos.

Se adicionaron 1,000 μ L de Buffer de lavado (Etanol-acetato de amonio) para eliminar residuos de los reactivos de los pasos anteriores y se dejaron reposar las muestras durante 20 minutos. Se eliminó el Buffer de lavado y se esperó a que se secaran. Por último se adicionaron 100 μ L de Buffer TE (Figura 5) y homogenizó en el agitador Vortex para resuspender el ADN.

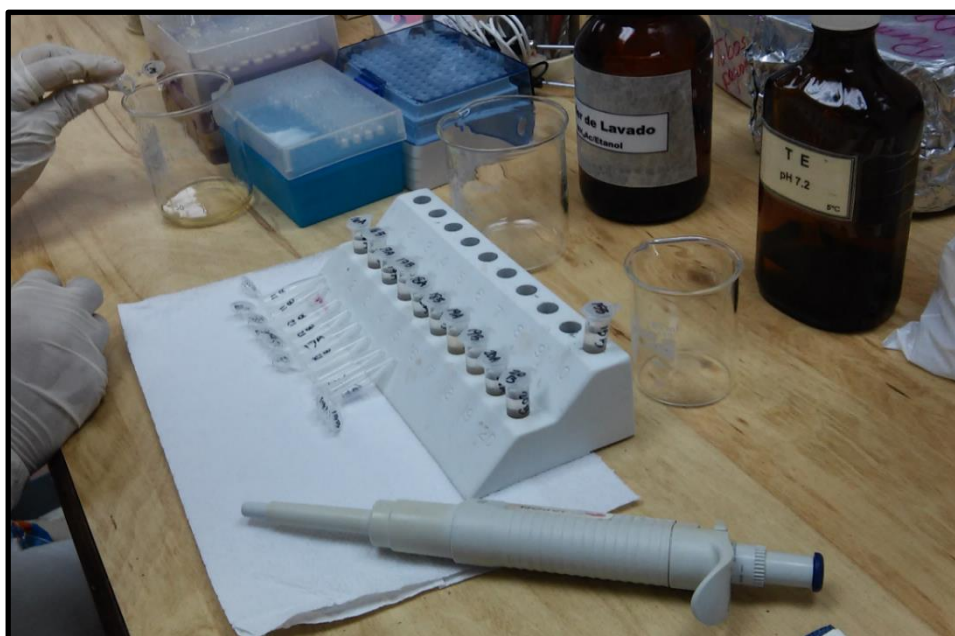


Figura 5. Adición, eliminación y secado al aire por separado de isopropanol y buffer de lavado. Resuspensión del ADN extraído en buffer T.E.

3.2.3 Amplificación de ADN

El ADN extraído de las muestras se amplificó en termocicladores GeneAmp PCR System 2700 y 2720 de Applied Biosystems™ con cebadores o primers específicos para cada fase del sondeo.



Figura 6. Termocicladores GeneAmp PCR System 2700 y 2720 marca Applied Biosystems™.

La primera amplificación se realizó para detectar organismos bacteriales utilizando los primers 16s1 y 16s2 (Kim *et al*, 2008). La segunda y tercera amplificación se realizaron para detectar *R. solanacearum* con los primers OLI1 y Y2 (Seal *et al*, 1993); PS1 y PS2 (Patrik y Maiss, 2000). La cuarta amplificación se efectuó para identificar *R. solanacearum* R3b2 con los primers 630 y 631 (Fegan *et al*, 1998).

Previo a la preparación de las muestras para colocarlas en los termocicladores, se tomaron las precauciones de asepsia en la cámara de transferencia. Las puntas y microtubos para PCR se autoclavaron, la superficie de trabajo fue limpiada con etanol al 70 % y con agua libre de Rnasas, finalmente se encendió la luz ultravioleta durante 30 minutos.

En una bandeja con agua y hielo se prepararon las muestras de ADN extraído para el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR al mezclar 5 μL de la solución de ADN extraído con 4.5 μL de agua libre de nucleasas, 12.5 μL de PCR Master Mix Promega™, 3 μL entre los dos primers correspondientes (1.5 μL cada uno), dando un volumen total de 25 μL .



Figura 7. Cámara de transferencia esterilizada, con la bandeja de reactivos para preparar una alícuota de ADN extraído para PCR.

Los pares de primers utilizados fueron: a) 16s1 y 16s2; b) OLI y Y2; c) PS1 y PS2; d) 630 y 631 (Tabla 1). Para cada pareja de primers se utilizó un programa específico de desnaturalización, hibridación y polimerización con diferentes duraciones, temperaturas y ciclos (Tabla 2).

Tabla 1. Secuencias de primers, pesos moleculares y referencias.

Primers	Secuencia	Peso molecular	Referencias
16s1	5' - TgAgAATggATAAgAggCTC - 3'	315 pb	Trejo <i>et al.</i> 2015
16s2	5' - TgTTgTTCCCCTCCCAAggg - 3'	315 pb	Trejo <i>et al.</i> 2015
OLI1	5' - ggggTAgCTTgCTACCTgCC - 3'	288 pb	Seal <i>et al.</i> 1993
Y2	5' - CCCACTgCTgCCTCCgTAggAgT - 3'	288 pb	Seal <i>et al.</i> 1993
PS1	5' - AgTCgAACggCAgCGGGGG - 3'	533 pb	Pastrik y Maiss. 2000
PS2	5' - ggggATTTACATCggTCTTgCA - 3'	533 pb	Pastrik y Maiss. 2000
630	5' - ATACAgAATTCgACCggCACg - 3'	357 pb	Fegan <i>et al.</i> 1998
631	5' - AATCACATgCAATTCgCCTACg - 3'	357 pb	Fegan <i>et al.</i> 1998

Tabla 2. Programas de PCR para sondeo de marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* R3b2 en papa (*Solanum tuberosum* L.) en fincas de producción comercial en los distritos de Tierras Altas y Boquete de Chiriquí, mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Primers	Ciclos	Inicio (°C - tiempo)	Desnaturalización (°C - tiempo)	Alineamiento (°C - tiempo)	Elongación (°C - tiempo)	Elongación final (°C - tiempo)
16s1 y 16s2	25	94°C - 1:30	94°C - 0:40	55°C - 0:40	72°C - 1:00	72°C - 3:00
OLI y Y2	45	94° - 5:00	94°C - 1:00	35.5°C - 1:00	72°C - 2:00	72°C - 10:00
PS1 y PS2	35	96°C - 2:00	94°C - 0:20	67°C - 0:25	72°C - 0:30	72°C - 5:00
630 y 631	30	94°C - 1:30	94°C - 0:15	30°C - 0:58	72°C - 0:30	72°C - 5:00

Para los primers 16S1 y 16S2 se utilizó un programa de PCR de 25 ciclos con las siguientes fases de temperatura y duración en minutos: inicio a 94°C por 1:30, desnaturalización a 94°C por 0:40, alineamiento a 55°C por 0:40, elongación a 72°C por 1:00 y elongación final a 72°C por 3:00.

Para los primers OLI1 y Y2 se utilizó un programa de 45 ciclos con las siguientes fases de temperatura y duración en minutos: inicio a 94°C por 5:00, desnaturalización a 94°C por 1:00, alineamiento a 35.5°C por 1:00, elongación a 72°C por 2:00 y elongación final a 72°C por 10:00.

Para los primers PS1 y PS2 se utilizó un programa de 35 ciclos con las siguientes fases de temperatura y duración en minutos: inicio a 96°C por 2:00, desnaturalización a 94°C por 0:20, alineamiento a 67°C por 0:25, elongación a 72°C por 0:30 y elongación final a 72°C por 5:00.

