

**METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA ENFERMEDAD
“CUERO DE SAPO” EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

WILMER D. VALVERDE GAMBOA

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Agronomía
como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

SEDE REGIONAL SAN CARLOS

2015

**METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA ENFERMEDAD
“CUERO DE SAPO” EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

WILMER D. VALVERDE GAMBOA

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Agronomía
como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

2015

**METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA ENFERMEDAD
“CUERO DE SAPO” EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

WILMER D. VALVERDE GAMBOA

Aprobado por los miembros del tribunal evaluador:

Ing. Agr. Sergio Torres Portuguez, M.Sc



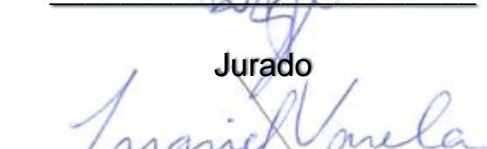
Asesor interno

Ing. Biotec. Wayner Montero Carmona, M.Sc



Jurado

Biol. Ingrid Varela Benavides. M.Sc



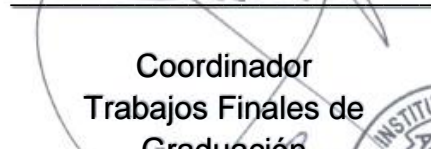
Jurado

Ing. Agr. Carlos Ramírez Vargas, Ph.D

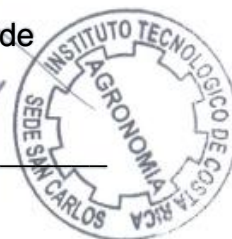


**Coordinador
Trabajos Finales de
Graduación**

Ing. Agr. Alberto Camero Rey, M.Sc



**Director
Escuela de Agronomía**



DEDICATORIA

*Con mucho cariño dedicado para mi familia, especialmente a mis padres
Dimas y Aida que son mi fuente de inspiración.*

*A mis amigos, especialmente en honor a Alonso Quesada que nos protege
desde el cielo, al ejemplo de valentía, serenidad y pasión por la vida que nos
demostró durante el tiempo que compartimos.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen de Los Ángeles por permitirme concluir con esta etapa de mi vida.

A mis padres Dimas Valverde y Aida Gamboa y a mis hermanos Yarith, Donny, Heidi y Jeffry y demás miembros de la familia, por su apoyo incondicional de una u otra forma que permitieron que esta meta fuera posible.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales de la Escuela de Agronomía, señores M.Sc Sergio Torres, M.Sc Wayner Montero, M.Sc Ingrid Varela, M.Sc Fabián Echeverría, Itsel Murillo y Jaime Soto. Por el apoyo brindado y el conocimiento compartido durante el desarrollo del trabajo.

A Tania Corrales por ser parte importante en mi vida, por su cariño y ayuda dada durante estos años.

Al profesor y amigo M.Sc Parménides Furcal Beriguete por su aporte brindado durante mi formación como profesional y como persona.

A mis compañeros, amigos y hermanos de la carrera que me han acompañado durante estos años de estudio y con los cuáles he pasado momentos buenos y no tan buenos durante mi etapa en el TEC.

A todos y todas...Muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. REVISIÓN DE LITERATURA	16
3.1. Aspectos Biológicos del Cultivo	16
3.1.1. Taxonomía y morfología:	16
3.1.1.1. Hojas	16
3.1.1.2. Flor	16
3.1.1.3. Tallo.....	17
3.1.1.4. Raíz	17
3.1.2. Importancia socioeconómica de la yuca	18
3.2. Enfermedades y plagas del cultivo de yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	20
3.3. “Cuero de sapo”	21
3.3.1. Sintomatología de “Cuero de sapo”	21
3.3.2. Agente causal.....	24
3.4. Características de los fitoplasmas:	24
3.4.1. Clasificación taxonómica	24
3.4.2. Morfología.....	26
3.4.3. Vectores	26
3.4.4. Síntomas externos.....	27
3.4.5. Cambios químicos internos	27
3.4.6. Movimiento de los fitoplasmas en la planta	28

3.5. Diagnóstico de la enfermedad “Cuero de sapo” mediante microscopía fluorescente	29
3.5.1. Tinción Dienes	29
3.5.2. Tinción DAPI (4´6-diamidino 2-fenil-indol)	29
3.6. Diagnóstico de la enfermedad “Cuero de sapo” mediante técnicas moleculares	30
3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
3.7.1. Componentes del PCR	32
3.7.1.1. Muestra de ADN	32
3.7.1.2. ADN Polimerasa	32
3.7.1.3. Cloruro de magnesio	32
3.7.1.4. Cebadores o primers	32
3.7.1.5. Nucleótidos.....	32
3.7.1.6. Disolución buffer	33
3.7.2. Funcionamiento del PCR	33
3.7.2.1. Desnaturalización	33
3.7.2.2. Hibridación.....	33
3.7.2.3. Polimerización	33
3.7.3. PCR en Tiempo Real	34
3.7.3.1. Agentes intercalantes	35
3.7.3.2. Sondas de hibridación específicas	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Ubicación del estudio	37
4.2. I Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma mediante microscopía fluorescente	37

4.3. II Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en diferentes partes de la estaca de yuca: yema, floema 1, raíz, brote y floema 2.	39
4.3.1. Tratamientos.....	39
4.3.2. Extracción de ADN	42
4.3.3. Análisis PCR en tiempo real.....	43
4.4. III Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en plantas sintomáticas, asintomáticas y platas <i>In vitro</i>	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
5.1. I Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma mediante microscopía fluorescente	45
5.2. II Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en diferentes partes de la estaca: yema, floema, raíz, brote y estaca completa	47
5.3. III Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en plantas sintomáticas, asintomáticas y platas <i>In vitro</i>	51
6. CONCLUSIONES.....	52
7. RECOMENDACIONES.....	53
8. BIBLIOGRAFÍA.....	54
9. ANEXOS.....	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Producción de yuca (<i>Manihot esculenta</i>) a nivel mundial para el año 2012.	18
2	Principales enfermedades que afectan el cultivo de la yuca (<i>Manihot esculenta</i>).	20
3	Escala de evaluación de la severidad de la enfermedad “Cuero de sapo” en yuca.	23
4	Concentración de disoluciones alcohólicas para la deshidratación de tejido vegetal.	38
5	Perfil térmico para la reacción PCR en tiempo real.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Evolución de la exportación de yuca de Costa Rica (2008-2012).	19
2	Ejemplos representativos de la escala de severidad para la enfermedad "cuero de sapo" en raíces tuberosas de yuca.	22
3	Secuencia de eventos en la incubación, adquisición y transmisión de Mollicutes por insectos salta hojas y vectores relacionados.	27
4	Genoma de <i>Candidatus phytoplasma</i> 16SrIII causante de la enfermedad cuero de sapo en el cultivo de yuca.	31
5	Sintomatología de cuero de sapo grado 5 de plantas de yuca muestreadas para análisis PCR en tiempo real	40
6	Secciones de la estaca de yuca tomadas para la extracción de ADN. Floema 1 (A), yema (B), raíz (C), brote (D) y floema 2 (E)	41
7	Preparación de muestras de yema de tallos de yuca variedad Valencia para la extracción de ADN	42
8	Floema de corte longitudinal de tallos de yuca. A: brote proveniente de estaca enferma de cuero de sapo y B: brote proveniente de estaca sana (40X).	45
9	Tejido de plantas asintomáticas de <i>Ugni molinae</i> (A) y <i>Gaultheria phillyreifolia</i> (B); y su respectivo tejido floemático teñido con 4'6-diamidino 2-fenil-indol (DAPI) (C y D); tejidos de plantas con síntomas de escoba de bruja en <i>U. molinae</i> (E y G) y <i>G. phillyreifolia</i> (F y H). Cuerpos fluorescentes observados a 1000X.	46
10	Porcentaje de detección del fitoplasma 16SrIII, en brote, floema 2, floema 1, raíz y yema de plantas de yuca, analizados mediante PCR en tiempo real	47
11	Amplificación de ADN mediante PCR tiempo real de la estaca, brote y raíz de la planta 1, 4, 7 y 10 (A, B, C, D respectivamente), y del floema y la yema de la planta 25 y 4 (E y F respectivamente) de yuca variedad Valencia.	49
12	Amplificación de ADN mediante PCR tiempo real de plantas <i>In vitro</i> (var. Valencia y PER-58), plantas sintomáticas y plantas asintomáticas de cuero de sapo en yuca variedad Valencia	51

LISTA DE FIGURAS DE ANEXOS

Figura	Título	Página
A1	Diagrama de flujo de variables evaluadas durante la optimización de la metodología de preparación de la muestra histológica de yuca para ser visualizada mediante microscopía fluorescente	62

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar dos metodologías de diagnóstico de la enfermedad “cuero de sapo” a nivel de estaca de yuca; para ello se evaluó la presencia de estructuras similares a fitoplasmas mediante la técnica de microscopía fluorescente y la presencia del fitoplasma 16SrIII en diferentes secciones de la estaca de yuca mediante análisis de PCR en tiempo real. Además se evaluó la presencia del fitoplasma 16SrIII en plantas *In vitro* de yuca, así como en plantas asintomáticas para esta enfermedad. Para la evaluación de microscopía fluorescente se utilizó la técnica de tinción DAPI en el floema de tallos de brotes de yuca provenientes de estacas enfermas con cuero de sapo. Los cortes fueron observados al microscopio con un filtro U-FBVW el cual tiene un rango de longitud de onda de 400 a 440 nm en la fase de excitación y 460 nm en la fase de emisión. Se observaron estructuras similares a fitoplasmas en cortes histológicos provenientes de plantas sintomáticas. Para la determinación del fitoplasma mediante PCR en tiempo real se tomaron diferentes secciones de la estaca: floema 1 (floema de la estaca recién cortada), yema, floema 2 (floema de la estaca después de brotar), brote, raíz, testigo positivo y testigo negativo. El tratamiento que mostró mejores resultados fue la raíz con un 57% de resultados positivos, mientras que las yemas manifestaron el menor porcentaje de detección con un 11%. El análisis PCR en tiempo real generó resultados positivos tanto en plantas sintomáticas, como en plantas asintomáticas e *In vitro*.

Palabras clave: enfermedad cuero de sapo, fitoplasma, microscopía fluorescente, PCR tiempo real.

ABSTRACT

This study was aimed at evaluating two methods of diagnosing the cassava "frogskin" disease (CFSD) in cassava stakes. This was achieved by evaluating: (1) the presence of phytoplasma-like structures using fluorescent microscopy and (2) the presence of phytoplasma 16SrIII in different sections of cassava stake using a real-time PCR analysis. Additionally, cassava plants *In vitro* and asymptomatic plants were screened for the presence of phytoplasma 16SrIII to determine if the frogskin disease was present. For the fluorescent microscopy analysis, a DAPI staining technique was used in the phloem of sprouting cassava plant stems. These cassava sprouts originated from cassava stakes that were infected with the frogskin disease. The sections of cassava stake were observed using a U-FBVW filter microscope, consisting of a wavelength range of 400 to 440 nm in the excitation phase and 460 nm in the emission phase. Upon observation, phytoplasma-like structures, similar to those in histological sections of symptomatic plants, were detected. To determine the presence of phytoplasma through real-time analysis, different sections of the cassava stake were taken: phloem 1 (phloem of freshly cut cassava stake), cassava bud, phloem 2 (phloem of cassava stake after sprouting), sprouting cassava shoot, cassava root, a positive control and a negative control. The treatment that showed the best results was with the cassava root, testing 57% positive for phytoplasma. However, the cassava buds showed the least percentage of detection with a result of 11%. The real-time PCR analysis produced positive results both in symptomatic plants, as in asymptomatic and *In vitro* plants.

Key words: frogskin disease, phytoplasma, fluorescent microscopy, real time PCR.

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo de importancia a nivel mundial en cuanto a producción y área cultivada; y puede ser utilizada como un sistema de producción de bajos insumos agrícolas. Además, como fuente nutritiva aporta alto contenido de carbohidratos. Es por esto que, junto con otras raíces y tubérculos, constituye un alimento básico en la alimentación en muchos países subdesarrollados y en vías de desarrollo (Scott *et al.*, 2000).

