

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**DETECCIÓN DE FITOPLASMA EN PALTO (*Persea americana*
Mill.) MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Por

WERNER ALEX BÁUERLE BASCUÑAN

MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO.

CHILLAN - CHILE

2002

ÍNDICE

DEL MANUSCRITO

Resumen

Abstract

Introducción

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Conclusiones

Literatura citada

Figuras

Anexo

**DETECCIÓN DE FITOPLASMA EN PALTO (*Persea americana* Mili.)
MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR).**

DETECTION OF PHYTOPLASMA IN AVOCADO (*Persea americana*
Mill.) BY MEANS OF THE TECHNIQUE OF THE POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR).

Palabras índice adicionales: amplificar, fitoplasma, palto,
PCR directo, PCR-nested.

RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo detectar por medio de la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) la presencia de fitoplasma en palto con síntomas de fitoplasmosis de la zona de Quillón, 8ª Región. A las muestras recolectadas en octubre de 1999 y noviembre del 2000 se les extrajo el ADN total, el que fue enfrentado a diferentes pares de cebadores universales que reconocen la porción del gen 16S rARN de los fitoplasmas. La amplificación se realizó posteriormente por PCR directo o PCR-nested, y el ADN amplificado se cargó en geles de agarosa para visualizar las bandas. Solamente con la técnica PCR-nested fue posible obtener bandas desde las muestras de palto con síntomas, resultados que confirman la

asociación de un fitoplasma con la sintomatología observada en palto.

ABSTRACT

The main objective of this research was to detect by PCR (polymerase chain reaction) the presence of a phytoplasma in avocado tree from the area of Quillón, 8° Región, Chile, showing symptoms of phytoplasmosis. Total DNA was extracted from samples taken in october 1999 and november 2000, and amplified using different pairs of universal primers that recognize the 16S rRNA gene of phytoplasmas. Amplification was performed using direct PCR or nested-PCR, and the amplified DNA was loaded on agarose gels to visualiza the bands. DNA bands of the right size were obtained when amplification was performed using nested-PCR only, thens confirming the presence, of a phytoplasma in symptomatic avocado trees.

INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son procariotas pertenecientes a la Clase Mollicutes, desprovistos de pared celular, característica que le da a esta Clase el tener gran plasticidad, pleomorfismo, resistencia a las sustancias antibacterianas que degradan o inhiben la síntesis de peptidoglicano, y ser sensibles a las tetraciclinas (Avinent y Llácer, 1996). Estos son organismos que inducen o están asociados a

patologías vegetales, muchas económicamente importantes en árboles frutales y ornamentales. En la planta están asociados al floema, a menudo alineados paralelamente a la longitud de los tubos cribosos (Ahrens and Seemüller, 1992; Avinent and Llácer, 1996; Avinent *et al.*, 1997; Creen *et al.*, 1999; Gundersen and Lee, 1996; Lee *et al.*, 1994; Namba *et al.*, 1993). Son transmisibles por injerto pero no pueden transmitirse por la inoculación de savia, ni cultivarse *in vitro* (Grenn *et al.*, 1999; Namba *et al.*, 1993). En la naturaleza son diseminados por insectos vectores que se alimentan del floema, principalmente cicadélidos, y también pueden ser transmitidos por plantas parásitas como *Cuscuta sp.* (Avinent y Llácer, 1996; Laviña y Batlle, 1997).

Los síntomas generales que presentan las plantas infectadas con fitoplasmas son clorosis general, enrojecimiento precoz de las hojas, esterilidad de las flores, virescencia de flores (filodia), proliferación de yemas adventicias (escobas de brujas), enanismo generalizado, enrollamiento de las hojas, necrosis del floema y decaimiento general (Avinent y Llácer, 1996; Laviña y Batlle, 1997; Laviña *et al.*, 2000).