Para los primers 630 y 631 se utilizó un programa de 30 ciclos con las siguientes fases de temperatura y duración en minutos: inicio a 94°C por 1:30, desnaturalización a 94°C por 0:15, alineamiento a 30°C por 0:58, elongación a 72°C por 0:30 y elongación final a 72°C por 5:00.

El PCR Master Mix marca Promega™ estuvo compuesto por: *Taq* polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffers de reacción en las concentraciones óptimas para una amplificación eficiente de patrones de ADN por medio de PCR.

3.2.4 Observación, registro e interpretación de los resultados

Los amplicones resultantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % diluido en Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X junto con marcadores moleculares para corroborar el peso de las moléculas amplificadas. A los geles de agarosa se le adicionó bromuro de etidio a razón de $0.03 \mu\text{L}/\text{mL}$ para visualizar los productos de PCR. (Figura 8). La cámara de electroforesis utilizada tenía un volumen de 3-L.

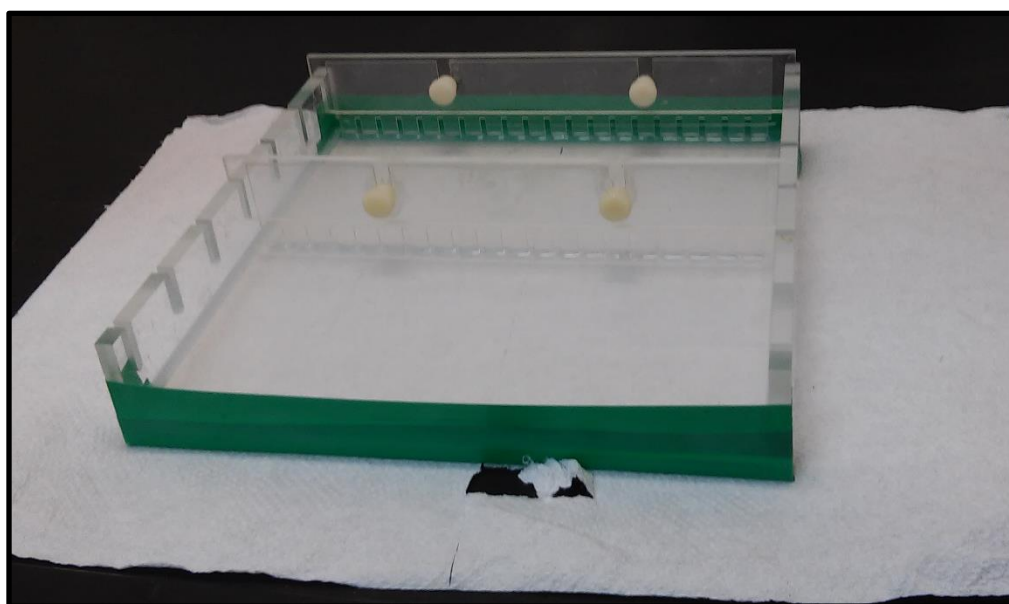


Figura 8. Bandeja para la confección del gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio y los peines para el establecimiento de los pozos para electroforesis.

Se utilizaron marcadores marca AMRESCO™ de 100 pares de bases (13 fragmentos) y 1,000 pares de bases (11 fragmentos) para calcular el peso molecular de los productos de la amplificación. También se utilizó un marcador molecular PROMEGA™ de 1,000 pares de bases (13 fragmentos).

Con una micropipeta se depositaron los marcadores moleculares y los amplicones en los pozos del gel de agarosa (Figura 9). Con precaución se cerró la tapa de la cámara de electroforesis, se verificó la posición del ánodo y del cátodo y se encendió la fuente de poder aplicando aproximadamente 5 voltios/cm por aproximadamente 90 a 120 minutos.

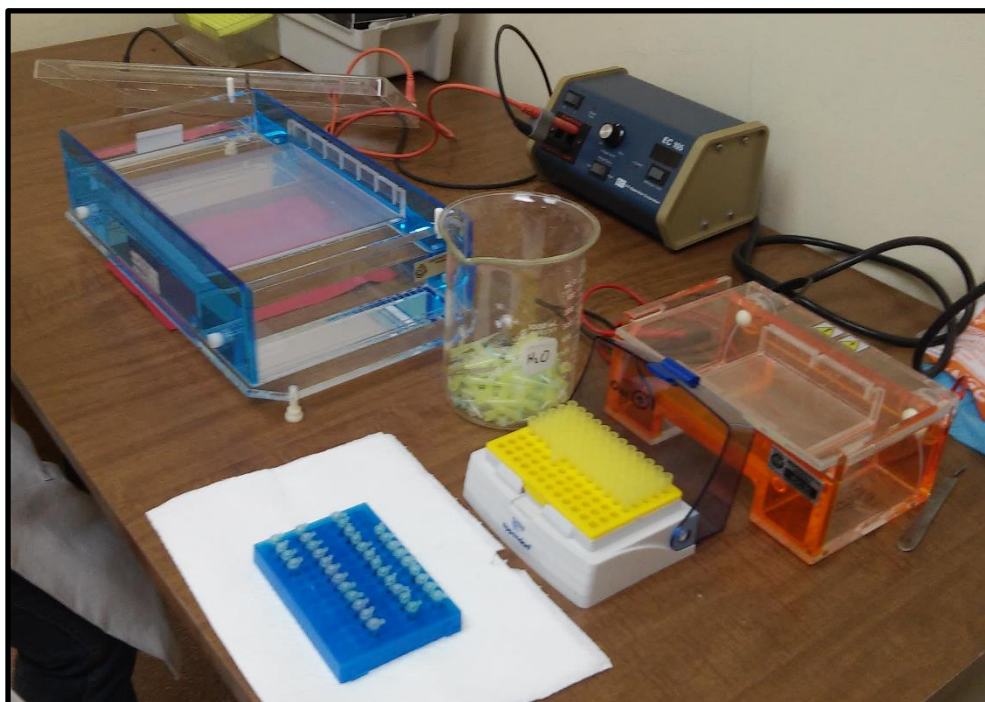


Figura 9. Amplicones y marcadores moleculares listos para ser depositados en el gel de agarosa, dentro de la cámara de electroforesis

3.2.5 Análisis de Suelo

Paralelo a la colecta de tubérculos en los días 23 y 24 de mayo de 2016, se realizó un muestreo de suelos en todas las fincas visitadas de los distritos de Boquete y Tierras Altas. Se realizó este muestreo de suelos con el objetivo de obtener más información acerca de las condiciones de los agroecosistemas de producción de papa.

Los parámetros de análisis de suelo que se consideraron más relevantes para esta investigación fueron granulometría de las partículas del suelo y pH.

El muestreo en cada finca se realizó extrayendo 5 submuestras de suelo de aproximadamente 400 g cada una, haciendo un total de 2 kg por muestra de suelo. Las submuestras se extrajeron aleatoriamente en cada campo.

El análisis se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias ubicada en el Campus Central de la Universidad de Panamá.

4. RESULTADOS

4.1 Extracción de ADN

Las extracciones de ADN, previo al PCR, se verificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa y bromuro de etidio. Se repitieron las extracciones de muestras en las que no se observó fluorescencia significativa (Figura 10).