Para el año 2012, el área sembrada a nivel mundial fue de 20,3 millones de hectáreas, con una producción de 262,6 millones de toneladas métricas, con un rendimiento promedio de 12,8 ton/ha. El mejor rendimiento por hectárea ha sido alcanzado en Asia con 19,7 ton/ha, seguido de América (12,3 ton/ha), Oceanía (12,1 ton/ha) y por último África (10,9 ton/ha). En América el principal productor de yuca es Brasil con 23 millones de toneladas, seguido de Colombia (2,2 mill.), Haití (0,66 mill.) (FAOSTAT, 2013).

En Costa Rica el área sembrada es de 15 044 hectáreas (INEC, 2014) con una producción total de 144 960 toneladas (FAOSTAT, 2013), lo que genera un rendimiento promedio de 9,6 ton/ha. La yuca ocupa el puesto número nueve en productos agrícolas de exportación. Ésta es destinada principalmente a Estados Unidos (67% del total de exportaciones), seguido de Holanda, Canadá, España y Reino Unido, en total la yuca de Costa Rica es comercializada a 30 destinos en el mundo, lo que generó ingresos al país de hasta \$86,6 millones en el 2011 (PROCOMER, 2013).

No obstante, la yuca es un cultivo que se encuentra expuesto a diversas enfermedades, entre las que se pueden mencionar la antracnosis, la roya, los mosaicos virales y el “cuero de sapo”. La enfermedad del cuero de sapo es una de las más importantes en el cultivo desde el punto de vista de impacto económico. Es asociada al fitoplasma 16SrIII como su posible agente causal. Se manifiesta formando grietas corchosas a las raíces tuberosas y en casos más severos no se da el llenado de éstas. Es una enfermedad devastadora que puede ocasionar pérdidas de hasta 90% en los cultivos. En cuanto a su diseminación, es

a través de la semilla asexual o estaca; por lo que año a año la enfermedad puede propagarse exponencialmente si no se seleccionan adecuadamente estacas libres de “cuero de sapo” (Álvarez, 2012).

Esta problemática conlleva al reto de buscar formas innovadoras de garantizar la inocuidad del material de propagación. Algunas de estas técnicas son la microscopía óptica y los análisis moleculares como el PCR, que son útiles en la detección de enfermedades (Álvarez *et al.*, 2009; Pardo, 2013).

Por ejemplo, mediante la microscopía óptica y el uso de la tinción DAPI se puede observar la presencia de fitoplasmas, que aparecen como puntos brillantes de forma redonda, alargada u ovalada principalmente en el floema de las plantas (Musetti y Favali, 2004). En cuanto al análisis mediante PCR, De Souza y colaboradores (2014) identificaron la presencia del fitoplasma 16SrIII en plantas de yuca mediante la realización de PCR anidado. Dentro de las plantas sintomáticas muestreadas se obtuvieron resultados positivos en las muestras de raíz tuberosa en un 21,9%, un 68,8% en muestras de tallo y 87,5% en muestras de hoja.

Debido a estos antecedentes surge la inquietud de evaluar, mediante microscopía y análisis PCR en tiempo real, la presencia del fitoplasma en diferentes secciones de la estaca de yuca contaminada con la enfermedad (yemas, floema, brote apical y brote radical); con el fin de establecer una propuesta de un protocolo de detección temprana de “cuero de sapo” a nivel de estaca.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar dos metodologías de diagnóstico de la enfermedad “Cuero de sapo” en estacas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

2.2. Objetivos específicos

- Examinar mediante microscopía fluorescente la presencia del fitoplasma 16SrIII en los espacios vasculares de las muestras de la planta de yuca.
- Evaluar la presencia del fitoplasma 16SrIII en la semilla asexual o estaca de yuca mediante análisis PCR en Tiempo Real.
- Evaluar el método de detección del fitoplasma 16SrIII mediante PCR en Tiempo Real en plantas sintomáticas, asintomáticas e *In vitro* de la enfermedad cuero de sapo.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Aspectos Biológicos del Cultivo

3.1.1. Taxonomía y morfología:

La yuca, conocida también como cassava, mandioca, suahili o tapioca; recibe el nombre científico *Manihot esculenta* propuesto en 1766 por Heinrich von Crantz. Pertenece a la clase Magnoliopsida, el orden Malpighiales y a la familia Euphorbiaceae. Tiene como centro de origen la zona Tropical Amazónica. Es una planta diploide con 18 pares de cromosomas (ITIS, 2011).

Según Cunha (2002) es un arbusto perenne, semi-leñoso, el cual puede alcanzar una altura máxima de 5 metros, pero la altura promedio ronda los 3 m y está adaptada a zonas tropicales y subtropicales.

3.1.1.1. Hojas

Son los principales órganos encargados de la fotosíntesis. Las hojas son caducas por lo que van muriendo y cayendo a medida que crece la planta, dejando el tallo descubierto. La hoja es simple y alterna, con filotaxia espiral, constituida por el pecíolo y la lámina foliar, generalmente con cinco a nueve folíolos. El tamaño de dichos folíolos puede variar de acuerdo a la variedad, pero rondan entre los 20 cm de largo y 6 cm de ancho; además los folíolos centrales son más grandes que los laterales. El haz de la hoja es más oscuro y brillante que el envés, además el mayor número de estomas se encuentra en el envés (Ceballos y de la Cruz, 2002).

El color del pecíolo puede variar de verde claro, verde oscuro, rojo oscuro o morado; esto va a depender de la variedad. La longitud del pecíolo varía entre 9-20 cm. El pecíolo en el punto de inserción con el tallo posee estípulas (Acosta *et al.*, 2006).

3.1.1.2. Flor

La yuca produce inflorescencias con flores monoicas y monoclinas (pistilo y estambres en la misma flor), pero con polinización cruzada. La autopolinización no ocurre debido al fenómeno de la protoginia, en la cual las flores femeninas abren una a dos semanas antes que las flores masculinas (Cunha, 2002).

3.1.1.3. Tallo

Es leñoso, conformado por la alternancia de nudos y entrenudos, en el cual es notable el sitio donde se encontraban las hojas unidas y que se han desprendido conforme la planta ha ido creciendo. Cada tallo a cierta altura produce ramificaciones secundarias (de 2 a 3 ramas), las cuales continúan creciendo y producen ramificaciones terciarias y así sucesivamente. Estas ramificaciones van constituyendo la arquitectura de la planta (Acosta *et al.*, 2006).

A nivel interno el tallo está constituido por la capa más externa que es la epidermis, seguido por el córtex hacia el interior. Posteriormente se encuentra el floema, seguido del cambium y el xilema; el cual a medida que el tallo va creciendo le van dando al tallo una consistencia leñosa. El centro del tallo está compuesto por células del parénquima (Ceballos y de la Cruz, 2002).

El crecimiento longitudinal del tallo es importante porque de él es donde se obtienen las estacas para la propagación vegetativa. Dichas estacas generalmente poseen una longitud de 20-30 cm y 2-3 cm de grosor (Zotyen, 2002; Bradshaw, 2010).

3.1.1.4. Raíz

Las raíces son las estructuras de almacenamiento de nutrientes de las plantas tuberosas; en este caso el almidón es el principal carbohidrato no estructural que almacena la yuca, principalmente en el parénquima, el cual constituye el 85% del peso total de la raíz. Pero, no todas las raíces llegan a almacenar almidones. Las plantas al provenir de reproducción asexual no generan raíz pivotante, sino que se producen una serie de raíces adventicias, de las cuales algunas después de cierto tiempo inician la tuberización (Cunha, 2002).

Las raíces penetran profundamente, lo que favorece que la planta soporte más tiempo períodos de sequía. Esta es una consideración importante a la hora de la siembra, ya que suelos poco profundos y camas pequeñas generarán dificultad de extracción de las yucas a la hora de la cosecha (Ceballos y de la Cruz, 2002).

3.1.2. Importancia socioeconómica de la yuca

La yuca es un cultivo importante en la alimentación humana. Según la FAO (2013) la yuca se puede convertir en el cultivo del siglo XXI que contribuya en la erradicación del hambre en los países pobres y en vías de desarrollo de África, Asia y América; así como un desafío al cambio climático; esto porque la yuca aparte de proporcionar una fuente importante de nutrientes como carbohidratos y vitaminas también es fácil de producir con poco uso de insumos.

La FAO (2013) resume la importancia del cultivo de yuca en seis aspectos fundamentales: desarrollo rural, seguridad alimentaria urbana, sustitución de importaciones, fuente de energía renovable, nuevos usos industriales y adaptación al cambio climático. Esto se ve reflejado en la creciente producción que ha tenido en los últimos años; para el año 2012 a nivel mundial se produjeron 262 millones de toneladas de raíz de yuca, un 60% más que en el año 2000. En el cuadro 1 se presenta los datos de producción mundial de yuca, donde el principal continente productor de yuca es África, seguido de Asia y América (FAOSTAT, 2013).

Cuadro 1. Producción de yuca (*Manihot esculenta*) a nivel mundial para el año 2012. Modificado de FAOSTAT (2013)

<u>Continente</u>	<u>Producción (ton)</u>
Africa	149 479 840,0
América	32 138 268,8
Asia	80 744 002,6
Oceanía	223 630,0
Total	262 585 741,4

El rendimiento en la producción mundial de yuca es de 12,8 ton/ha en 20,3 millones de hectáreas sembradas. El mejor rendimiento por hectárea se encuentra en Asia con 19,7 ton/ha, seguido de América (12,3 ton/ha), Oceanía (12,1 ton/ha) y por último África (10,9 ton/ha). En América el principal productor de yuca es Brasil con 23 millones de toneladas, seguido de Colombia (2,2 mill.), Haití (0,66 mill.) (FAOSTAT, 2013). En Costa Rica el área sembrada es de 15 044 hectáreas (INEC, 2014) con una producción total de 144 960 toneladas (FAOSTAT, 2013), lo que genera un rendimiento promedio de 9,6 ton/ha.

La importancia de la yuca a nivel de Costa Rica, radica en que es cultivada en la mayoría de los huertos familiares como un cultivo de subsistencia. Pero además, es una importante fuente de divisas para compañías que se dedican a la exportación de dicho producto. Las exportaciones de yuca han sido fluctuantes en los últimos años, pero se han mantenido dentro del rango de los \$44,5 millones en el año 2009 a los \$86,6 millones en el 2011. La yuca ocupa el puesto número nueve en productos agrícolas exportados por Costa Rica, la cual es exportada principalmente a Estados Unidos (67% del total de exportaciones), seguido de Holanda, Canadá, España y Reino Unido, en total la yuca de Costa Rica es exportada a 30 destinos en el mundo (PROCOMER, 2013).

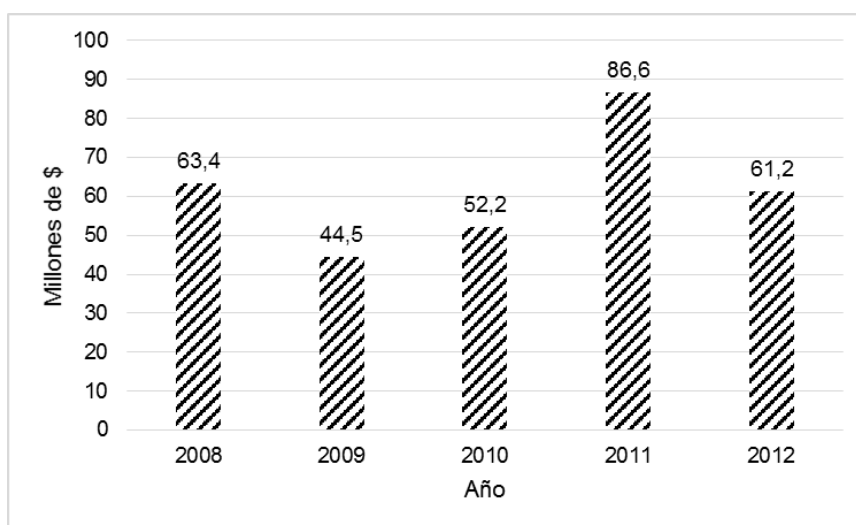


Figura 1. Evolución de la exportación de yuca de Costa Rica del año 2008-2012. Modificado de PROCOMER (2013).

El cultivo de yuca puede ser utilizado no solo como fuente de alimentación humana, sino que también es utilizada como forraje para la alimentación animal. Además, en la industria se extraen derivados de yuca para la fabricación de productos farmacéuticos, pegamento, papel, bioetanol, entre otros; lo que la convierte en un producto multipropósito (FAO, 2011).