La detección de fitoplasmas es difícil debido a la distribución irregular y a la baja concentración presente en el tejido vegetal (Avinent y Llácer, 1994; Avinent y

Llácer, 1996; Groen *et al.*, 1999; Gundersen and Lee, 1996; Lee *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Namba *et al.*, 1993). Los fitoplasmas han sido diagnosticados por microscopía óptica, microscopía electrónica, inmunoensayo por dot blot, sondas moleculares, ISEM, hibridación de ADN, serología, ELISA y tinción DAPI (Ahrens and Seemüller, 1992; Avinent y Llácer, 1996; Green *et al.*, 1999; Gundersen and Lee, 1996; Laviña y Batlle, 1997; Lee *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Waterwork and Mock, 1999); sin embargo estos métodos tienen una sensibilidad limitada y no son prácticos para trabajar un gran número de muestras.

La principal técnica usada para detectar fitoplasmas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Avinent y Llácer, 1996; Green *et al.*, 1999; Gundersen and Lee, 1996; Waterwork and Mock, 1999). PCR amplifica secuencias del gen 16S rARN de los fitoplasmas utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos derivados de ADN fitoplasmático (Ahrens and Seemüller, 1992; Avinent y Llácer, 1994; Avinent y Llácer, 1996; Gundersen and Lee, 1996; Laviña y Batlle, 1997; Lee *et al.*, 1994; Namba *et al.*, 1993). Esta técnica posee la ventaja de ser versátil, de relativa simplicidad, especificidad, y de alta sensibilidad; además, el patógeno no necesita ser purificado antes del análisis (Henson and French, 1993;

Lorenz *et al.*, 1995). La utilización del método PCR es conveniente para poder realizar estudios etiológicos de enfermedades relacionadas; con Citoplasmas, como también para asegurar la sanidad de procesos fitosanitarios en la propagación de plantas libres de patógenos (Gundersen and Lee, 1996).

En Chile, el palto es un Frutal que posee una gran importancia económica. El consumo de este se manifiesta una tendencia al aumento, principalmente por países importadores como EE.UU y la C.E.E. (MERCADO..., 2001). Chile se encuentra entre los países productores y exportadores más importantes en el ámbito mundial junto a México, EE.UU., Israel, España, Sudáfrica, y República Dominicana (MERCADO..., 2001; PALTAS..., 2002).

La superficie destinada al cultivo del palto en Chile alcanza las 21 000 hectáreas, con una producción cercana a las 120 000 toneladas para la temporada 2000/2001, de la cual el 50% aproximadamente se destina a exportación en fresco, siendo su principal comprador EE.UU, seguido de Europa y Japón (PALTAS..., 2002).

La principal zona productora de paltas en Chile es la V región con un 58% de la superficie plantada, seguida de la R.M. con un 22% y la VI región con un 10%. La IV región destaca por su desarrollo alcanzando con el 8% de la

superficie plantada.

La variedad más importante producida en Chile corresponde a Hass, por sus buenas características organolépticas, mejores condiciones de productividad y un excelente comportamiento para la exportación, derivado de su mayor resistencia de postcosecha (MERCADO..., 2001).

En 1999 se detectó en España (Laviña *et al.*, 2000) paltos que presentaban sintomatología característica de enfermedades producidas por Citoplasmas. Para determinar la presencia de Citoplasmas, analizaron el tejido vegetal utilizando la técnica de PCR, determinando positivamente este tipo de patógeno en las plantas sintomáticas.

Síntomas similares a los encontrados en España (enanismo, clorosis general, entrenudos cortos, proliferación de yemas, deformación de hojas nuevas) fueron observados en un huerto de paltos Hass en Quillón, VIII Región, en Octubre de 1999.

Por este motivo, se planificó la presente investigación, cuyo objetivo es determinar si existe una asociación de fitoplasmas con la sintomatología observada en palto, utilizando para ello la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y cebadores universales que reconocen y amplifican la secuencia del gen 16S rARN, la región espadadora intergénica 16S-23S rARN o parte del gen 23S

rARN de los fitoplasmas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Virología Vegetal del Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción.

Colecta del material vegetal

Las muestras de palto fueron recolectadas en Octubre de 1999 y Noviembre del 2000, desde una parcela en Quillón, VIII Región, y correspondieron a brotes de palto que presentaban los síntomas característicos de infección por fitoplasmas. Cada muestra se conservó a -20°C para su posterior uso. Como control positivo se usó remolacha con síntomas de marchitez amarilla, y como control negativo se utilizó cotiledones de plántulas sanas de remolacha (Vargas, 2001).