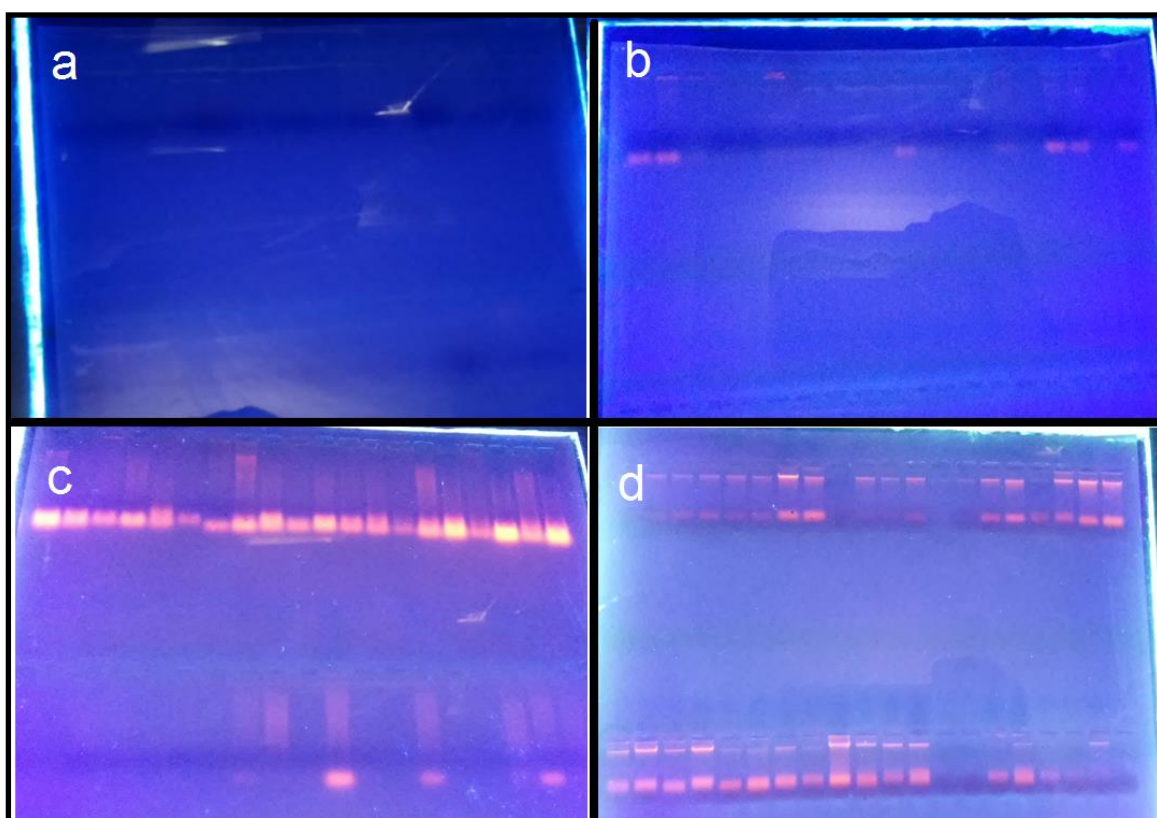


Figura 10. Repeticiones de las extracciones de ADN para mejorar los resultados de electroforesis en gel de agarosa: a) Extracción de 12/2015; b) Extracción del 25/2/2016; c) Extracción del 15/3/2016; d) Extracción del 26/5/2016.

4.2 Resultados de Temporada Seca

Del total de 20 muestras de temporada seca (colectadas en febrero de 2016), solo una muestra perteneciente al distrito de Boquete dio resultados positivos para: ADN bacteriano con los primers 16s1 – 16s2 (Figura 11 y 12), ADN de *R. solanacearum* con los dos pares de primers PS1 – PS2 y OLI1 – Y2 (Figura 13 y 14); y ADN de *R. solanacearum* Raza 3 Biovar 2 con los primers 630 – 631 (Tabla 3 y Figura 15).

Tabla 3. Resultados de PCR en muestras de febrero de 2016

Código	Tubo	16 S1 / 16 S2	PS1 / PS2	OL1 / Y2	630 / 631
BF17 - Campo 1	1	+			
BF17 - Campo 2	2	Tenue			
BF17 - Expuesta 3	3	+			
BF17 - Hedionda 4	4	+	+	+	+
BF17 - Extranjera 5	5	+			
BF17 - Extranjera 6	6	+			
CPF18 - 1	7	Tenue			
CPF18 - 2	8	+			
CPF18 - 3	9	-			
CPF18 - 4	10	+			
CPF18 - 5	11	Tenue			
CPF18 - 6	12	+			
CPF18 - 7	13	+			
CPF18 - Rub 8	14	+			
CPF18 - Rub 9	15	+			
CPF18 - Rub 10	16	+			
CPF18 - Rub 11	17	+			
CPF18 - Rub 12	18	+			
CPF18 - Rub 13	19	+			
CPF18 - Rub 14	20	+			

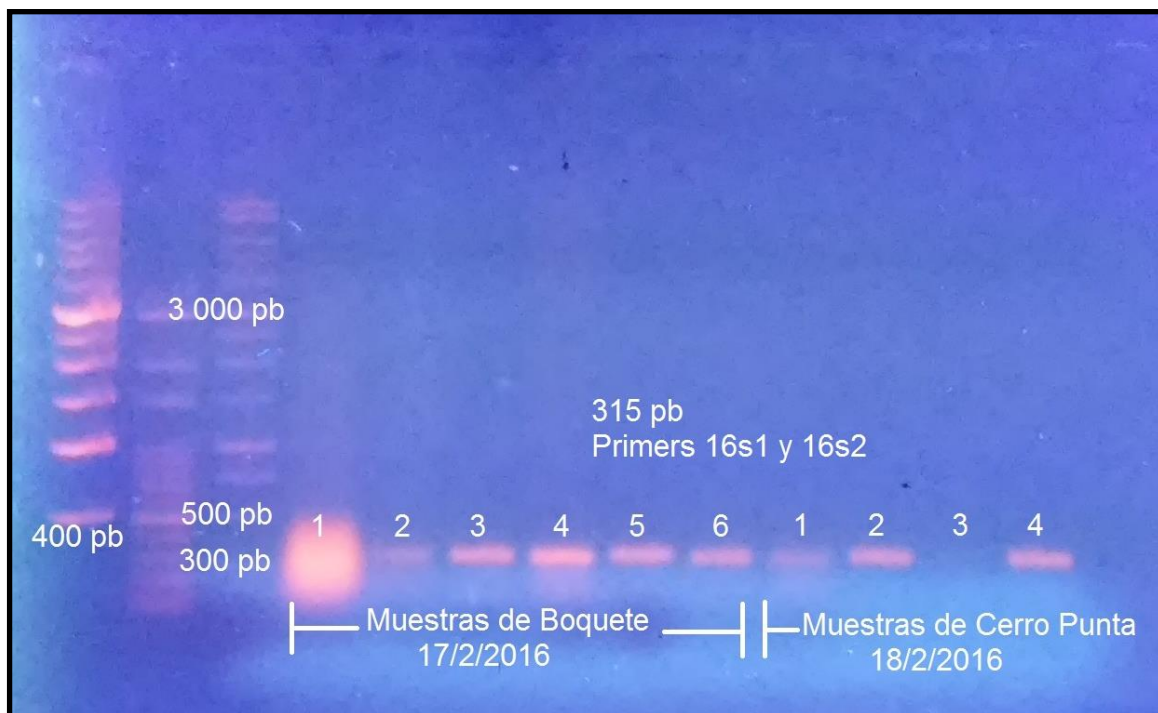


Figura 11. Electroforesis de productos de PCR con los primers 16s1 y 16s2 para detectar organismos bacterianos. Muestras de temporada seca (parte 1)