3.2. Enfermedades y plagas del cultivo de yuca (*Manihot esculenta*)

La yuca es un cultivo susceptible a diferentes tipos de plagas y enfermedades, las cuales varían de acuerdo a las zonas geográficas y condiciones ambientales, ocasionando importantes pérdidas económicas.

Cuadro 2. Principales enfermedades que afectan el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta*)

Nombre de enfermedad	Agente causal	Referencia
Agalla bacterial del tallo	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; CIAT, 1982
Antracnosis	<i>Colletotrichum spp.</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Añublo pardo fungoso	<i>Cercospora vicosae</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Bacteriosis de la yuca	<i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i>	Álvarez <i>et al.</i> , 2002; CABI, 2015
Ceniza de la yuca	<i>Oidium manihotis</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Cuero de sapo	Fitoplasma 16SrIII	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2009
Mancha angular	<i>Xanthomonas campestris pv. Cassavae</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Van den Mooter <i>et al.</i> , 1987
Mancha parda	<i>Cercosporidium henningsii</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Mosaico común	CCMV	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Mosaico de las nervaduras	CVMD	CIAT, 1982; Ospina y Ceballos, 2002
Pudrición bacterial del tallo	<i>Erwinia carotovora pv. carotovora</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Pudrición radical	<i>Phytophthora spp.</i> , <i>Pythium spp.</i>	Álvarez <i>et al.</i> , 2002
Roya	<i>Uromyces spp.</i>	Lozano <i>et al.</i> , 1981; Alvarez <i>et al.</i> , 2002

Lozano y colaboradores (1981) señalan que existen más de 30 agentes causales que pueden ocasionar daños a la yuca. Pueden ser microorganismos bacterianos, virus, fitoplasmas y hongos, así como también plagas insectiles. Los modos de ataque también son variados, pudiendo ocasionar reducciones en el crecimiento y el vigor de las plantas, reducción de área foliar, pudriciones radiculares y por consiguiente pérdidas considerables en las cosechas. En el Cuadro 2, se presenta una lista de las principales enfermedades de este cultivo.

Además el cultivo de yuca puede ser dañado por otras plagas tales como: ácaros (*Tetranychus urticae*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), trips (*Frankliniella williamsi*), y la chinche de la yuca (*Cirtomenos bergi*) (MAG, 1991; Ospina y Ceballos, 2002).

3.3. “Cuero de sapo”

Esta enfermedad se manifiesta en las raíces de las plantas, causando pérdidas directamente en la producción. Es originaria de la Amazonía Brasileña o Colombiana inicialmente (Calvert y Cuervo, 2002), pero ha sido reportada también en países como Venezuela, Paraguay, Perú, Panamá y en Costa Rica con pérdidas hasta de un 90% (Álvarez, 2012). Torres (2013) reporta pérdidas por daños de cuero de sapo en la Zona Norte de Costa Rica de un 3,51% en un promedio de 34 parcelas muestreadas al azar en los cantones de San Carlos, Los Chiles y San Ramón; sin embargo, algunas de estas localidades presentaban pérdidas mucho mayores que el promedio obtenido; éstas eran de hasta 25,2% y 30,5% en la variedad Señorita y la variedad Tradicional (Valencia), respectivamente.

3.3.1. Sintomatología de “Cuero de sapo”

De acuerdo con Ospina y Ceballos (2002) las plantas de yuca no manifiestan una sintomatología clara en la parte aérea, solamente en casos que la planta está muy afectada, se forman clorosis y arrugamientos de las hojas. Los tallos pueden parecer más gruesos, mismos que luego son seleccionados por los productores como semilla, lo que disemina la enfermedad. Finalmente en la parte radical es donde se evidencia mejor la enfermedad: se forman hendiduras gruesas

y corchosas a lo largo y ancho de las raíces tuberosas lo que forma una figura de panal, la cáscara se ensancha y hay menor engrosamiento de las raíces.

Estos síntomas están relacionados con el modo de acción de los fitoplasmas, los cuáles obstruyen los poros de los tubos cribosos del floema, causando problemas en la translocación de fotosintatos (Christensen *et al.*, 2005 citado por Perilla, 2013).

Para medir la evolución de la enfermedad en el cultivo el CIAT propone una escala que va de 0 a 5; donde 0 es una planta completamente sana o asintomática y 5 es una planta con daños muy severos (Pardo, 2013). En el cuadro 3 se presenta la escala de evaluación del desarrollo de la enfermedad:



Figura 2. Ejemplos representativos de la escala de severidad para la enfermedad "cuero de sapo" en raíces tuberosas de yuca

Grado de severidad	Categoría	Descripción
0	Planta sana	<ul style="list-style-type: none"> •Raíces engrosadas y asintomáticas •Cáscara delgada y flexible
1	Muy leve	<ul style="list-style-type: none"> •Raíces engrosadas •Con pocas fisuras o hendiduras en forma de labios y en pocas raíces •Cáscara levemente opaca y poco flexible
2	Leve	<ul style="list-style-type: none"> •Raíces engrosadas •Con pocas fisuras en forma de labios y en muchas raíces •Cáscara opaca y quebradiza
3	Moderado	<ul style="list-style-type: none"> •Mayor número de fisuras o hendiduras en forma de labios en cualquier parte de la raíz (zona basal, intermedia, distal) •Leve disminución del engrosamiento de las raíces •Cáscara opaca y quebradiza
4	Severo	<ul style="list-style-type: none"> •Presencia de red o panal en pocas o muchas raíces •Moderada reducción del engrosamiento de las raíces •Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza.
5	Muy severo	<ul style="list-style-type: none"> •Presencia de red o panal en muchas raíces •Severa reducción del engrosamiento de las raíces y apariencia leñosa •Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza

Fuente: Pardo (2013)

Cuadro 3. Escala de evaluación de la severidad de la enfermedad “Cuero de sapo” en yuca.

3.3.2. Agente causal

El agente causal de la enfermedad “Cuero de Sapo” no ha sido definido con claridad. Hay investigadores que sostienen que se trata de un fitoplasma mientras que otros proponen que el agente causal es un Reovirus, o la combinación de ambos (un patosistema) (Ospina y Ceballos, 2002; Calvert *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009; Pardo, 2013).

Calvert y Tresh (2002) y Lozano y colaboradores (2008) sostienen que el agente causal del cuero de sapo corresponde a un virus, cuya especie pertenece a la familia Reoviridae. Una de las justificaciones se debe a estudios realizados con la variedad Secundina, la cual es muy susceptible a la enfermedad. Las plantas de esta variedad manifiestan síntomas externos a nivel foliar, particulares de los virus, como son los mosaicos. Otra razón es que mediante microscopía electrónica observaron partículas esféricas similares a la forma de los Reovirus.

Además, Lozano y colaboradores (2008) encontraron que el virus *Rice ragged stunt virus* muestra similitud a nivel genómico con el virus causante del cuero de sapo (CFSV).

No obstante, Álvarez y colaboradores (2009) mediante estudios de PCR anidado, utilizando ADN de plantas con sintomatología típica de cuero de sapo, han obtenido resultados positivos de amplificación de ADN de fitoplasmas. Los cuales mostraron un 99% de similitud a los fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrIII.

También se realizaron estudios de microscopía electrónica, donde se obtuvieron resultados positivos en cuanto a la presencia de estructuras similares a los fitoplasmas en los tubos cribosos del floema de plantas con sintomatología de cuero de sapo (Álvarez *et al.*, 2009).

3.4. Características de los fitoplasmas:

3.4.1. Clasificación taxonómica

Los fitoplasmas inicialmente fueron clasificados como organismos similares a los micoplasmas por la morfología y sintomatología que presentaban en plantas

y animales. Sin embargo, los estudios genéticos han demostrado que los fitoplasmas y micoplasmas no están tan relacionados. Actualmente son clasificados como microorganismos pertenecientes a la clase Mollicutes, pero la imposibilidad de reproducirlos en medios artificiales ha provocado que no exista clasificación para familia, género y especie (Agrios, 2005). El nombre de cada fitoplasma se le ha asignado con base en el síntoma de la enfermedad que produce en la planta, no obstante, algunos autores han clasificado a los fitoplasmas dándole como nombre científico "*Candidatus phytoplasma*", por ejemplo: *Candidatus phytoplasma aurantifolia* y *Candidatus phytoplasma australiense* entre otros. (Davis y Sinclair, 2008; Wientraub y Jones, 2010; Tomlinson *et al.*, 2010). Para que un fitoplasma sea clasificado dentro de la especie *Candidatus phytoplasma* debe tener al menos un 97,5% de similitud de la secuencia dentro del gen 16S rADN (Dickinson *et al.*, 2013).

No obstante, los fitoplasmas pueden ser identificados mediante técnicas moleculares tales como: anticuerpos específicos, pruebas de ADN, perfiles mediante Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism por sus siglas en inglés) o mediante el análisis del gen 16S rRNA con la técnica de amplificación de PCR. Mediante estas metodologías se han clasificado 52 fitoplasmas en 28 grupos diferentes (Agrios, 2005; Hodgetts *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2010; Dickinson *et al.*, 2013). Tomlinson *et al.* (2010) utilizaron el método LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) para la detección de dos fitoplasmas que infectan la palma de coco: el 16SrI y el 16SrXXII.

De acuerdo con NCBI (2013) la clasificación taxonómica para fitoplasma 16SrII es la siguiente:

Super Reino: Eubacteria

Phylum: Tenericutes

Clase: Mollicutes

Orden: Acholeplasmatales

Familia: Acholeplasmataceae

Género y especie: *Candidatus phytoplasma*

Grupo: 16SrIII (X-disease group)

3.4.2. Morfología

Agrios (2005) y Camarena y De la Torre (2008) describen un fitoplasma como microorganismos procariotas, sin pared celular, la membrana plasmática es trilaminar y mide unos 10 nm de grosor, son pleomórficos, con formas que pueden variar de ovoide a esferoidal o de tubulares a filamentosas. En el citoplasma se encuentra flotando el ADN de doble hélice y también hay ribosomas para la síntesis de proteínas. El tamaño del ADN va de los 530-1130 kb. Habitan en los espacios intracelulares de plantas o insectos; en plantas habitan principalmente en los tubos cribosos del floema. Su tamaño va a depender del tamaño de los tubos cribosos.

3.4.3. Vectores

Los fitoplasmas pueden ser transmitidos por insectos pinchadores-chupadores como por ejemplo los pertenecientes al orden Hemíptero y suborden Homóptero, como las familias Cicadellidae, Cixiidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae. Estos insectos se alimentan de plantas infectadas y contraen el fitoplasma. Sin embargo, no transmiten la enfermedad inmediatamente; sino que el fitoplasma debe tener un período de incubación (ver figura 3). Este período de incubación varía dependiendo de la temperatura, entre 10 días a 30°C y 45 días a 10°C (Agrios, 2005).

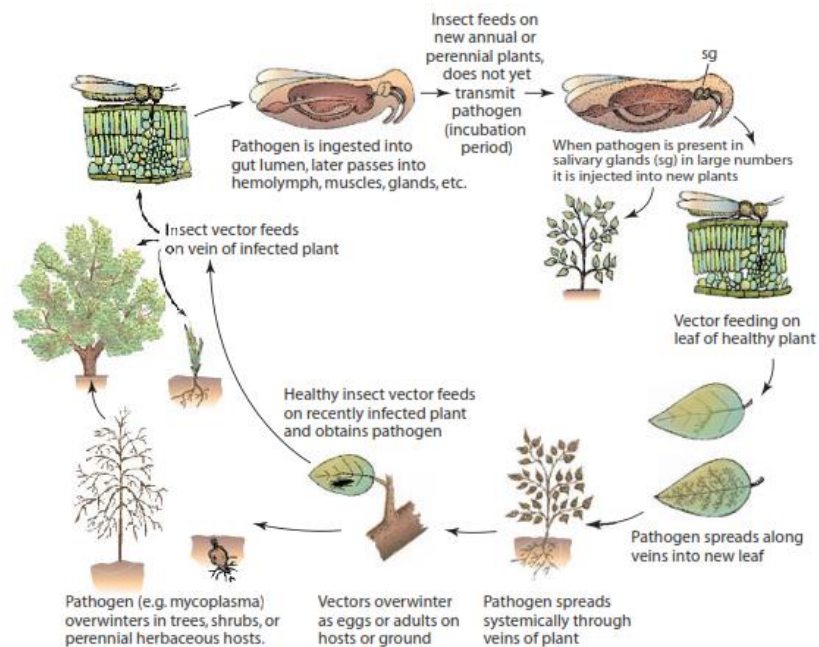


Figura 3. Secuencia de eventos en la incubación, adquisición y transmisión de Mollicutes por insectos salta hojas y vectores relacionados. Tomado de Agrios (2005).