Extracción de ADN

La extracción del ADN total de las muestras se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Zhang *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Se utilizó principalmente las nervaduras centrales de las hojas de los brotes, las que fueron cortadas en pequeños trozos. Se pesó 1 g y fue homogeneizado en un mortero con 8 mL de tampón de extracción (100 mM Tris pH 8; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 3% w/v CTAB) con mercaptoetanol al 0,2% (v/v). Luego, el

macerado fue colocado en tubos Eppendorf y se incubó a baño María durante 20 minutos a 65°C, a continuación se traspasó a tubos plásticos de centrifugación agregando igual volumen de cloroformo y se centrifugó en un rotor SS-64 a 10 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 20°C. El sobrenadante fue transferido a otro tubo, agregando igual volumen de isopropanol, y para precipitar los ácidos nucleicos se incubó a -20°C durante 30 minutos. Luego se realizó una centrifugación a 10 000 rpm durante 15 minutos a 5°C, obteniendo un pellet en la base del tubo. Este se lavó con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 150 µL de tampón Tris 5 mM (pH 8), y se almacenó en un tubo Eppendorf a -20°C para su posterior utilización.

Amplificación de ADN

Para realizar la amplificación del ADN de fitoplasma se utilizó dos alternativas de PCR: PCR directo, técnica que realiza una amplificación del ADN y PCR-nested, técnica que realiza dos amplificaciones del ADN.

PCR Directo

La amplificación del ADN del patógeno se realizó con diferentes pares de cebadores universales para detectar fitoplasmas: P1/Tint, que amplifica un fragmento ribosomal de 1600 pares de bases (pb) de longitud que comprende el

gen 16S rARN y una porción de la región espadadora intergénica 16S-23S rARN (Smart et al., 1996); P1/P7, amplifica un fragmento ribosomal de aproximadamente 1800 pb de longitud, que comprende el gen 16S rARN, la región espadadora intergénica 16S-23S rARN y una porción del extremo 5' del gen 23S rARN de los fitoplasmas (Creen et al., 1999; Lorenz et al., 1995; Smart et al., 1996); R16F2n/R2, que amplifica un fragmento ribosomal de 1200 pb de longitud, que comprende el gen 16S rARN (Gundersen and Lee, 1996; Lee et al., 1994); P1/Ayint, que amplifica un fragmento ribosomal de 1500 pb de longitud, que comprende el gen 16S rARN y la región espadadora intergénica 16S-23S rARN (Smart et al., 1996).

La amplificación del ADN para PCR directo se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Romero (1997). La mezcla se realizó en un volumen total de 30 μ L (Anexo la) , que contenía 2,0 μ L de ADN extraído, 2,5 μ L de dNTPs 2 mM, 0,5 μ L de cada cebador a 40 μ M, 1,0 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1,0 uL de la enzima Taq Polimerasa a 1U/ μ L, 3, 0 uL de tampón 10X y se completó con 19,5 μ L de agua destilada estéril. La amplificación se realizó en un termociclador (PTC-150, M.J. Research, Watertown, EEUU.) utilizando dos programas: Uno determinado para el par de cebadores P1/Tint que utiliza los siguientes parámetros: desnaturalización del ADN a 95°C

por 2 minutos, y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación de los cebadores a 56°C por 1 minuto, y extensión a 72°C por 2 minutos; extensión final a 72°C por 5 minutos. El otro programa establecido para el par de cebadores R16F2n/R2 utiliza los siguientes parámetros: desnaturalización del ADN a 94°C por 2 minutos, y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación de los cebadores a 55°C por 2 minutos, y extensión a 72°C por 2 minutos; extensión final a 72°C por 5 minutos.

Las muestras amplificadas en ambos programas se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

PCR-nested

Realizada la primera amplificación con los distintos pares de cebadores se llevó a cabo una segunda amplificación del ADN con los cebadores internos fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995) que amplifican un fragmento ribosomal del gen 16S rARN de los fitoplasmas, de aproximadamente 880 pares de bases de longitud (Laviña y Batlle, 1997) .