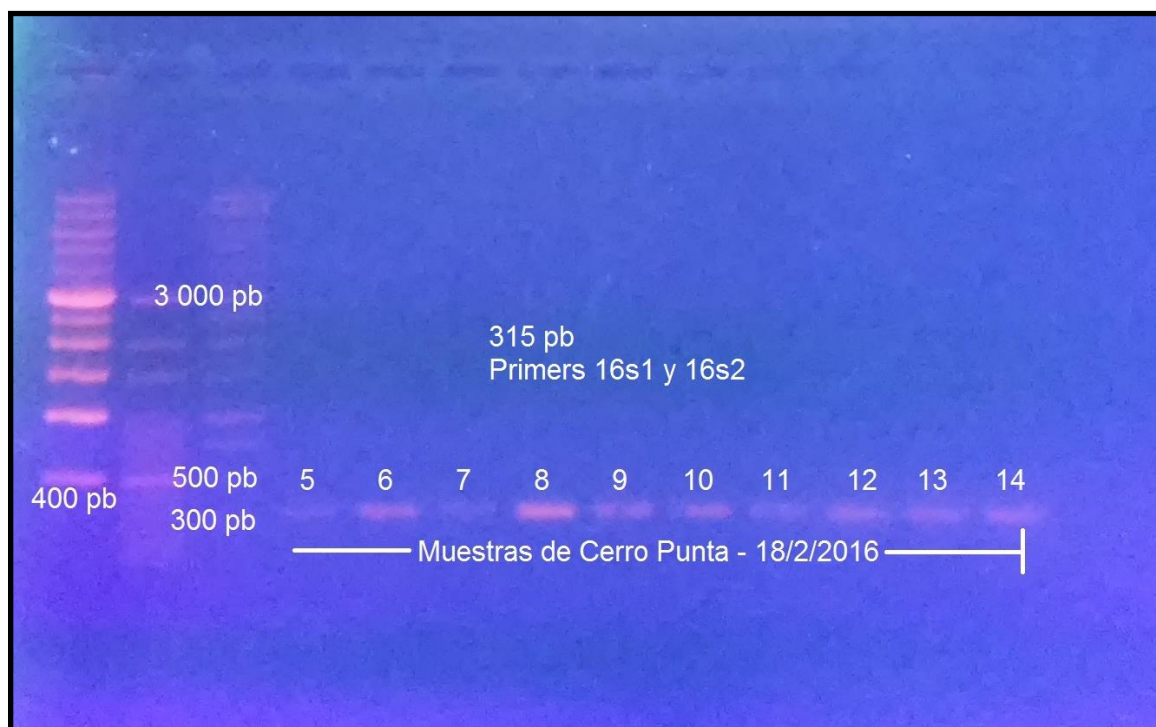


Figura 12. Electroforesis de productos de PCR con los primers 16s1 y 16s2 para detectar organismos bacterianos. Muestras de temporada seca (parte 2)



Figura 13. Electroforesis de productos de PCR con los primers PS1 y PS2 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* en temporada seca.



Figura 14. Electroforesis de productos de PCR con los primers OLI1 y Y2 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* en temporada seca.

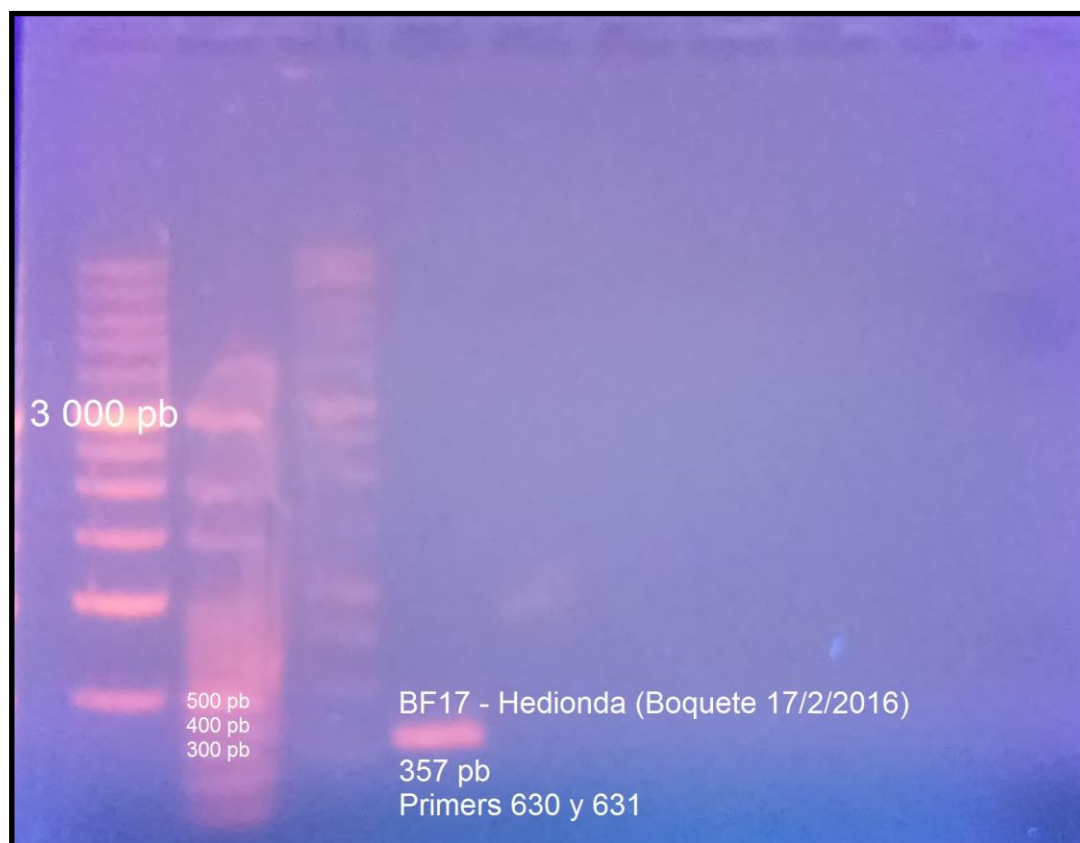


Figura 15. Electroforesis de productos de PCR con los primers 630 y 631 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2. Muestras de temporada seca.

4.3 Resultados de Temporada Lluviosa

De las de 20 muestras de temporada lluviosa (colectadas en mayo de 2016), seis muestras dieron resultado positivo para *R. solanacearum*. De las cuales una muestra pertenece al distrito de Boquete y cinco muestras pertenecientes al distrito de Tierras Altas dieron resultados positivos para ADN bacteriano con los primers 16s1 – 16s2 (Figura 16 y 17), ADN de *R. solanacearum* con los dos pares de primers PS1 – PS2 y OLI1 – Y2 (Figuras 18-21). Ninguna muestra dio resultados positivos para ADN de *R. solanacearum* Raza 3 Biovar 2 con los primers 630 – 631 (Tabla 4 y Figura 22).

Tabla 4. Resultados de PCR en muestras de mayo de 2016

Código	Tubo	16 S1 / 16 S2	PS1 / PS2	OL1 / Y2	630 / 631
BM23-1	1	+	-	-	
BM23-2	2	+	-	+	-
BM23-3	3	+	-	-	
BM23-4	4	+	-	+	-
BM23-5	5	+	+	+	-
BM23-S1	6	+	-	Tenue	
CPM24-1	7	-	-	-	
CPM24-2	8	+	-	Tenue	-
CPM24-2 (2)	9	+	+	+	-
CPM24-2v1.1 (1)	10	+	+	+	-
CPM24-2v1.1 (2)	11	+	+	+	-
CPM24-2 confirmado	12	+	+	+	-
CPM24-3 #1	13	+	+	-	
CPM24-3 #2	14	+	Tenue	Tenue	
CPM24-S2 confirmado amigo 2	15	+	+	+	-
CPM24-S2 confirmado amigo 2	16	+	+	-	
CPM24-5	17	+	-	-	
CPM24-4 (1)	18	+	Tenue	Tenue	-
CPM24-4 (2)	19	+	-	-	
CPM24-6 podrida	20	+	-	Tenue	-