3.4.4. Síntomas externos

Los fitoplasmas son parásitos obligados que infectan las plantas y les provocan síntomas que se manifiestan en ellas como por ejemplo: filodia (estructuras florales se convierten en estructuras foliares), virescencia (pétalos de las flores se tornan color verde), enrojecimiento de la planta, enanismo, escoba de bruja, clorosis, decaimiento general, reducción de los rendimientos y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 2005; Camarena y De la Torre, 2008; Alcántara, 2009).

3.4.5. Cambios químicos internos

No se sabe con certeza los mecanismos de acción específicos de los fitoplasmas dentro de la planta. Sin embargo, diversos estudios han realizado aportes importantes en cuanto a los mecanismos de defensa de la planta en respuesta al ataque del patógeno.

Se ha detectado la acumulación de calosa dentro de los tubos cribosos del floema, lo que genera una obstrucción para el transporte de aminoácidos y almidón, este último se acumula en los cloroplastos de las hojas, y cuya obstrucción conlleva a graves consecuencias: la pérdida de la funcionalidad de los cloroplastos y por lo tanto reducción de la tasa fotosintética, reducción del crecimiento por falta de aminoácidos que incorporen el nitrógeno inorgánico indispensable para el crecimiento y la necrosis del floema (Musetti, 2006 citado por Musetti, 2013).

Por otro lado, síntomas como los desórdenes de crecimiento y generación de brotes pueden deberse al aumento de hasta diez veces más de la concentración de Ácido Indol Acético (AIA) en los tejidos de plantas infectadas con fitoplasmas. Las citoquininas son otro grupo de fitohormonas que pueden estar involucradas en la filodia de las flores, ya que esta fitohormona es la responsable de la inducción en la formación de cloroplastos (Perttot *et al.*, 1998 y Kesumawati *et al.*, 2006 citados por Musetti, 2013).

3.4.6. Movimiento de los fitoplasmas en la planta

Los fitoplasmas una vez que ingresan a la planta la colonizan a través de movimiento sistémico por los poros que interconectan los tubos cribosos del floema (Nejat y Vadamalai, 2013). La forma de colonización de los fitoplasmas dependerá de las propiedades del hospedero y las reacciones específicas que produzca. (Marccone, 2010)

En un ensayo hecho por Kuske y Kirkpatrick (1992) (citados por Marccone, 2010) en el que se injertaron yemas de *Catharanthus roseus* infectado con *Candidatus phytoplasma asteris* sobre plantas sanas, se obtuvo que el fitoplasma tardó aproximadamente una semana para trasladarse de los brotes del injerto infectado hacia los brotes de la planta madre que salen del tallo principal por debajo del injerto. En plantas de fresa inoculadas con el fitoplasma “filodia de trébol” se observó mayor concentración del mismo en pedicelos y receptáculos, así como en sépalos y pétalos. Otro estudio realizado con *Vicia faba* se observó que aunque el fitoplasma (*Flavescence doreé*) fue inoculado en la parte aérea de

la planta, los primeros síntomas aparecieron en las raíces donde se multiplicó y comenzó a colonizar la planta desde la parte basal hacia arriba en un período de 20 días (Clark *et al.*, 1983 y Lherminier *et al.*, 1994 citados por Marcone, 2013).

Aunque se ha obtenido variabilidad en los puntos de localización de los fitoplasmas, Marcone (2013) sostiene que las mayores concentraciones de fitoplasmas son dirigidas hacia los puntos de crecimiento de la planta donde puedan encontrar los sumideros de energía, mismos que circulan a través del floema.

3.5. Diagnóstico de la enfermedad “Cuero de sapo” mediante microscopía fluorescente

La detección de fitoplasmas mediante técnicas histológicas de tinción es una herramienta rápida, simple y barata en comparación con otras metodologías de identificación más sofisticadas. Dienes y fluorocromo DAPI (4´6-diamidino 2-fenil-indol) son los colorantes más empleados, sin embargo también se han utilizado otras tinciones como Azul de Toluidina y Acridina naranja (Musetti y Favali, 2004).

3.5.1. Tinción Dienes

Con Dienes las células del xilema se tiñen de color azul turquesa brillante, las de la corteza se tiñen de azul púrpura y el floema queda incoloro. Los fitoplasmas, por efecto de una reacción de óxido reducción, se tornan de color azulado y de esa forma se visualizan en el floema (INIA, 2010).

3.5.2. Tinción DAPI (4´6-diamidino 2-fenil-indol)

Por otro lado la tinción DAPI tiene la habilidad de atravesar la membrana celular y unirse al ADN, para formar un complejo que presenta fuerte fluorescencia en el floema, más brillante que las células del parénquima. Aparecen puntos muy brillantes que son los fitoplasmas, mismos que en tejidos sanos no se observan (Musetti y Favali, 2004; INIA, 2010).

La tinción DAPI es más específica y más utilizada que la tinción Dienes. Ésta especificidad está dada a que DAPI se une más fuertemente a secuencias de ADN ricas en uniones A-T y con bajos porcentajes de G-C, lo que coincide con la secuenciación genómica de los fitoplasmas, que poseen un porcentaje de G-C de 21%-28%. DAPI tiene la ventaja de que su utilización es efectiva en tallo, hoja, pecíolo y raíz (INIA, 2010; Andrade y Arismendi, 2013; Dickinson *et al.*, 2013).

3.6. Diagnóstico de la enfermedad “Cuero de sapo” mediante técnicas moleculares

Recientemente en un estudio hecho por De Souza y colaboradores (2014) detectaron la presencia del fitoplasma 16SrIII-A y un virus ds-RNA en plantas de yuca que presentaban sintomatología de “cuero de sapo” en Brasil. La técnica de detección utilizada fue PCR anidado. Fueron evaluadas plantas sintomáticas y plantas asintomáticas. Dentro de las plantas sintomáticas muestreadas se obtuvieron resultados positivos en las muestras de raíz tuberosa en un 21,9%, 68,8% en muestras de tallo y 87,5% en muestras de hoja. Mientras que en las plantas asintomáticas no hubo resultados positivos de detección en las muestras de raíz tuberosa, pero sí se obtuvo resultado positivo en un 45% en muestras de tallo y un 30% en muestras de hoja.

En Colombia, estudios realizados por Álvarez y colaboradores (2009) mediante PCR anidado coinciden en la detección del agente causal de “cuero de sapo” o CFSD (Cassava Frogskin Disease) como un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrIII; sin embargo, mediante análisis RFLP realizados se ubicaron tentativamente dentro de los subgrupos ribosomal 16SrIII-L y proteína ribosomal rplIII-H, esto por diferencias encontradas con respecto a otros fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrIII.

Pardo (2013), analizó la presencia del fitoplasma 16SrII-L mediante qPCR o PCR en tiempo real, dio como resultado un 92,5% de éxito en la detección del fitoplasma correlacionado a su vez con plantas sintomáticas de la enfermedad “cuero de sapo”. Pardo (2013) evaluó la parte de la planta más efectiva para realizar la extracción del fitoplasma. Analizó el cogollo, floema secundario, floema

primario y pecíolo. Resultando por ejemplo, para el genotipo BIPD 249-45 que el mayor porcentaje de efectividad en la detección del fitoplasma fue en el floema secundario en raíz (entre el cambium y el parénquima) (100% de efectividad), seguido del floema primario y cogollo (ambos con 66%) y por último el pecíolo (50% de efectividad). La misma tendencia se obtuvo en los demás genotipos evaluados, concluyéndose que el pecíolo presenta diferencias estadísticas con respecto a las otras tres secciones de la planta evaluadas; por lo que no es recomendable utilizarlo para analizar la presencia del fitoplasma.

El genoma del fitoplasma 16SrIII cuenta con 851 pares de bases (pb), el cual se encuentra distribuido con un 55% de A-T y un 45% de C-G (NCBI, 2013). En la figura 3 se presenta el detalle de la conformación del ADN del fitoplasma 16SrIII.

```

1 cgcggaatt cgattagagt ggaaaaactc ccttgacggt acttaatgaa taagccccgg
61 ctaattatgt gccagcagcc gcgtaatac ataaggggcg agcgttatcc ggaattattg
121 ggcgtaaagg gtgcgtaggc gtttaataa gtctatagtt taatttcagt gcttaacgct
181 gttgtgctat agaactggt ttactagagt gagatagagg caagcgaat tccatgtgta
241 gcggtaaaat gcgtaaata atggaggaac accagaggcg taggcgctt gctgggtcct
301 tactgacgct gaggcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca
361 cgccgtaaac gatgagtact aagtgtcggg taaaactggt actgaagta acacattaag
421 tactccgcct gagtagtacg tacgcaagta tgaaacttaa aggaattgac gggactccgc
481 acaagcggtg gatcatggtt ttaattcga agatacacga aaaaccttac caggctctga
541 cattttcttg cgaagttata gaaatataat ggaggtcatc aggaaaacag gtgggtgcatg
601 gttgtcgtca gtcgtgctg tgagatgta ggtaagtcc taaaacgagc gcaacccttg
661 tcgtaggttg ccagcatgta acgatgggga cttaacgag actgccaatg aaaaattgga
721 ggaaggtggg gattacgtca aatcatcatg ccccttatga tctgggctac aaacgtgata
781 caatggttga tacaaagagt agctgaaacg cgagttctta gccaatctca aaaagtcaat
841 ctcagttngg a

```

Figura 4. Genoma de *Candidatus phytoplasma* 16SrIII causante de la enfermedad cuero de sapo en el cultivo de yuca (NCBI, 2013)

3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método molecular que permite la amplificación *in vitro* de segmentos específicos de ADN. Es una herramienta útil en medicina y biología. Con aplicaciones como la clonación de ADN, diagnóstico de enfermedades, pruebas de paternidad, identificación de huellas digitales, entre otras (Passarge, 2009; Pierce, 2009).

3.7.1. Componentes del PCR

3.7.1.1. Muestra de ADN

Es el ADN del que se desea amplificar y obtener copias de fragmentos. Se ha obtenido mediante un método de extracción y se le llama ADN molde (Cortázar y Silva, 2004).

3.7.1.2. ADN Polimerasa

Es una enzima obtenida de microorganismos termoestables que no se desnaturalizan a altas temperaturas, por ejemplo la bacteria *Thermophilus aquaticus* de la cual se obtiene la enzima Taq polimerasa. Esta enzima debe ser capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde. También se puede utilizar la enzima Vent, proveniente de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Generalmente estas enzimas son eficientes, el hecho de que fallen se puede dar más bien por una mala manipulación del usuario (Tamay *et al.*, 2013).

3.7.1.3. Cloruro de magnesio

Se utiliza como cofactor de la polimerasa, para que se liberen cationes divalentes del ión Mg^{++} para facilitar el alineamiento de los imprimadores y la eficiencia de la enzima. El cloruro de magnesio también ayuda a estabilizar las cargas negativas del ADN (Cortázar y Silva, 2004).

3.7.1.4. Cebadores o primers

Son moléculas cortas de segmentos complementarios de ADN de cadena sencilla, miden entre 15-25 bases. Se encargan de delimitar el segmento de ADN que se desea amplificar. Se unen desde el extremo 3", y cuya base debe ser una Guanina o una Citosina (Cortázar y Silva, 2004; Tamay *et al.*, 2013).

3.7.1.5. Nucleótidos

Se añaden en forma de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs). La polimerasa tomará los nucleótidos para unirlos complementariamente al ADN molde para formar las copias de los segmentos específicos (Cortázar y Silva, 2004).

3.7.1.6. Disolución buffer

Es necesaria para mantener la estabilidad de pH en la reacción (Tamay *et al.*, 2013). El Tris-HCl 10-50 mM es un buffer iónico bipolar recomendado para PCR, el cual tiene un pH entre 8.3 y 8.8 (Cortázar y Silva, 2004).