La amplificación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Romero (1997) en un volumen total de 30 µL de mezcla (Anexo 1b) que contenía 1 µL de ADN amplificado anteriormente mediante PCR directo en dilución 1/40, 2,5 µL de dNTPs 2 mM, 1,5 µL de cada cebador a 10 µM, 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,0 µL de la enzima Taq polimerasa a 1 U/µL, 3,0

μL de tampón de la enzima a 10X, completado con 18.5 μL de agua destilada estéril. La amplificación se realizó en el termociclador antes mencionado. Los parámetros utilizados fueron: desnaturalización del ADN a 94°C por 2 minutos, y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación de los cebadores a 55°C por 75 s y extensión a 72°C por 90 s; extensión final a 72°C por 5 minutos.

Las muestras amplificadas por PCR-nested se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Análisis electroforético de los productos obtenidos de PCR directo y PCR-nested

De cada producto de ADN amplificado se tomó 7 μL y se mezcló con 3 μL de colorante Azul de Bromofenol (13,3% (v/v) glicerol, 3,3% (p/v) azul de bromofenol). De la mezcla se tomó 8 μL para cargarlos en un gel horizontal de Agarosa al 1% (p/v), colocado en tampón TBE 1X (89 mM Tris-HCL, 89 mM Acido Bórico, 2 mM EDTA pH 8) (Sambrook *et al.*, 1989), y se realizó la electroforesis a 2,5 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante 2 horas, aproximadamente. Posteriormente, el gel fue teñido en una solución de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bromuro de Etidio, para luego visualizar las bandas de ADN en un transiluminador de luz ultra violeta y fotografiarlas para su documentación. Se ocupó un marcador molecular de 1Kpb de ADN (Gilco BRL) como referencia en los geles para determinar el tamaño de

los productos obtenidos por PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN PCR directo

La Figura 1 corresponde a la fotografía tomada al gel sometido a tinsión, donde se observan los productos de la amplificación al ocupar el programa del par de cebadores R16F2n/R2 en el PCR directo.

Al utilizar esta técnica con los pares de cebadores no se logró obloner bandas do AON do I patógeno desde las muestras de palto colectadas en Octubre de 1999 (Figura 1) y Noviembre del 2000. Si se obtuvieron bandas de ADN del tamaño esperado desde el control positivo; no se obtuvo bandas desde el control negativo, corroborándose así la veracidad de la técnica usada.

Resultados similares se obtuvieron al ocupar el programa de amplificación del par de cebadores Pl/Tint.

De acuerdo a Green *et al.* (1999); Gundersen and Lee, (1996) y Henson and Frenen, (1993), la técnica por PCR es el método mas sensible para la detección de fitoplasmas en tejidos vegetales. No obstante, los problemas que se pueden presentar en la detección del ADN de fitoplasma son: insuficiente ADN y la presencia de inhibidores como enzimas polifenólicas, compuestos de polisacáridos y sustancias húmicas. En este estudio, es muy posible que la baja

concentración de fitoplasmas en el tejido analizado haya sido la causa por la que no se obtuvieron bandas al amplificar por PCR directo.

PCR-nested

Las Figuras 2 y 3 corresponden a fotografías tomadas a los geles sometidos a tinsión, donde se observan los productos de la amplificación por PCR-nested, ocupando el programa de amplificación del par de cebadores R16F2n/R2 en el PCR directo.

En las muestras colectadas en octubre de 1999, utilizando el par de cebadores R16F2n/R2 seguido por fU5/rU3 se logró amplificar un. fragmento de ADN del patógeno, obteniendo bandas del tamaño esperado de aproximadamente 880 pb (Figura 2, carril 4). Este resultado también se obtuvo al utilizar los cebadores Pl/Tint, P1/P7 y Pl/Ayint seguido por fU5/rU3, logrando amplificar un fragmento de ADN del patógeno obteniendo bandas del mismo tamaño (Figura 2, carriles 1, 2 y 3).

Para las muestras colectadas en Noviembre del 2000 y utilizando los cebadores Pl/Tint, R16F2n/R2 y Pl/Ayint seguido por fU5/rU3 también se logró amplificar un fragmento de ADN del patógeno obteniendo bandas de 880 pb aproximadamente (Figura 3, carril 1, 2 y 3).