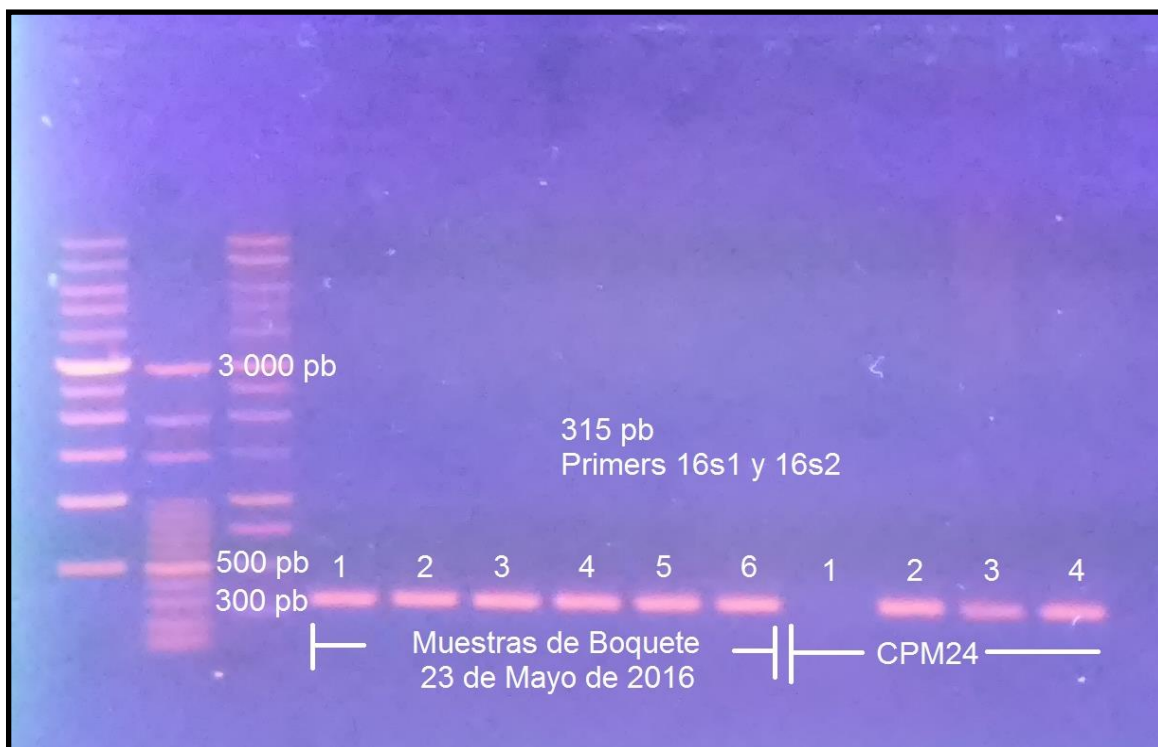


Figura 16. Electroforesis de productos de PCR con los primers 16s1 y 16s2 para detectar organismos bacterianos. Muestras de temporada lluviosa (parte 1).

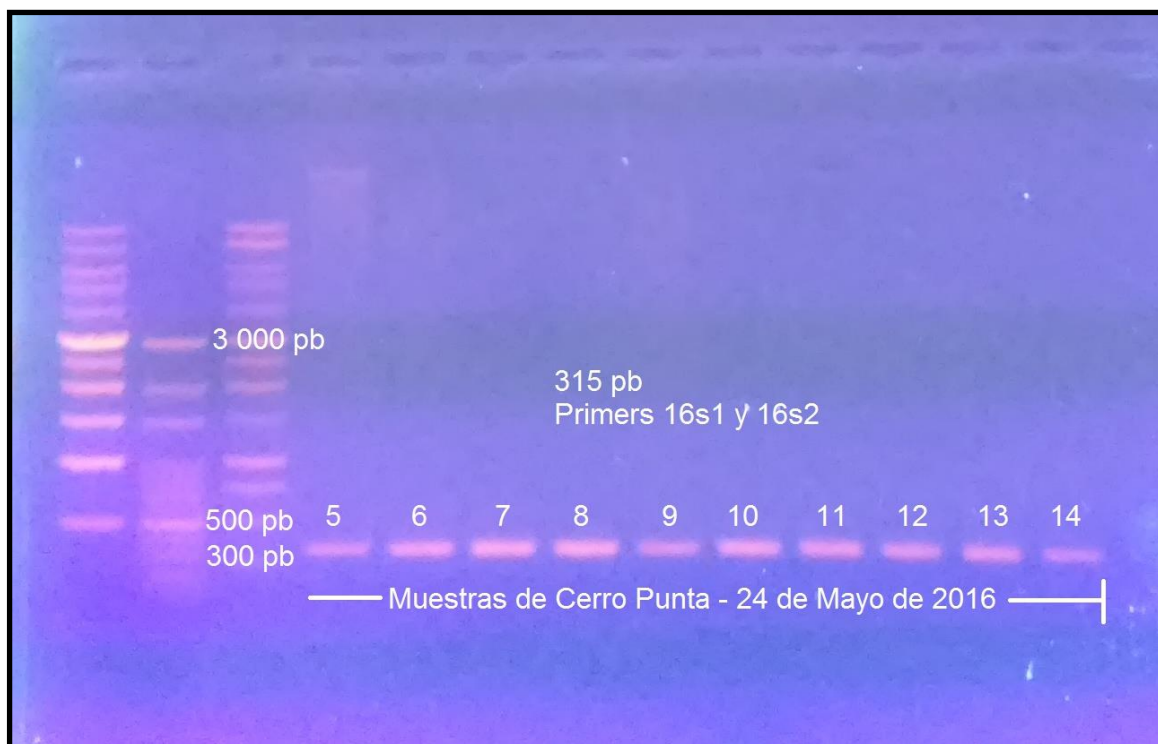


Figura 17. Electroforesis de productos de PCR con los primers 16s1 y 16s2 para detectar organismos bacterianos. Muestras de temporada lluviosa (parte 2).

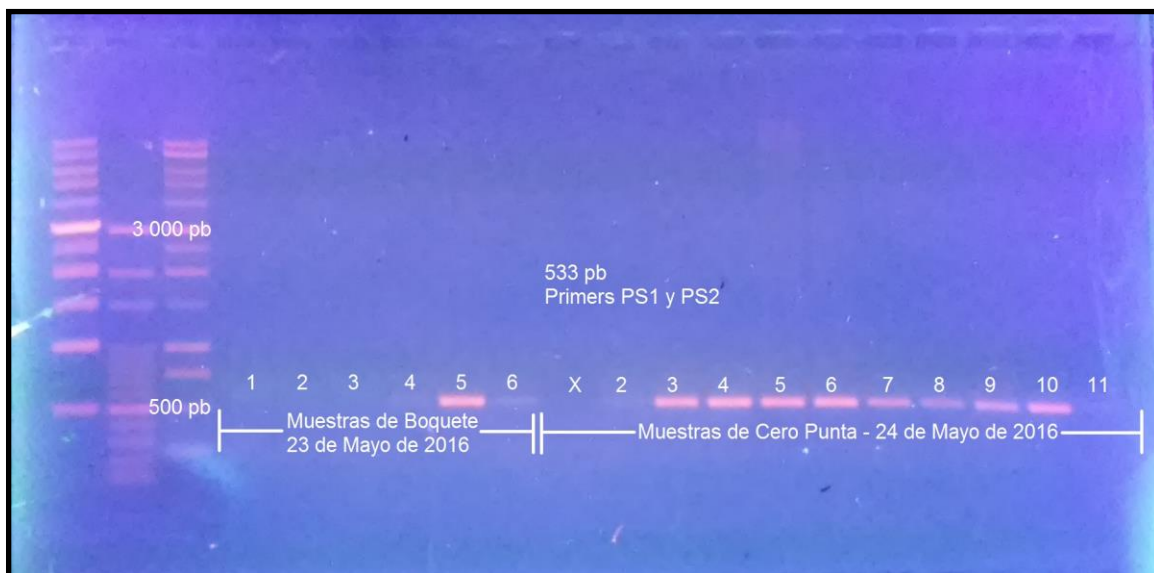


Figura 18. Electroforesis de productos de PCR con los primers PS1 y PS2 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* en temporada lluviosa (parte 1).