3.7.2. **Funcionamiento del PCR**

Para poder realizar esta amplificación es necesario conocer la secuenciación de ADN que rodea o limita el segmento específico que se desea amplificar. Una vez conocida la secuencia se diseñan los cebadores o imprimadores complementarios a las secuencias de los extremos 3' de la secuencia de ADN blanco. Posteriormente de adicionados todos los compuestos, se procede a realizar el PCR en un termociclador, donde se realizan las fases de desnaturalización, hibridación y polimerización, durante varios ciclos, procurando la amplificación de los segmentos del ADN molde deseados, según la complementariedad con los cebadores preseleccionados (Passarge, 2009; Tamay *et al.*, 2013).

3.7.2.1. Desnaturalización

Para que los imprimadores se unan, la cadena debe desnaturalizarse o separarse de los puentes de hidrógeno que las unen. En la naturaleza esta separación está a cargo de las helicasas, pero artificialmente puede llevarse a cabo mediante altas temperaturas (95°C) (Passarge, 2009; Tamay *et al.*, 2013).

3.7.2.2. Hibridación

Seguidamente la temperatura se baja a 50-70°C para que se dé la alineación o hibridación en la que los imprimadores se unen a los fragmentos complementarios de la cadena de ADN que se quiere amplificar (Passarge, 2009; Tamay *et al.*, 2013).

3.7.2.3. Polimerización

Una vez unidos los imprimadores inicia el proceso de polimerización o síntesis. En este proceso la Taq ADN polimerasa reconoce los imprimadores y sabrá donde tiene que empezar a unir los dNTPs; esta tercer fase debe ocurrir a una temperatura de 70-75°C (Tamay *et al.*, 2013).

De esta forma habrá finalizado el primer ciclo de amplificación de la secuencia específica de ADN deseada. Para realizar el PCR se utiliza un termociclador, que básicamente controla la temperatura durante cada ciclo. En el PCR convencional para evaluar la eficiencia de la amplificación se debe recurrir a una electroforesis (Passarge, 2009).

Un PCR realiza de 25 a 35 ciclos, dependiendo de los protocolos. La cantidad de amplificaciones en cada ciclo se calcula exponencialmente de la forma 2^n , donde n se refiere al número de ciclos (Passarge, 2009). Sin embargo, el resultado final de amplificaciones puede ser menor al número calculado, debido a la sensibilidad del PCR en tiempo real, donde pueden ocurrir problemas propios del método de amplificación, como por ejemplo fallos en la esterilización, error de pipeteo, reactivos dañados o mal funcionamiento del termociclador (de Prado, 2010).

3.7.3. PCR en Tiempo Real

La principal característica del PCR en tiempo real es que se da la amplificación, detección y cuantificación de manera simultánea. Deja de ser una técnica cualitativa como el PCR convencional y se convierte en cuantitativa. Además, no hay necesidad de realizar procesos adicionales post-PCR para verificar la amplificación como la corrida electroforética (Pierce, 2009; Fonseca *et al.*, 2010).

Se utiliza una sonda que posee fluorescencia específica para la secuencia de ADN de interés. De esta forma se mide la cantidad de amplificaciones, ya que la intensidad de la emisión de fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de ADN formado. Los termocicladores traen incorporados un lector de fluorescencia que evalúa inmediatamente la fluorescencia emitida durante cada ciclo (Pierce, 2009; Fonseca *et al.*, 2010).

Los dos principales métodos de cuantificación de ADN amplificado son el uso de sondas intercalantes y sondas de hibridación específicas:

3.7.3.1. Agentes intercalantes:

Son fluorocromos que tienen la capacidad de producir fluorescencia una vez que se unen al ADN de doble cadena. Además, tienen la capacidad de no ser inhibidos por la reacción de PCR. En la etapa de desnaturalización las cadenas de ADN se separan y la intensidad de fluorescencia disminuye pero, posteriormente en la polimerización se amplifican nuevas cadenas de ADN el fluorocromo se une a las nuevas cadenas de ADN y se duplica la intensidad de la fluorescencia. Dentro de este tipo de fluoróforo el más utilizado corresponde a SYBR Green. Tienen como inconveniente su baja especificidad, lo que genera que se puedan unir a otras moléculas como por ejemplo a dímeros de cebadores (Rodríguez y Rodríguez, 2006; Applied Biosystems, 2010).

3.7.3.2. Sondas de hibridación específicas:

Son sondas oligonucleótidas, las cuales poseen un fluorocromo notificador en el extremo 5' y un apantallador en el extremo 3', la proximidad del apantallador impide la fluorescencia del fluorocromo notificador mientras no haya reacción. La sonda se encuentra anillada cerca de la ubicación de los imprimadores, así que en la fase de polimerización la Taq polimeraza rompe la sonda para continuar con el ensamblaje de la cadena complementaria de ADN y separa el fluorocromo notificador del apantallador lo que aumenta la señal de fluorescencia. Esta reacción se produce en cada ciclo de la PCR, por lo que la fluorescencia va aumentando a medida que van aumentando los ciclos (Rodríguez y Rodríguez, 2006; Applied Biosystems, 2010).

Estas sondas se pueden clasificar en sondas de hidrólisis, molecular beacons y sondas FRET. Dentro de las sondas más utilizadas se pueden citar las TaqMan y PrimeTime, las cuáles son sondas de hidrólisis (Rodríguez y Rodríguez, 2006;).

Fonseca y colaboradores (2010) mencionan que las principales ventajas del PCR en tiempo real son:

- Tiene más rapidez y sensibilidad en comparación con el PCR convencional y los procesos de detección que se deben realizar post-PCR.
- Se disminuye el riesgo de contaminación por el uso de un sistema cerrado.
- Se puede cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras.
- Permite la cuantificación de cantidades más pequeñas de secuencias de nucleótidos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del estudio

El proyecto se llevó a cabo en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) en la sede de Santa Clara de San Carlos, específicamente en el Laboratorio de Biotecnología perteneciente al CIDASTH de la Escuela de Agronomía y el Laboratorio de Biología Molecular que pertenece a la Escuela de Ciencias Naturales y Exactas.

El material vegetal de estudio fue propagado en condiciones controladas en el invernadero del CIDASTH. Se trajeron estacas de yuca de la variedad Valencia provenientes de las zonas de Los Chiles y Upala, la cuales eran sintomáticas de la enfermedad “Cuero de sapo”. En el Laboratorio de Biología Molecular se realizaron los análisis moleculares.

4.2. I Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma mediante microscopía fluorescente

Estacas con sintomatología de cuero de sapo fueron traídas de Los Chiles y puestas a brotar en maceteros bajo condiciones controladas de invernadero. Un mes después de haber emergido el brote, éste fue cortado a la altura de 1 cm y llevado al laboratorio para la preparación y análisis de la muestra.

4.2.1. Preparación de la muestra:

Para la preparación de la muestra se evaluaron diferentes protocolos, utilizando como base el protocolo propuesto por INIA (2010), con el objetivo de afinar la técnica de preparación de la muestra.

Se evaluó la viabilidad de la muestra deshidratada o sin deshidratar, se comparó el corte a mano alzada o el corte con la utilización del micrótopo, se comparó el corte de la muestra parafinada o el corte sin parafina y se evaluó la visualización de la muestra haciendo una tinción previa con azul de anilina o sin ella (ver figura A1 en Anexos).

Finalmente se utilizó la metodología que se describe a continuación:

1. Se tomó la base del tallo del brote que tuviera 1 cm de diámetro y se cortó en trozos de 1 cm aproximadamente.
2. Se puso en formaldehído al 5% en tampón fosfato 0,1 M a un pH de 6.8 durante 15 minutos.
3. Se lavó con tampón fosfato 0,1 M a un pH de 6,9.
4. Se deshidrató el tejido en alcohol, de acuerdo al protocolo propuesto por Montero (2001) de la siguiente forma:

Cuadro 4. Concentración de disoluciones alcohólicas para la deshidratación de tejido vegetal.

Disolución	Volumen de etanol (ml)	Volumen de butanol (ml)	Volumen de agua destilada (ml)
A	50	10	40
B	50	20	30
C	50	35	15
D	50	50	-
E	25	75	-
F	100	-	-

Los cortes de tejido fueron sumergidos en cada una de las disoluciones, iniciando con la disolución A. Se puso a calentar en el horno de microondas a una potencia de 100 W durante 1 minuto, se dejó enfriar el tejido durante 1 minuto y posteriormente se calentó nuevamente por 30 segundos. Una vez realizado este ciclo de calentamiento se cambió el corte a la disolución B y se realizó el mismo protocolo de calentamiento. Así sucesivamente hasta finalizar con la disolución F.

5. Se tomó el trozo deshidratado y con un bisturí se realizaron cortes longitudinales a mano alzada.
6. Se colocaron los cortes en porta objetos y se agregó una gota de azul de anilina durante un minuto y posterior a ello se retiró la tinción con ayuda de papel absorbente o servilleta.

7. Se agregó la tinción DAPI a 1 µg/ml (solución estándar) durante 20 min. Las muestras estuvieron protegidas de la luz, ya que la tinción DAPI es fotosensible.
8. Se colocó la muestra en el microscopio óptico con luz ultravioleta marca Olympus IX53 Reflected Fluorescence System y se observó a diferentes aumentos (10X, 20X y 40X).

El tipo de filtro de luz ultravioleta que se utilizó para la observación de las muestras corresponde al filtro U-FBVW el cual tiene un rango de longitud de onda de 400 a 440 nm en la fase de excitación y 460 nm en la fase de emisión.

4.3. II Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en diferentes partes de la estaca de yuca: yema, floema 1, raíz, brote y floema 2.

4.3.1. Tratamientos

Se seleccionaron 10 tallos de yuca provenientes de plantas sintomáticas de cuero sapo grado 5, como se observa en la figura 5. Estas plantas infectadas provenían de Upala.

Cabe recalcar que el material utilizado en el análisis de microscopía no corresponde al mismo material que se utilizó en las pruebas PCR en tiempo real.

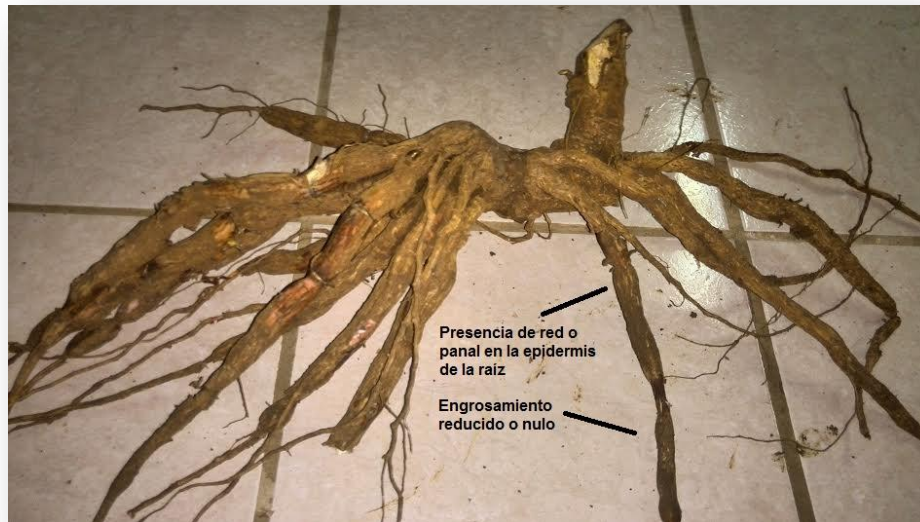


Figura 5. Sintomatología de cuerpo de sapo grado 5 de plantas de yuca muestreadas para análisis PCR en tiempo real.

Estas plantas contaban con un número entre 55-65 yemas. Dichos tallos fueron cortados en secciones de 20 cm, se seleccionaron las estacas de la parte basal del tallo, ya que es donde puede haber mayor posibilidad de encontrar el patógeno, porque es donde se ve menos afectado por la temperatura a lo largo del tallo (Lozano *et al.*, 2008). Posteriormente los trozos de estaca basal fueron cortados longitudinalmente. Una mitad fue utilizada para extraer el floema (floema 1) y las yemas; mientras que la otra mitad fue puesta a brotar en macetas con suelo y riego localizado cada tres días. A los 12 días de haber emergido la plántula se cortó los brotes y las raíces de cada estaca, además se tomó el floema de la estaca puesta a brotar (floema 2). De esta forma se contó con siete tratamientos, a saber: floema 1, yema, floema 2, brote, raíz, testigo positivo y testigo negativo. Cada tratamiento contó con 10 repeticiones.