En todas las amplificaciones realizados por PCR-nested

se obtuvo bandas de ADN del control positivo del tamaño esperado; no se obtuvo bandas desde el control negativo, con lo cual se corrobora la veracidad de la técnica utilizada.

Resultados similares se obtuvieron al ocupar el programa de amplificación del par de cebadores Pl/Tint, tanto para las muestras colectadas en octubre de 1999 y noviembre de 2000.

En esta investigación, la realización del PCR-nested pudo detectar ADN fitoplásmico, lo que nos indica que este método es más sensible que el PCR directo en la detección del patógeno. Al respecto, Gundersen and Lee, (1996), señalan que la realización del PCR-nested a menudo bloquea el efecto de los inhibidores y aumenta el ADN específico, incrementando así la sensibilidad de la detección de fitoplasmas con títulos bajos. Henson and Frenen, (1993) y Namba et al., (1993), afirman que el PCR-nested ofrece la ventaja de ser un método más sensible que el PCR directo para detectar ADN, ya que puede amplificar fragmentos de ADN detectables con menos ciclos de amplificación, y mejora la especificidad en el diagnóstico. Por lo tanto, con lo señalado anteriormente, es recomendable realizar dos amplificaciones sucesivas del ADN del patógeno extraído de tejido de palto, para poder obtener bandas reproducibles.

Otro factor, que según Henson and French, (1993), puede afectar la amplificación del ADN, es la composición óptima de la mezcla y los ciclos de temperatura. Este último puede afectar los rendimientos del producto, el tamaño de este, y la reproducibilidad de la técnica.

En este estudio, esta condición podría ser descartada debido a la utilización de dos programas para amplificar ADN, con los cuales fue posible obtener bandas de ADN detectables utilizando PCR-nested en las muestras de palto recolectadas en octubre de 1999 y noviembre del 2000.

Lee *et al.* (1994), mencionan que en plantas perennes infectadas con fitoplasmas, la concentración de ellos en la planta puede variar de una estación a otra o anualmente. Por otra parte, Green *et al.* (1999), señalan que el mejor momento para reunir las muestras para la detección de fitoplasma es en verano, ya que en ese momento se encuentra el patógeno en concentraciones más altas en el tejido vegetal. Esto puede ser efectivo, ya que al realizar dos amplificaciones sucesivas en material de palto colectado en invierno, no fue posible obtener bandas.

Según Ahrens y Seemüller (1992), para obtener suficiente ADN amplificado de muestras con baja concentración del patógeno, es necesario realizar 40 ciclos de amplificación en el termociclador, y así obtener bandas visibles. Esta

podría ser una explicación de la menor intensidad de las bandas obtenidas de palto en comparación con las bandas del control positivo.

CONCLUSIÓN

1. El análisis por PCR-nested de las muestras de palto con síntomas de enanismo, amarillez y deformación de hojas nuevas permite detectar ADN fitoplasmático en ellos; por lo tanto, la sintomatología observada en el palto es ocasionada por un fitoplasma.

LITERATURA CITADA.

1. Ahrens, U. and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*. 82 (8) : 828-832.
2. Avinent, L. y G. Llácer. 1994. Detección de fitoplasmas en frutales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Inv. Agrar.* (2):201-205.
3. Avinent, L. y G. Llácer. 1996. Fitoplasmas y Espiroplasmas Fitopatógenos. pp 443-483. En: G. Llácer, M. M. López, A. Trapero y A. Bello (Ed) . *Patología Vegetal. Soc. Española de Fitopatología. España.*
4. Avinent, L., G. Llácer, J. Almacellar and R. Tora. 1997. Pear decline in Spain. *Plant Pathology*. 46:694-698.
5. Green, M. J., D. A. Thompson and D. J. Mackenzie. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasma by polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 83(5):482-485.