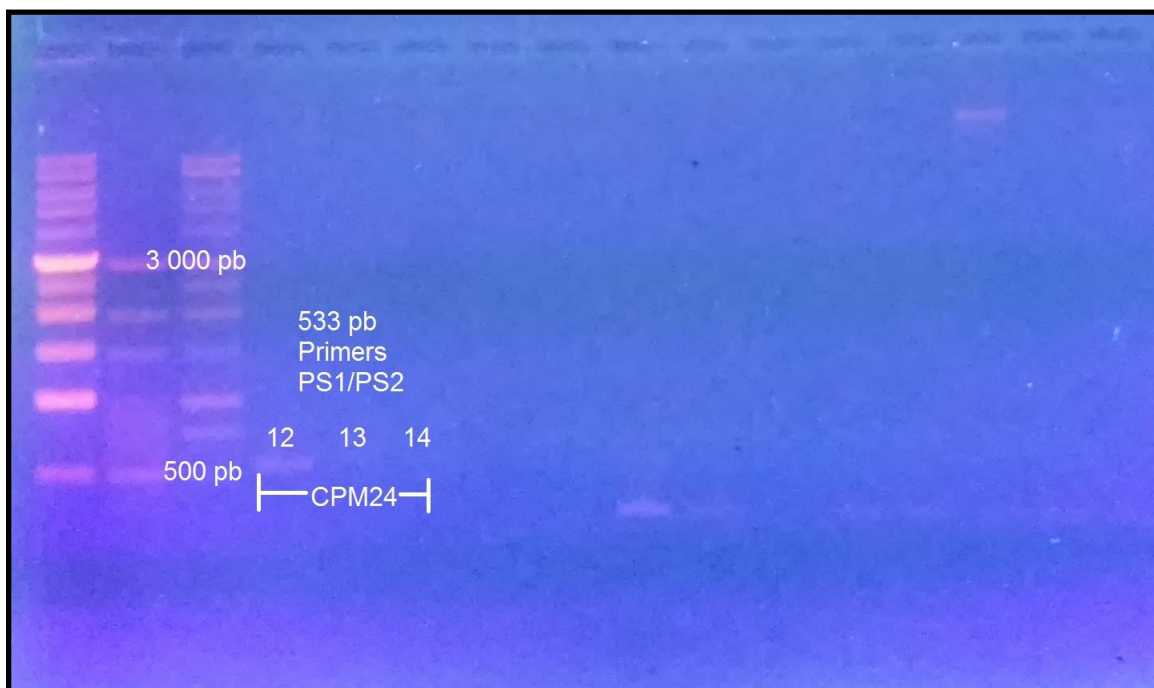


Figura 19. Electroforesis de productos de PCR con los primers PS1 y PS2 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum*. Temporada lluviosa (parte 2).

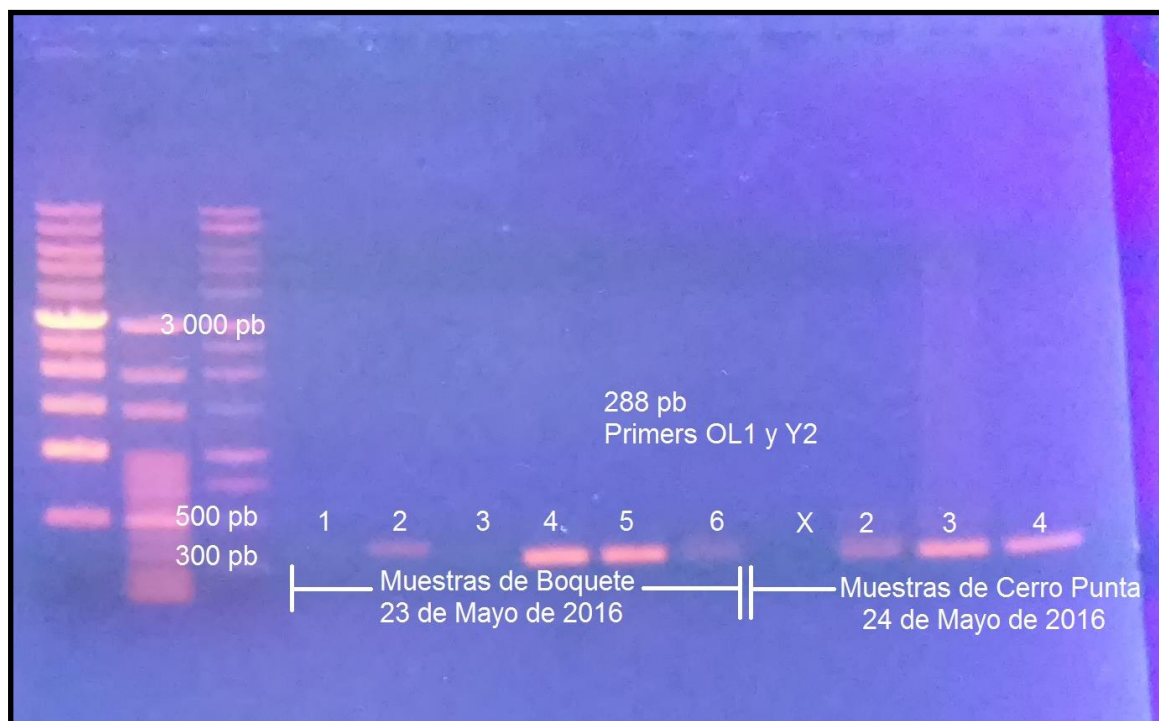


Figura 20. Electroforesis de productos de PCR con los primers OL11 y Y2 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* en temporada lluviosa (parte 1).

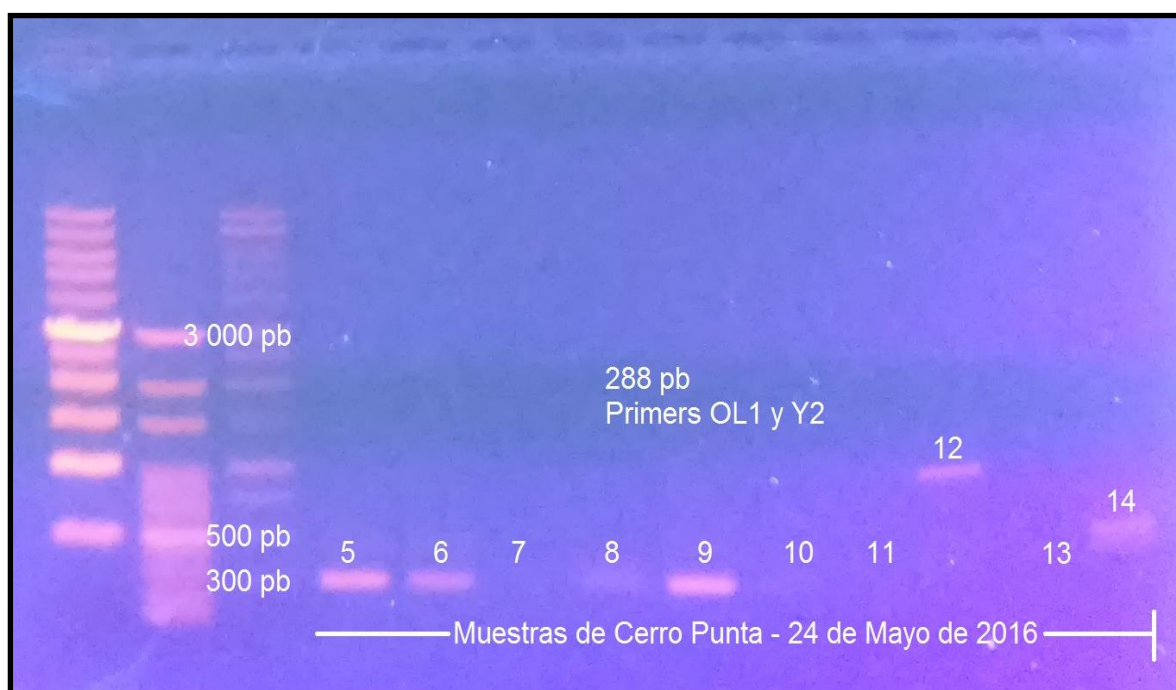


Figura 21. Electroforesis de productos de PCR con los primers OL11 y Y2 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* en temporada lluviosa (parte 2).