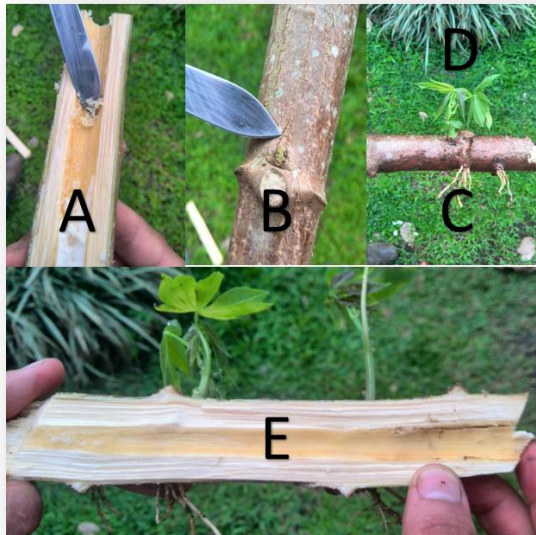


Figura 6. Secciones de la estaca de yuca tomadas para la extracción de ADN. Floema 1 (A), yema (B), raíz (C), brote (D) y floema 2 (E).

Cada una de las muestras fue cortada con bisturí en secciones finas con el objetivo de facilitar la extracción de ADN. Cada vez que se manipulaba una muestra diferente se realizó desinfección de los instrumentos de trabajo con Etanol 70% con el fin de evitar contaminación cruzada. Las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico antes del proceso de extracción de ADN, durante 3 días a 5°C.

El control positivo consistió de una muestra de ADN la cual contiene el material genético del fitoplasma causante de la enfermedad “cuero de sapo” (Gen 16SrIII), la cual es proveniente del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT-Colombia).



Figura 7. Preparación de muestras de yema de tallos de yuca variedad Valencia para la extracción de ADN.

4.3.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de cada muestra se utilizó el protocolo propuesto por Montero *et al.* (2011), con las siguientes modificaciones:

1. Se maceró el tejido leñoso en matraz de porcelana con nitrógeno líquido y se tomó 0,1 gramos en un tubo microcentrífuga plano de 1,5 ml.
2. Se adicionaron 600 μ l de Buffer de Extracción (Tris-HCl (0,1 M), EDTA (0,05 M), NaCl (0,5 M), PVP (0,00025 M) y SDS (0,12484 M)) y se mezcló en vórtex por 1 minuto.
3. Se adicionó 100 μ l de SDS 10% y se incubó en agitación 20 minutos a 65°C.
4. Se adicionó 200 μ l de acetato de potasio pH 5.5, se agitó brevemente en vórtex y se dejó precipitar a -20°C durante 30 minutos.
5. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
6. Se colocó el sobrenadante (aproximadamente 500 μ l) en tubo de microcentrífuga curvo de 1,5 ml y se adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol frío al 100% (aproximadamente 250 μ l).
7. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
8. Se eliminó sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 500 μ l de etanol frío al 75%. Se agitó brevemente en vórtex.
9. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

10. Posteriormente se repitieron pasos 8 y 9.
11. Se secó en el concentrador de ADN al vacío.
12. Finalmente se resuspendió el precipitado en 50 µl de Buffer TE y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.3.3. Análisis PCR en tiempo real

4.3.3.1. Secuencia de imprimadores utilizados en la amplificación del ADN:

Para la realización de la amplificación se utilizaron los imprimadores Forward CAT GTG TAG CGG TAA AAT GCG--- y Reverse TCA GTA AAG ACC CAG CAA GC. Estos imprimadores son capaces de aislar el fragmento AGG AAC ACC AGA GGC GTA GGC, el cual es el que se desea amplificar.

La sonda utilizada fue Prime Time Std® qPCR: /56-FAM/AGG AAC ACC/Zen/AGA GGC GTA GGC/3IABkFG/.

Las extracciones de ADN fueron analizadas mediante PCR en tiempo real en el termociclador Applied Biosystems modelo StepOne, cuyo perfil de temperaturas y volumen de reacción se describe a continuación:

Para el PCR se prepararon reacciones de 12 µl, que contenían 500nM de cada imprimador, 250nM de la sonda (IDT Prime Time qPCR assay), 1X de la mezcla de reacción (Thermo Scientific Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) y 1,2 µl del ADN molde. Además se agregó a las reacciones un control positivo interno (Applied Biosystems TaqMan exogenous internal positive control) que consistió en 1X ADN molde de control positivo interno, imprimadores y sonda para el mismo.

Los resultados del PCR tiempo real fueron analizados en el Real Time PCR Software de Applied Biosystems, utilizando para ello la absorbancia en cada ciclo de reacción.

Cuadro 5. Perfil térmico para la reacción PCR en tiempo real

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10:00 min.
Desnaturalización	95°C	0:15 segundos
Hibridación	60°C	1:00 min.

4.4. III Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en plantas sintomáticas, asintomáticas y plantas *In vitro*

Fueron seleccionadas plantas de yuca las cuáles no presentaban síntomas de la enfermedad “cuero de sapo”, a las cuáles se les extrajo el ADN para ser comparado, mediante la técnica de PCR, con plantas sintomáticas de la enfermedad.

Además se incluyó dentro del ensayo plantas *In vitro* de las variedades: Valencia y Secundina. El método de extracción de ADN y amplificación de ADN mediante PCR en tiempo real fue igual que el mencionado en la primera etapa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. I Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma mediante microscopía fluorescente

El análisis histológico de tallos de brotes de yuca mediante microscopía fluorescente arrojó resultados interesantes. Cabe resaltar que el filtro utilizado no es el recomendado para visualizar tejido teñido con DAPI. Para la tinción DAPI se debe utilizar el filtro U-FUW con una longitud de onda de 340-390 nm en la fase de excitación y de 420 nm en la fase de emisión; esto permitiría observar las estructuras fitoplasmáticas con un color azul fluorescente. Mas en cambio, el filtro utilizado (U-FBVW) posee una longitud de onda de excitación de 400-440 nm y 460 nm de emisión. La implicación que esto conlleva es que se dificulta un poco más la visualización de fitoplasmas, los cuales han de verse color anaranjado-rojizo.

Se encontraron algunas estructuras en el área de floema que asemejan cuerpos fitoplasmáticos en comparación con lo reportado en diversas investigaciones.

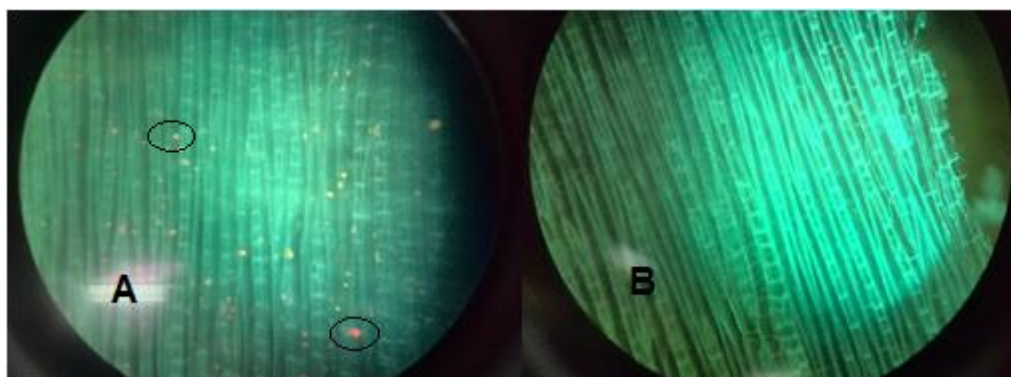


Figura 8. Floema de corte longitudinal de tallos de yuca. A: brote proveniente de estaca enferma de cuero de sapo y B: brote proveniente de estaca sana (40X).

En la figura 8 se observan pequeños puntos color rojo que resaltan en el floema de la planta A, la cual es proveniente de una estaca enferma con cuero de sapo. Estos resultados se asemejan a los presentados por Arismendi *et al.* (2010),

en los cuales evaluaron, mediante microscopía fluorescente y tinción DAPI, la presencia del fitoplasma asociado a la enfermedad “escoba de bruja” en *Ugni molinae* Turcz. y *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer. En este caso se utilizó un filtro de 450-490 nm de longitud de onda de excitación y 520 nm de emisión. En la figura 8 se observa el resultado obtenido.

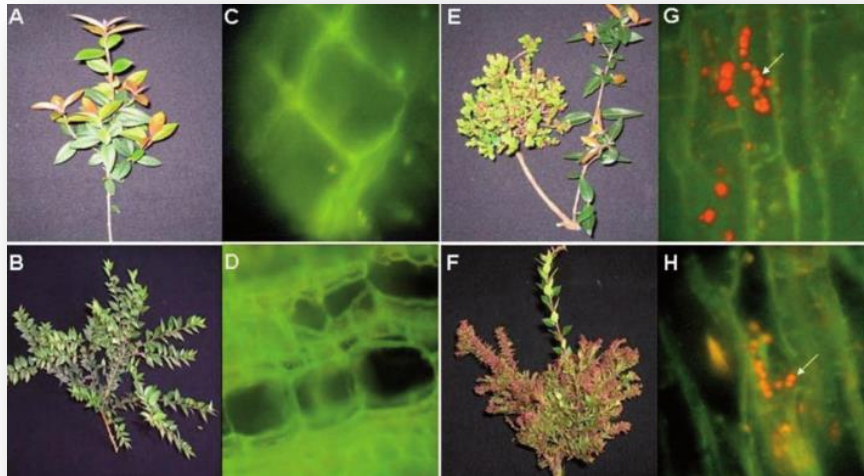


Figura 9. Tejido de plantas asintomáticas de *Ugni molinae* (A) y *Gaultheria phillyreifolia* (B); y su respectivo tejido floemático teñido con 4'6-diamidino 2-fenil-indol (DAPI) (C y D); tejidos de plantas con síntomas de escoba de bruja en *U. molinae* (E y G) y *G. phillyreifolia* (F y H). Cuerpos fluorescentes observados a 1000X. Tomado de Arismendi *et al.* (2010).

Otros estudios demuestran que es posible diagnosticar la presencia de fitoplasmas mediante microscopía fluorescente y tinción DAPI. Por ejemplo, la detección del fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en el cultivo de maíz (Alcántara, 2009), así como el fitoplasma *Brinjal Little Leaf* en berenjena (Das y Mitra, 2004). Jarausch y colaboradores (1998) realizaron un estudio en la detección de fitoplasmas que atacan frutas de hueso en Europa. En este caso evaluaron la correlación entre la detección de fitoplasmas mediante microscopía y tinción DAPI y la detección utilizando el análisis PCR. El resultado explica que existe un 81% de

las pruebas de PCR que resultaron positivas dieron también resultado positivo en la evaluación con microscopía fluorescente.

5.2. II Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en diferentes partes de la estaca: yema, floema, raíz, brote y estaca completa

Se evaluaron las diferentes partes de la estaca para determinar cuál de ellas brinda una mejor respuesta a la detección del fitoplasma 16SrIII mediante el análisis PCR en tiempo real. En la figura 10 se observa que la raíz corresponde a la estructura de la planta que presentó el más alto porcentaje de detección positivo con un 57%, seguido del floema 2 con 52% y en tercer lugar el floema 1 con 40%.