6. Gundersen, D. E. and I.-M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. Medit.* 35:144-151.
7. Henson, J. M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* (31):81-109.
8. Laviña, A. and A. Batlle. 1997. Identificación de Fitoplasmas de la Viña en diferentes áreas Vinícolas de España. *Técnicas de Identificación. Viticultura Profesional.* (52):32-36.
9. Laviña, A., A. Battle, C. J. López y J. García F. 2000. Identificación de una sintomatología producida por un fitoplasma en aguacate. En: X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Octubre 3-6, 2000, Valencia. Soc. Española de Fitopatología. España.
10. Lee, I-M., D. E. Gundersen, R. W. Hammond and R. E. Davis. 1994. Use of mycoplasma-like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for PCR-nested assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology.* 84 (6) :559-566.
11. Lorenz, K.-H., B. Schneider, U. Ahrens and E. Seemüller. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology.* 85(7):771-776.
12. MERCADO DE LAS PALTAS. 2001. *Mercados Agropecuarios.* (103):3-8.
13. Namba, S., S. Kato, S. Iwanami, H. Oyaiza, H. Shiozawa and T. Tsuchizaki. 1993. Detection and differentiation of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology.* 83 (7) :786-791.
14. PALTAS: PRECIOS MAS AJUSTADOS EN EL MERCADO INTERNACIONAL. 2002. *Agroeconómico.* (66):39-42.

15. Romero, J. C. 1997. VII Curso internacional teórico practico de detección e identificación de virus, viroides y fitoplasmas. CIT/INIA. Madrid, España.
16. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. (2a. ed) . Cold Spring Harbor Laboratory. Press. New York, USA.
17. Smart, C. D., B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrison, U. Ahrens, K. H. Lorenz, E. Seemüller and B. C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-Specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer región. Appl. Environ. Microbiol. 62:2988-2993.
18. Vargas, Y. C. 2001. Detección por PCR del agente causal de la "marchitez amarilla de la remolacha", en cicadélidos (Homoptera: Cicadellidae) asociados al cultivo de la remolacha. Memoria de título, Ing. Agron. Univ. Concepción, Fac. Agron. Chillan, Chile.
19. Waterwork, H. E. and R. Mock. 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm. Plant Dis. 83(11):1047-1050.
20. Zhang, Y., J. K. Uyemoto and B. C. Kirpatrick. 1998. A small scale procedure for extracting nucleic acids from 'woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. J. Virol. Method. 71:45-50.