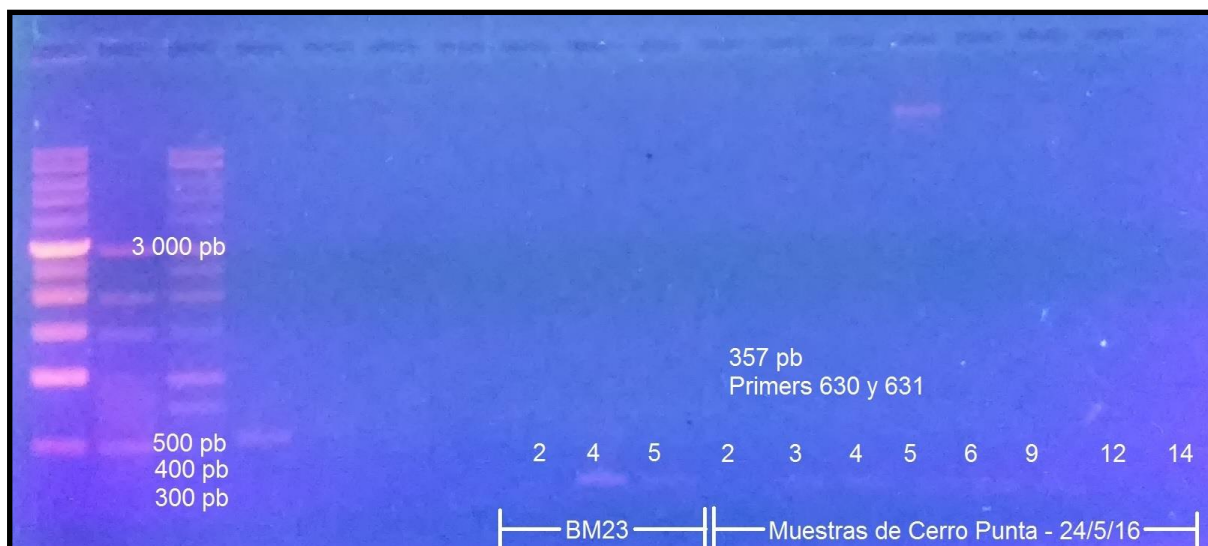


Figura 22. Electroforesis de productos de PCR con los primers 630 y 631 para detectar ADN de *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2 en temporada lluviosa.

4.3 Resultados del Análisis de Suelo

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis de granulometría y pH de los suelos muestreados.

Tabla 5. Resultados del análisis de suelo de muestras de Cerro Punta (CPM24) y Boquete (BM23)

Muestra	pH	Suelo	% Arena	% Arcilla	% Limo
CPM24-1	5.7	Franco Arenoso	49	15.3	35.7
CPM24-S2	5.7	Franco Arenoso	54	10.5	35
CPM24-3	6.4	Franco Arenoso	60	10	30
CPM24-6	5.2	Franco Arenoso	51	15	33
BM23-S2	5.1	Franco Arenoso	54	10	35
BM23-S3	5.6	Franco Arenoso	57	8	34
BM23-S5	5	Franco Arenoso	62	8	30
BM23-S6	4.6	Franco Arenoso	55	13	32

4.5 Relación de los Resultados Obtenidos con los Puntos Geográficos Muestreados

En la figura 23 se muestran los puntos geográficos (todas las estrellas) donde se realizaron las colectas de tubérculos y el punto donde se encontró el único resultado positivo para *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2. En algunos de estos puntos se realizó el muestreo de suelo para su posterior análisis. Se presenta un acercamiento del área de Boquete en la figura 24 y de Cerro Punta en la figura 25.



Figura 23. Puntos geográficos donde se realizaron las colectas de tubérculos en los distritos de Boquete y Tierras Altas. El cuadrado indica el único punto donde la extracción y amplificación (PCR) de ADN dio resultados positivos para *R. solanacearum* R3b2. Los diamantes en indican resultados positivos para *R. solanacearum* pero negativos para R3b2. Fuente: Google Maps.



Figura 24. Puntos geográficos del distrito de Boquete donde se encontraron resultados positivos para *R. solanacearum*. El cuadrado 1 corresponde a la muestra BF17 – hedionda 4 de temporada seca que dio el único resultado positivo para *R. solanacearum* R3b2. El cuadrado 2 corresponde a la muestra BM23-5 de temporada lluviosa que dio resultado positivo para *R. solanacearum* pero negativo para R3b2. La distancia entre el cuadrado uno y el cuadrado dos es de 1.4 km. El análisis de suelo más cercano (diamante) obtuvo un pH de 5.0. Fuente: Google Maps.



Figura 25. Punto geográfico de Cerro Punta (diamante) donde se encontraron resultados positivos para *R. solanacearum*, negativos para R3b2. En este mismo punto se registró un pH de 5.7. Fuente: Google Maps.

5. DISCUSIÓN

Se pudo confirmar la presencia de *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2 en solo una de las 40 muestras. La muestra BF17 – Hedionda 4, que fue consistente en resultados positivos para los cuatro pares de primers, pertenece al Distrito de Boquete (Tabla 2 y Figura 24) y fue colectada durante la temporada seca de febrero de 2016. Las muestras de este mismo punto geográfico para la temporada lluviosa en mayo de 2016 dieron resultados negativos.

La muestra BM23-5 que dio resultados positivos para *R. solanacearum* y negativo para R3b2 (Figura 24) se encuentra a 1.44 km (distancia en línea recta) de la muestra BF17 – Hedionda 4 (positivo para R3b2). Considerando que ambos sitios se encuentran relativamente cerca, futuros monitoreos se deberían concentrar alrededor de estos puntos para registrar su estancamiento o desplazamiento a través del tiempo.

Según los resultados de laboratorio, aunque cinco muestras dieron resultados positivos (Tabla 3) para la especie *R. solanacearum* (Figura 25), el Distrito de Tierras Altas estuvo libre de la Raza 3 Biovar 2 durante la temporada seca y lluviosa de 2016. Es importante destacar que esta raza/biovar es el fenotipo más persistente y potencialmente el más destructivo para el cultivo de papa (Fegan *et al*, 1998).

Estos resultados de laboratorio indican que en estos distritos se pueden encontrar tubérculos provenientes de semilla importada que presentan *R. solanacearum* posiblemente de otras razas y biovares que no se manifiestan como una enfermedad en climas frescos de los trópicos (Champoiseau, 2009).

A pesar de los resultados negativos en el laboratorio, se observaron signos de marchitez y manchas marrones en algunos tubérculos. Estas patologías son asociadas a la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* R3b2, aunque otros fitopatógenos producen síntomas similares en papa como los hongos de los géneros *Verticillium* y *Fusarium* (Champoiseau, 2009).