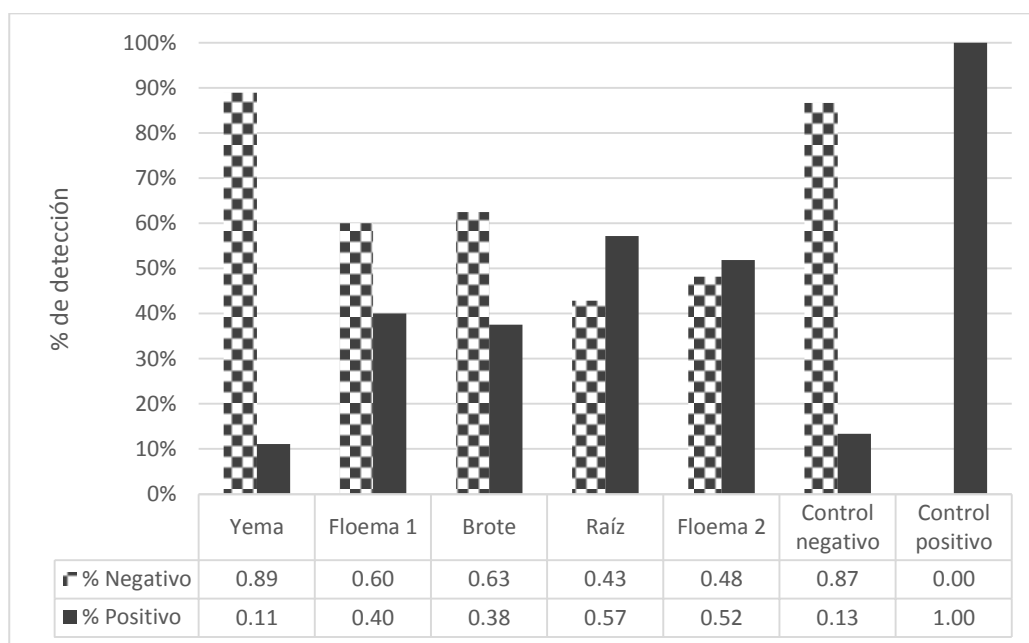


Figura 10. Porcentaje de detección del fitoplasma 16SrIII, en brote, floema 2, floema 1, raíz y yema de plantas de yuca, analizados mediante PCR en tiempo real.

El ADN proveniente del floema 2 es el que inicia la curva exponencial de la amplificación antes que el brote y la raíz, como se observa en la figura 11 (A, B, D). Por otro lado los resultados positivos del floema 1 y la yema manifiestan un comportamiento similar al de brote y raíz; sin embargo, como se observó en la figura 10, el brote, el floema 1 y la yema dieron como resultado una probabilidad

de amplificación del gen 16SrIII menor al 50%. Cabe resaltar que todas las plantas evaluadas tenían sintomatología de cuero de sapo grado 5.

Los resultados obtenidos difieren con lo mencionado por Pardo (2013), el cual obtuvo en el material de yuca BIPD 249-45 un 100% de detección del fitoplasma 16 SrIII-L en floema secundario de raíces de yuca, así como 66% de detección en cogollo y floema primario y 50% en pecíolo. El material analizado por Pardo tenía un grado de severidad de “cuero de sapo” de 4 a 5. Además, Pardo (2013) concluye que, de acuerdo con los resultados obtenidos en su estudio, la probabilidad de detección del fitoplasma 16SrIII-L en estacas provenientes de plantas con síntomas es de 64.29%; esta probabilidad es un 7.29% mayor a los resultados obtenidos en este estudio para el tratamiento de raíz (57%).

Además, de acuerdo con Stratagene (2007) citado por Pardo (2013) el rango de confiabilidad del diagnóstico de los resultados va de 90%-100%, por lo que los resultados obtenidos se encuentran fuera de este rango.

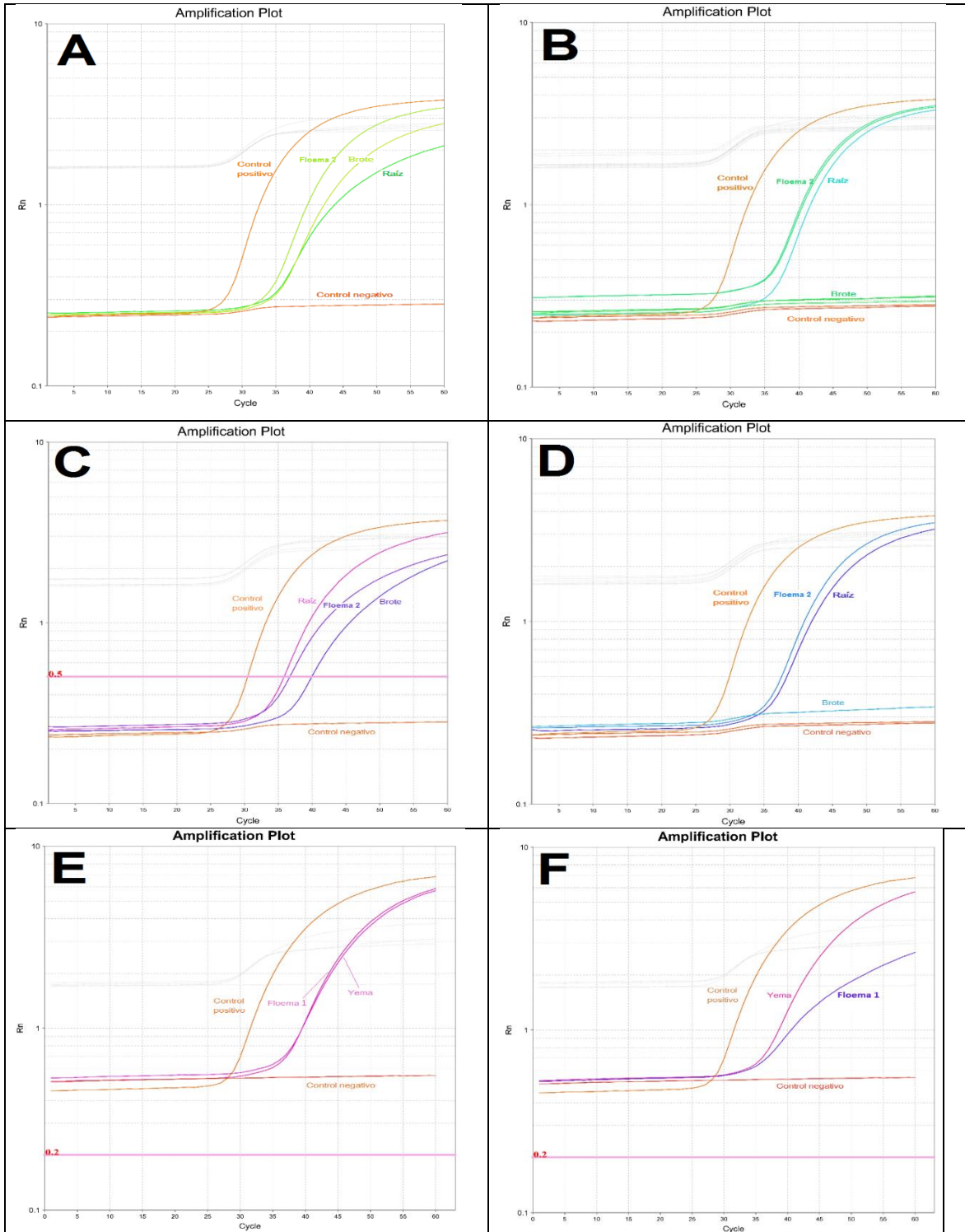


Fig. 11. Amplificación de ADN mediante PCR tiempo real de la estaca, brote y raíz de la planta 1, 4, 7 y 10 (A, B, C, D respectivamente), y del floema y la yema de la planta 25 y 4 (E y F respectivamente) de yuca variedad Valencia.

Los resultados demuestran que además de ser la raíz y la estaca las secciones que más detecciones positivas presentaron en los análisis PCR en tiempo real (57% y 52% respectivamente), también son estos los que inician primero la fase exponencial en la amplificación del ADN (entre los 30 y 35 ciclos), por lo que se deduce que originalmente estas estructuras son las que presentan una mayor concentración de fitoplasmas.

Es posible que el floema 2 presentara alta concentración de fitoplasmas debido a que ésta es el reservorio inicial donde puede estar latente este microorganismo. Por otro lado, el hecho de que la raíz también presentara alta probabilidad de detección del fitoplasma; coincide con lo propuesto por Saracco *et al.* (2006) citado por Perilla (2013) donde se expresa que en plantas herbáceas el patógeno tiende a dirigirse hacia los puntos de crecimiento, donde hay un sumidero de nutrientes y así propagarse rápidamente; lo anterior es basado en estudios realizados en Crisantemos y *Chataranthus roseus* respectivamente.

Por otro lado, Marcone (2010), manifiesta que en plantas leñosas los fitoplasmas del grupo 16SrIII prefieren colonizar tejidos maduros y fuentes metabólicas; presentando baja concentración en los puntos de crecimiento. Es por esto que se puede concluir que la distribución del fitoplasma es variable en la planta y que va a depender de factores como el estado fenológico de la planta y la conformación de sus órganos (herbáceos o leñosos).

5.3. III Etapa: Evaluación de la presencia del fitoplasma en plantas sintomáticas, asintomáticas y vitroplantas

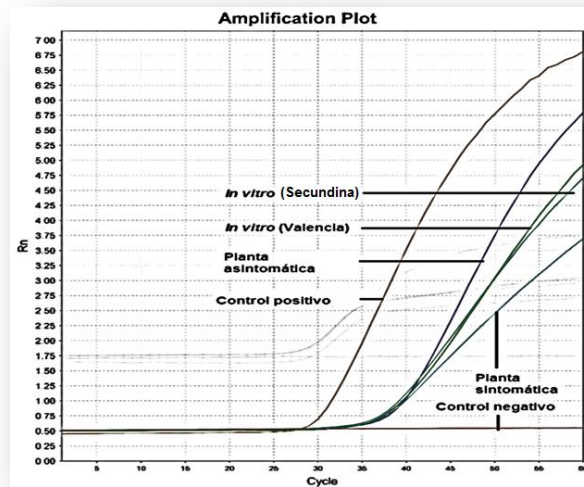


Figura 12. Amplificación de ADN mediante PCR tiempo real de plantas *In vitro* (var. Valencia y PER-58), plantas sintomáticas y plantas asintomáticas de cuero de sapo en yuca variedad Valencia.

En la figura 12 se observa que plantas que en apariencia estaban libres del fitoplasma 16SrIII causante de la enfermedad “cuero de sapo”, también dieron resultados positivos. Este resultado puede ser atribuido a varias causas. En primer lugar es posible que las plantas *In vitro* estén contaminadas con la enfermedad “cuero de sapo”, pero que la sintomatología no se esté manifestando porque las plantas *In vitro* no mantienen reservas de almidón, si no que se comportan como heterótrofas consumiendo el alimento que les provee el medio de cultivo (Chandra *et al.*, 2010).

Por otro lado, las plantas asintomáticas traídas de campo como controles negativos podrían estar igualmente infectadas con el fitoplasma 16SrIII pero no manifestar externamente la enfermedad. Además, la sonda diseñada para la detección de fitoplasmas podría estar detectando otros tipos de fitoplasmas presentes en el tejido de las plantas asintomáticas provenientes del campo por lo que se estaría detectando un falso positivo.

6. CONCLUSIONES

- Se observaron posibles estructuras fitoplasmáticas en el floema de plantas provenientes de estacas enfermas con cuero de sapo.
- La sección radicular resultó ser la que presenta la mayor probabilidad de detección del fitoplasma 16SrIII en estacas provenientes de material sintomático de la enfermedad cuero de sapo (57%).
- La sección de la yema resultó ser la que menor probabilidad de detección del fitoplasma 16SrIII mostró, solamente con un 11%.
- Los valores Ct (Cycle threshold) de las amplificaciones de ADN estuvieron en el intervalo de 35 a 40 ciclos.
- Tanto plantas sintomáticas, asintomáticas e *In vitro* mostraron resultados positivos en la amplificación PCR en tiempo real.
- Los resultados obtenidos son irregulares, tomando en cuenta que el rango de confianza de detección sugerido es de 90% a 100%.