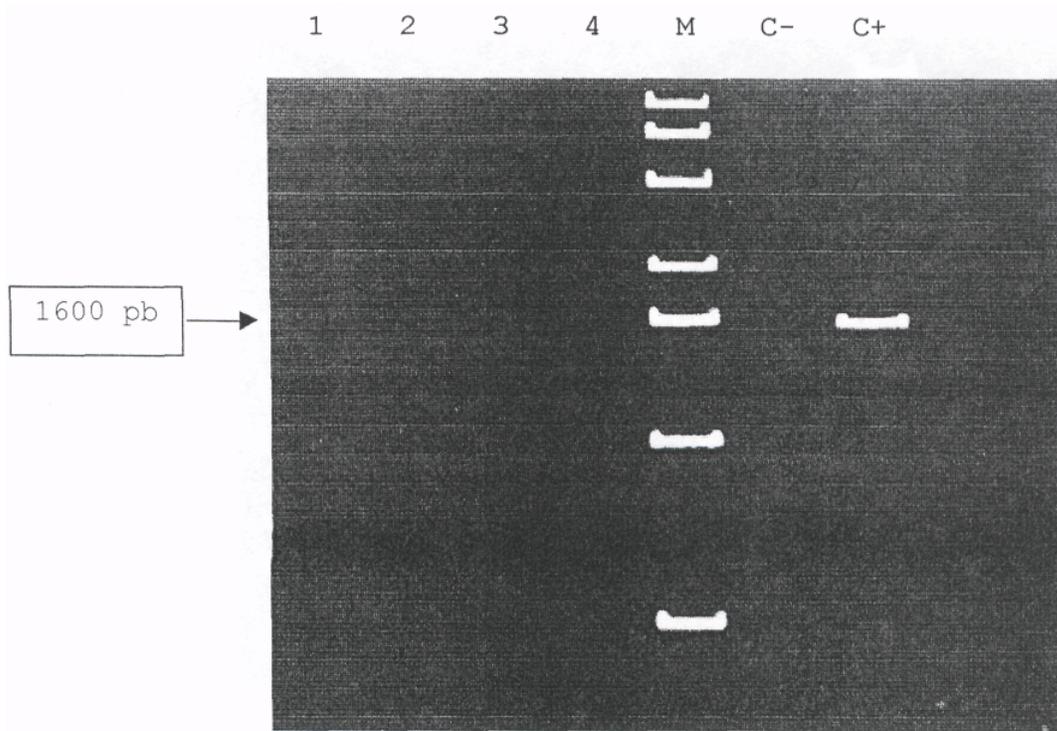


FIGURA 1. Amplificación de ADN de fitoplasma, extraído desde muestras de palto colectados en Octubre de 1999, utilizando PCR directo. Carril 1: palto amplificado con cebadores P1/Tint; carril 2: palto amplificado con cebadores P1/P7; carril 3: palto amplificado con cebadores P1/Ayint; carril 4: palto amplificado con cebadores R16F2n/R2; carril M: marcador molecular 1 Kpb; carril C-: control negativo y carril C+: control positivo.

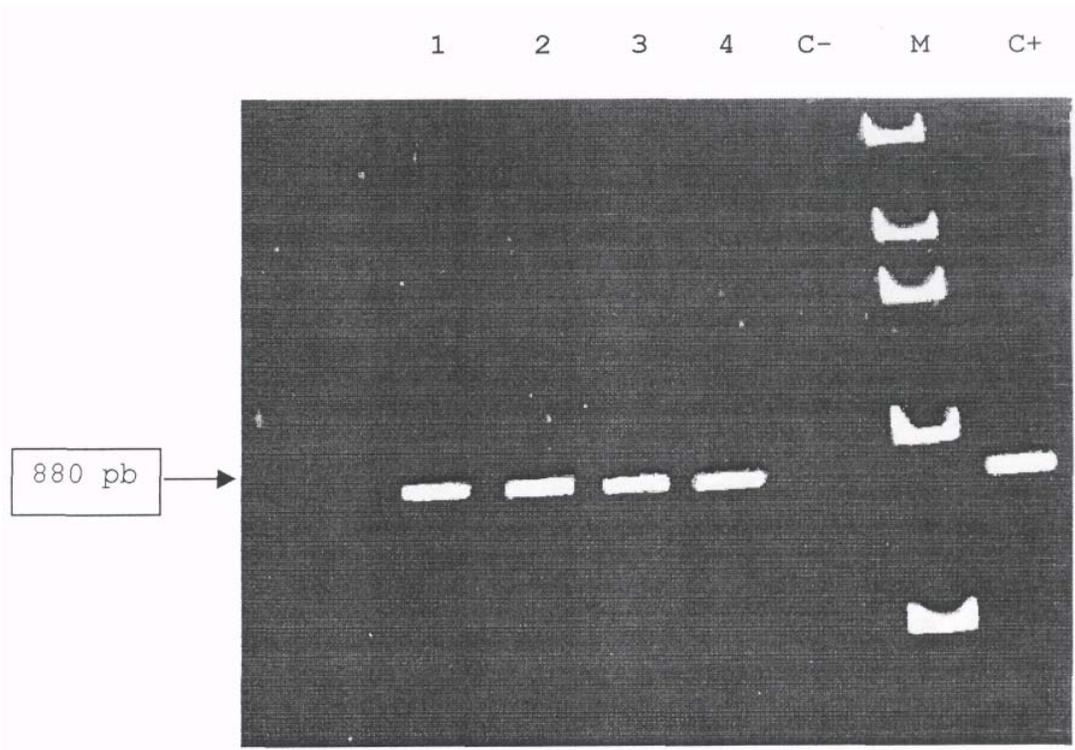


FIGURA 2: Amplificación de ADN de fitoplasma, extraído desde muestras de palto colectados en Octubre de 1999, utilizando PCR-nested con los cebadores fU5/rU3 en la segunda amplificación. Carril 1: palto amplificado con cebadores P1/Tint; carril 2: palto amplificado con cebadores P1/P7; carril 3: palto amplificado con cebadores P1/Ayint; carril 4: palto amplificado con cebadores R16F2n/R2; carril C-: control negativo; carril M: marcador molecular 1 Kpb y carril C+: control positivo.