Todos los productores visitados fueron consultados sobre diversos temas relacionados a la producción de papa y de su experiencia con marchitez bacteriana, mejor conocida como “dormidera”. Algunos productores reportaron utilizar cultivares de papa que ya no son comercializados por los distribuidores y/o vendedores de semilla. Estos cultivares, según los productores, son: “Amigo” y “Ultra”.

El uso extendido de la semilla de papa más allá de la sexta generación podría propiciar la propagación de *Ralstonia solanacearum* R3b2, así como de otros microorganismos perniciosos. Estas prácticas culturales podrían ser difíciles de cambiar debido a la tendencia del alza en el costo de los insumos, entre ellos el costo de la semilla importada. Para aumentar la rentabilidad algunos productores se ven obligados a utilizar semilla de hasta novena generación.

El uso de cultivares resistentes a *Ralstonia solanacearum* R3b2 es posible como método de control. Dicha resistencia en estos cultivares varía dependiendo de la región y de las temperaturas (Champoiseau, 2008). La reutilización prolongada de un mismo grupo de tubérculos como material de propagación podría servir como fuente de inóculo.

Para tener el vínculo exacto de las muestras de campo a las muestras de laboratorio se tuvo que tomar especial cuidado con las anotaciones del código de muestra en la bitácora, en las bolsas plásticas para transportar las muestras al laboratorio y en la rotulación de los microtubos durante la extracción de ADN.

Algunas de las dificultades de este trabajo de investigación se presentaron al momento de la extracción de ADN que requiere afinamiento de las técnicas y una coordinación precisa en el cronograma de colecta de muestras y extracción de ADN para posteriormente iniciar la amplificación de ADN. El principal problema se presentó al momento de realizar el macerado del tejido de papa que requiere romper la estructura del tejido medular y de la corteza de la papa.

Se requirió una verificación constante de los pH de las soluciones buffer para la extracción de ADN. Los mejores resultados de extracción de ADN, visualizados en electroforesis, se observaron con reactivos recién elaborados y con sus valores de pH ajustados semanalmente.

Las limitaciones de este trabajo de investigación se centran en la falta de datos meteorológicos para correlacionar fenómenos atmosféricos con la incidencia *R. solanacearum* R3b2 y en la duración del estudio ya que solo se realizó en las temporadas seca y lluviosa del 2016.

Es importante que haya una coordinación entre instituciones de gobierno, instituciones educativas y agrupaciones comerciales para darle seguimiento a este tipo de investigaciones. De esta manera se podría tener un registro e historial de las plagas presentes, ausentes y de su propagación en el territorio de la República de Panamá.

6. CONCLUSIONES

- Durante la temporada seca y lluviosa de 2016 se pudo evidenciar la existencia de organismos bacterianos en tubérculos de papa extraídos de fincas comerciales en los distritos de Tierras Altas y Boquete con el uso de los primers 16s1 y 16s2.
- Se detectó la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en los distritos de Tierras altas y Boquete mediante el uso de los pares de primers OLI1 – Y2 y PS1 y PS2.
- Mediante el uso de los primers 630 y 631, específicos para *Ralstonia solanacearum* Raza 3 biovar 2 se pudo constatar su presencia en una muestra de tubérculo extraído del distrito de Boquete en febrero de 2016. También se pudo evidenciar la existencia de otras razas de este microorganismo en tubérculos de los distritos de Tierras Altas y Boquete.
- Los resultados positivos hasta las clasificaciones taxonómicas de género y especie, así como los específicos para la Raza 3 biovar 2 se encontraron en tubérculos sintomáticos y asintomáticos.

7. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones relacionadas a *R. solanacearum* R3b2 u otros microorganismos fitopatógenos en la República de Panamá, los investigadores debemos tener a nuestra disposición los registros continuos de diversos parámetros de las estaciones meteorológicas dentro del área de estudio. Sin estos registros continuos es difícil realizar conclusiones que, en la mayor capacidad posible, abarquen la complejidad de nuestros agroecosistemas.

Las futuras colectas de tubérculos y/o plantas de papa sintomáticas y asintomáticas deberán realizarse al inicio, durante y una vez finalizadas las temporadas seca y lluviosa para tener un mejor entendimiento de la incidencia de *R. solanacearum* R3b2 a través de distintas condiciones climáticas.

Las próximas investigaciones en fincas de producción comercial de papa u otros rubros, requerirán de una buena programación del cronograma de visitas preliminares a los productores, colecta de muestras y trabajo de laboratorio.

8. REFERENCIAS

Bustin, SA. 2009. *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. Cambridge, Reino Unido. Cambridge University Press.

Champoiseau, P. 2008. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. Beltsville, EEUU. USDA-NRI. 17 p.

Contraloría General de la República. (2011). VII Censo Agropecuario. En línea. Consultado el 16 de noviembre de 2015. Disponible en: <https://www.contraloria.gob.pa/inec/archivos/P4791CUADRO14.pdf>

Fegan, M; Holoway, G; Hayward, AC; Timmis, J. 1998. Development of a Diagnostic Test Based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) to Identify Strains of *R. solanacearum* Exhibiting the Biovar 2 Genotype. Bacterial Wilt Disease. París, Francia. Springer.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). *The International Year of the Potato*. En línea. Consultado el 14 de noviembre de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/potato-2008/pdf/IYPbook-en.pdf>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). *Statistical Pocket Book*. En línea. Consultado el 14 de noviembre de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/383d384a-28e6-47b3-a1a2-2496a9e017b2/>

- Hu, J. 2002. Standard DNA Extraction Protocol. En línea. Consultado el 7 de diciembre de 2015. Disponible en: <http://www.homepage.ntu.edu.tw/~jmhu/hulab/protocols/CTAB%20DNA%isolationNEW.pdf>
- IICA. 2016. Redacción de Referencias Bibliográficas. 5.ª ed. San José, Costa Rica.
- Kim, DG; Sun-Hee, A; Lyong-Hwa, K; Park, K; Yong-Hi, H; In-Soo, K. 2008. Application of the *rpoS* Gene for Species-Specific Detection of *Vibrio vulnificus* by Real-Time PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(11): 1841-1847.
- Pastrik, KH; Maiss, E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Potato Tubers by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology*. 148(11-12): 619-626.
- Pradhanang, PM; Elphinstone, JG; FOX RTV. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. 2000. *Plant Pathology*. 49(4): 403-413.
- Ravindran, A; Levy, J; Pierson, E. 2011. Development of Primers for Improved PCR Detection of the Potato Zebra Chip Pathogen, '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Plant Disease*. 95(12): 1542-1546.

- Sánchez, A; Mejía, L; Fegan, M; Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology*. 57(2): 320-331.
- Seal, SE; Jackson, LA; Daniels, MJ. 1992. Use of tRNA Consensus Primers to indicate Subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by Polymerase Chain Reaction Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(11): 3759-3761.
- Seal, SE; Jackson, LA; Young, JPW; Daniel, MJ. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology*. 139(7): 1587-1594.
- Seal, SE; Taghavi, M; Fegan, N; Hayward, AC; Fegan, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathology*. 48(1): 115-120.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2014). *Protocolo de Diagnóstico de Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al 1995 (Identificación morfológica, ELISA y PCR)*.

Trejo, DL; Rodríguez-Negrete, EA; Rivera-Bustamante, RF. 2015. Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria*. 25(3): 24-39.

Vreugdenhi, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Mackerron, D. K.L., Taylor, M. A. & Ross, H.A. (2007). *POTATO BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY ADVANCES AND PERSPECTIVES*. Wagening: Elsevier.

Wale, S., Platt, H.W., Cattlin, N. (2008). *Diseases, Pests and Disorders of Potatoes. A Colour Handbook*. Barcelona: Manson Publishing Ltd.