7. RECOMENDACIONES

- Es preciso visualizar con el filtro adecuado para tinción DAPI los cortes histológicos de plantas con posible presencia de fitoplasmas para asegurar un resultado más concluyente.
- Validar el experimento con material infectado con cuero de sapo con sintomatología 3 y 4, para evaluar si la tendencia de los resultados es similar a los obtenidos con sintomatología grado 5.
- El diagnóstico de la enfermedad mediante microscopía ultravioleta y tinción DAPI puede ser una herramienta que ayude a reforzar el diagnóstico de la enfermedad mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Correlacionar los resultados positivos y negativos de muestras analizadas con tinción DAPI en microscopio fluorescente con un análisis PCR en tiempo real de las mismas muestras evaluadas.
- Evaluar la presencia del fitoplasma 16 SrIII en los diferentes órganos de la planta los 30 y 45 días después de la emergencia del brote para verificar si el movimiento de los fitoplasmas sigue la misma tendencia que la presentada a los 12 días después de emergido el brote.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, R. TAMAYO, A. PALACIOS, R. 2006. Caracterización morfológica y extracción de ADN de 11 clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en la universidad EARTH, Costa Rica. *Tierra Tropical*. 2(1): 61-69
- AGRIOS, G. 2005. *Plant Pathology*. Quinta Edición. Florida,US. Elsevier. 922 p.
- ALCÁNTARA, S. 2009. Detección e incidencia del fitoplasma Maize Bunchy Stunt su relación con el rendimiento en el maíz en el estado de Veracruz, México. Tesis M. Sc. México D.F., MX. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 33 p.
- ÁLVAREZ, E. BELLOTTI, A. CALVERT, L. CADAVID, L. PINEDA, B. LLANO, G. CUERVO, M. 2002. Guía práctica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca. CIAT. Cali, CO. 120 pp.
- ÁLVAREZ, E. MEJÍA, J. LLANO, G. LOKE, J. CALARI, A. DUDUK, B. BERTACCINI, A. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Disease*. 93(11): 1139-1145
- ÁLVAREZ, E. 2012. Innovaciones tecnológicas en el manejo integrado del cuero de sapo de la yuca: Estrategias para reducir el impacto del cambio climático en Colombia, Costa Rica y Paraguay (en línea). San José, CR. Consultado el 22 de junio del 2014. Disponible en: <http://www.clayucacr.org/docs/ivcongreso/08-cuerosapo.pdf>
- ARISMENDI, N. ANDRADE, N. 2013. DAPI Staining and Fluorescence Microscopy Techniques for Phytoplasmas. In *Phytoplasma: Methods in Molecular Biology*. 2013. Ed(s) Dickinson, N. Hodggets, J. Hertfordshire, UK. Humana Press. 115-121
- ARISMENDI, N. ANDRADE, N. RIEGEL, R. CARRILLO, R. 2010. Presencia de un fitoplasma asociado a la enfermedad de "escoba de bruja" en *Ugni molinae* Turcz. y *Gaultheria phillyreifolia* (pers.) Sleumer determinado mediante

- DAPI, PCR y secuenciación de ADN. Chilean Journal of Agricultural Research. 70(1): 26-33
- APPLIED BIOSYSTEMS. 2010. Real time PCR System: Guía de reactivos (en línea). Consultado el 1 de marzo del 2015. Disponible en http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_053238.pdf
- BRADSHAW, J.E. 2010. Root and tuber crops (en línea). Editorial Springer Science. Nueva York, USA. Consultado el 31 de mayo del 2015. Disponible en http://ezproxy.itcr.ac.cr:2509/static/pdf/911/bok%253A978-0-387-92765-7.pdf?token2=exp=1433115969~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F911%2Fbok%253A978-0-387-92765-7.pdf*~hmac=77283b1ddf9c6c7c57d5b7c30ba9207abd97557b8163e96c4ee64e7057f6e3de
- CABI (CENTRE FOR AGRICULTURAL BIOSCIENCES INTERNATIONAL, EU). 2015. Xanthomonas axonopodis pv. manihotis (cassava bacterial blight) (en línea). Consultado el 22 de marzo del 2015. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/56952>
- CALVERT, L. CUERVO, M. 2002. Enfermedades virales de la yuca en América del Sur. En: La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali, CO. Publicaciones CIAT. 586 p.
- CALVERT, L. CUERVO, M. LOZANO, I. VILLAREAL, N. ARROYAVE, J. 2008. Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava Plants Affected by Frogskin Disease. Journal of Phytopathology. 156(11): 647-653
- CALVERT, L. TRESH, J. 2002. The viruses and virus diseases in Cassava. En: Cassava: Biology, Production and Utilization. Editorial CABI. Nueva York, USA. 332 p.
- CAMARENA, G. DE LA TORRE, R. 2008. Fitoplasmas: Síntomas y características moleculares. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 14(2): 81-87

- CEBALLOS, H. DE LA CRUZ, G. 2002. Taxonomía y morfología de la yuca. En Ospina, B; Ceballos, H. La yuca en el tercer milenio. Sistema moderno de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT .CO. Vol. 327. p. 17-34.
- CHANDRA, S. BANDOPADHYAY, R. KUMAR, V. CHANDRA, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. Biotechnol Lett. Birla Institute of Technology. Mesra, IN. 32:1199-1205.
- CIAT (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, CO). 1982. Descripción de las enfermedades de la yuca. Segunda edición. Cali, CO. 35 pp.
- CORTÁZAR, A. SILVA, E. 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología (en línea). México DF, MX. Consultado el 24 de junio del 2014. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- CUNHA, A. 2002. Cassava Botany and Physiology. Bahía, BR. Consultado el 21 de julio del 2014. Disponible en: http://www.betuco.be/manioc/Cassava%20-%20Botany%20and%20Physiology%20cabi_08ch5.pdf
- DAS, A. MITRA, D. 2004. Detection of brinjal little leaf phytoplasma *in situ* by light and fluorescence microscopy. Indian Phytopathology. 57(2): 242-244
- DAVIS, R. SINCLAIR, W. 1998. Phytoplasma Identity and Disease Etiology. Phytopatology. 88(12): 1372-1376
- DE PRADO. 2010. Eppendorf & Real Time PCR (en línea). Consultado el 24 de junio del 2014. Disponible en: <http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Eppendorf.pdf>
- DE SOUZA, A. DA SILVA, F. BEDENDO, I. CARVALHO, C. 2014. A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. Plant disease. 98(6): 771-779

- DICKINSON, M. TUFFEN, M. HODGGETS, J. 2013. The Phytoplasmas: An introduction. In *Phytoplasma: Methods in Molecular Biology*. 2013. Ed(s) Dickinson, N. Hodggets, J. Hertfordshire, UK. Humana Press. 1-14
- FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, IT). 2013. Save and Grow (en línea). Rome, IT. Consultado el 21 de junio del 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/i3278e/i3278e.pdf>
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics, IT). 2013. Crop of cassava: Area harvested and production quantity (en línea). Rome, IT. Consultado el 21 de junio del 2014. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- FONSECA, D. MATEUS, H. CONTRERAS, N. 2010. *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. Bogotá, CO. Editorial Universidad del Rosario. 68 p.
- HODGETTS, J. BALL, T. BOONHAM, N. MUMFORD, R. DICKINSON, M. 2007. Blackwell Publishing Ltd Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Phytopatology*. 56(1): 357-365
- INEC (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y CENSOS, CR). 2014. Costa Rica: Total de fincas con cultivo de yuca por extensión sembrada y cosecha en hectáreas (en línea). IV Censo Nacional Agropecuario. Consultado el 31 de mayo del 2015. Disponible en <http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx>
- INIA (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA, ES). 2010. XX Curso Internacional Teórico-Práctico de Detección e Identificación de Virus, Viroides y Fitoplasmas. Madrid, ES. 124 p.
- ITIS (INTEGRATED TAXONOMY INFORMATION SYSTEM, US). 2011. *Manihot esculenta* Crantz (en línea). Consultado el 7 de marzo de 2015. Disponible

en

http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503688

JARAUSCH, W. LANSAC, M. SAILLARD, C. BROQUAIRE, J. DOSBA, F. 1998. PCR Assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *European Journal of Plant Pathology*. 104(1): 17-27.

LOZANO, J. BELLOTTI, A. REYES, J. HOWELER, R. LEIHNER, D. DOLL, J. 1981. Problemas en el cultivo de la yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, CO. 208 p.

LOZANO, I. CUERVO, M. MORALES, F. 2008. El “cuero de sapo” o “yacaré” de la yuca (en línea). Consultado el 7 de junio del 2015. Disponible en http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2012/11/2008_11_26_M_Cuervo_I_Lozano_F_Morales.pdf

MAG (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, CR). 1991. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. San José, CR. 560 pp.

MARCONE, C. 2010. Movement of Phytoplasmas and the Development of Disease in the Plant. In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. 2013. Ed(s) Weintraub, P. Jones, P. Oxfordshire, UK. 132-146

MONTERO, M.; CORREA, A.; SIRITUNGA, D. 2011. Molecular differentiation and diversity of cassava (*Manihot esculenta*) taken from 162 locations across Puerto Rico and assessed with microsatellite markers. *AOB PLANTS*. PLR 010: 1-13.

MONTERO, W. 2001. Estudio morfogénico e histológico de la *Echinacea purpurea* *in vitro*. Tesis Bch. Cartago, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 72 p.

MOREIRA, L. VILLALOBOS, W. SABORÍO, G. GARITA, L. CASTRO, S. ROMERO, J. RAMÍREZ, P. RIVERA, C. 2010. A phytoplasma associated

- with 'amachamiento' disease of dry common bean in Costa Rica. *Phytopatology*. 59(2): 398
- MUSETTI, R. 2013. Biochemical changes in Plants Infected by Phytoplasmas. In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. 2013. Ed(s) Weintraub, P. Jones, P. Oxfordshire, UK. 132-146
- MUSETTI, R. FAVALI, M. 2004. Microscopy Techniques Applied to the Study of Phytoplasma Diseases: Traditional and Innovative Methods (en línea). IT. Consultado el 25 de junio del 2014. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/239522613_Microscopy_Techniques_Applied_to_the_Study_of_Phytoplasma_Diseases_Traditional_and_Innovative_Methods
- NCBI (NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION, US). 2013. Cassava frogskin disease phytoplasma strain CR6.6 16s ribosomal RNA gene, partial sequence (en línea). Consultado el 28 de marzo del 2015. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/484476887>
- NEJAT, N. VADAMALAI, G. 2013. Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 120 (1): 16-25
- OSPINA, B. CEBALLOS, H. 2002. La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali, CO. Publicaciones CIAT. 586 p.
- PARDO, J. 2013. Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca. Tesis M. Sc. Palmira, CO. Universidad Nacional de Colombia. 114 p.
- PASSARGE, E. 2009. Genética: texto y atlas. Tercera Edición. Stuttgart, DE. Editorial Panamericana. 474 p.

- PERILLA, L. 2013. Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (hemíptera: Auchenorrhyncha) de Bogotá D.C. Tesis M.Sc. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 156 pp.
- PIERCE, B. 2009. Genética: un enfoque conceptual. Tercera Edición. Nueva York, US. Editorial Panamericana. 832 p.
- PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica, CR). 2013. Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica 2012 (en línea). San José, CR. Consultado el 22 de junio del 2014. Disponible en: http://www.procomer.com/contenido/descargables/estadisticas/libro_estadistica2012_v1-web.pdf
- RODRÍGUEZ, M. RODRÍGUEZ, W. 2006. PCR en Tiempo Real (en línea). Consultado el 22 de junio del 2015. Disponible en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
- SCOTT, G. ROSEGRANT, M. RINGLER, C. 2000. Raíces y tubérculos para el siglo 21: Tendencias, proyecciones y opciones de política (en línea). Washington D.C. US. Consultado el 15 de mayo del 2015. Disponible en: <http://www.ifpri.org/sites/default/files/publications/s-dp31.pdf>
- TAMAY, L. IBARRA, C. VELASQUILLO, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Tecnología en Salud. 2(2): 70-78
- TOMLINSON, J. BOONHAM, N. DICKINSON, M. 2010. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. Plant Pathology. 59(1): 465-471
- TORRES, S. 2013. Diagnóstico de las principales plagas (Cochinilla y Cuero Sapo) que afectan la producción de yuca (en línea). San Carlos, CR. Consultado el 22 de junio del 2014. Disponible en:

http://bibliodigital.itcr.ac.cr/xmlui/bitstream/handle/2238/3199/diagnostico_principales_plagas_cochinilla_cuero_sapo.pdf?sequence=1

VAN DEN MOOTER, M. MARAITE, H. MEIRESONNE, L. SWINGS, J. GILLIS, M. KERSTERS, K. DE LEY, J. 1987. Comparison between *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (ISPP list 1980) and *X. campestris* pv. *cassavae* (ISPP list 1980) by means of phenotypic, protein electrophoretic, DNA hybridization and phytopathological techniques (en línea). Consultado el 22 de marzo del 2014. Disponible en: <http://mic.sgmjournals.org/content/133/1/57.full.pdf+html>

WIENRAUB, P. JONES, P. 2010. Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. *Plant Pathology*. 59(1): 1177-1178

ZOTYEN, C. 2002. Cultivo de la yuca (en línea). San Salvador, SV. Consultado el 31 de mayo del 2015. Disponible en: http://www.cadenahortofruticola.org/admin/bibli/415compendio_cultivo_yuca.pdf