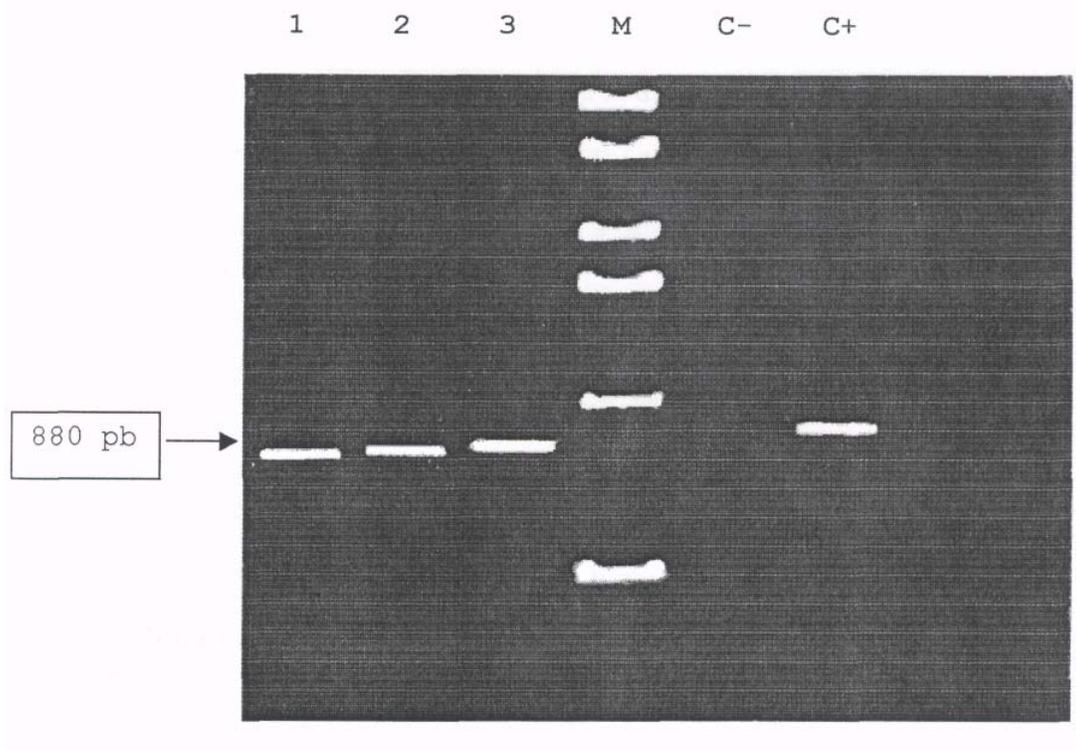


FIGURA 3. Amplificación de ADN de *f* itoplasma, extraído desde muestras de palto colectados en Noviembre de 2000, utilizando PCR-nested con los cebadores fU5/rU3 en la segunda amplificación. Carril 1: palto amplificado con cebadores Pl/Tint; carril 2: palto amplificado con cebadores R16F2n/R2; carril 3: palto amplificado con cebadores Pl/Ayint; carril M: marcador molecular 1 Kpb; carril C-: control negativo y carril C+: control positivo.

Anexo 1. Componentes de la mezcla de reacción sometida a amplificación por:

a) PCR directo

Componente	Volumen	Concentración
ADN purificado	2,0 μL	-
dNTPs	2,5 μL	2 mM
Cebador 1	0,5 μL	40 μM
Cebador 2	0,5 μL	40 μM
MgCl ₂	1,0 μL	50 mM
Taq ADN polimerasa	1,0 μL	1U/ μL
Tampón de la enzima	3,0 μL	10X
Agua destilada estéril	19,5 μL	-
Volumen total	30,0 μL	

b) PCR-nested

Componente	Volumen	Concentración
ADN amplificado en PCR directo dilución (1/40)	1,0 μL	-
dNTPs	2,5 μL	2 mM
Cebador fU5	1,5 μL	10 μM
Cebador rU3	1,5 μL	10 μM
MgCl ₂	1,0 μL	50 mM
Taq ADN polimerasa	1,0 μL	1U/ μL
Tampón de la enzima	3,0 μL	10X
Agua destilada estéril	18,5 μL	-
Volumen total	30,0 μL	

Fuente: Romero (1997)