

CARACTERIZACIÓN DE ADN DE CLONES DE PAPA E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLASMAS ASOCIADOS AL SÍNDROME DE LA PUNTA MORADA

CHARACTERIZATION OF DNA OF POTATO CLONES AND IDENTIFICATION OF PHYTOPLASMS ASSOCIATED WITH PURPLE TOP SYNDROME

Norma M. Alarcón-Rodríguez, Héctor Lozoya-Saldaña, Ernestina Valadez-Moctezuma*

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México, 56230, México.
(lozoya@correo.chapingo.mx) (evaladez@correo.chapingo.mx).

RESUMEN

En muchas áreas sembradas con papa en México se manifiesta el síndrome de la punta morada, que reduce el rendimiento y la calidad del tubérculo. Un factor principal de este síndrome es la presencia de fitoplasmas y el inadecuado manejo de su insecto vector. Una opción para controlar esta enfermedad es generar genotipos de papa resistentes y un diagnóstico oportuno para evitar su diseminación. Por ello los objetivos de este trabajo fueron detectar fitoplasmas asociados a la punta morada presentes en clones de papa asintomáticos, pero que estuvieron expuestos a la misma por cuatro ciclos, e identificar la relación hospedero-patógeno. Al final del ciclo de cultivo del 2005, fueron recolectadas hojas de 18 clones de papa sin síntomas, en Toluca, Estado de México, originarios de dos programas de mejoramiento genético del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA/ARS). Además fueron incluidos el cultivar Alpha con síntomas de la enfermedad como testigo positivo y plantas libres del fitoplasma. La detección del patógeno se hizo con PCR directa, PCR anidada y marcadores RFLP, usando las enzimas *Alu 1*, *Hinf 1*, *Kpn 1*, *Eco R1*, *Tru 9*, *Taq 1*, e identificando la presencia de tres grupos de fitoplasma en todos los clones. Los clones fueron agrupados en tres grupos relacionados con el testigo positivo, usando cinco iniciadores de marcadores RAPDs. Fue detectada una limitada relación específica hospedero-patógeno en función de las huellas de ADN de ambos.

Palabras clave: Punta morada, resistencia genética, RAPDs, RFLP.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de la punta morada es una de las principales enfermedades limitantes de la producción en el cultivo de la papa en México, reduciendo el rendimiento 30 a 95 %, así como la calidad del tubérculo (Cadena *et al.*, 2003). El síndrome incluye la disminución en el crecimiento,

ABSTRACT

In many potato growing areas in México, there is presence of purple top syndrome, which reduces the yield and quality of this tuber. A main factor of this syndrome is the presence of phytoplasmas and inadequate management of its insect vector. One option for controlling this disease is to generate resistant potato genotypes and early diagnosis to prevent its dissemination. Therefore, the objectives of the present study were to detect phytoplasmas associated with purple top present in asymptomatic potato clones, but which were exposed to the disease for four seasons, and to identify the host-pathogen relationship. At the end of the 2005 growing season, leaves of 18 asymptomatic potato clones, in Toluca, State of México, were collected, originating from two breeding programs of the United States Department of Agriculture (USDA/ARS). Also included were the Alpha cultivar with symptoms of the disease as positive control and plants free of phytoplasma. The detection of the pathogen was made with direct PCR, nested PCR and RFLP markers, using the enzymes *Alu 1*, *Hinf 1*, *Kpn 1*, *Eco R1*, *Tru 9*, *Taq 1*, and identifying the presence of three groups of phytoplasma in all of the clones. The clones were clustered in three groups related to the positive control, using five primers of RAPDs markers. A limited specific host-pathogen relationship was detected as a function of the DNA fingerprints of both host and pathogen.

Key words: Purple top, genetic resistance, RAPDs, RFLP.

INTRODUCTION

Purple top syndrome is one of the principal diseases which limit the production of the potato crop in México, reducing yield by 30 to 90 %, as well as the quality of the tuber (Cadena *et al.*, 2003). The syndrome includes the reduction in growth, apical leaf roll and purple coloration in the leaflets; the damaged tubers present a darkening of the pulp, which drastically reduces its quality and use as seed (Cadena *et al.*, 2003). Among the causal agents of highest incidence is a phytoplasma associated with the Western aster yellows of Group I, based on the international classification of phytoplasmas

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Febrero, 2008. Aprobado: Marzo, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 357-370. 2009.

enrollamiento apical y coloración purpúrea en los foliolos; los tubérculos dañados muestran un oscurecimiento de la pulpa, lo cual demerita drásticamente su calidad y uso como semilla (Cadena *et al.*, 2003). Entre los agentes causales de mayor incidencia está un fitoplasma asociado con el Western aster yellows del Grupo I, con base en la clasificación internacional de fitoplasmas (Leyva *et al.*, 2002; Salazar, 1997; Munyaneza *et al.*, 2005) y a su vector (*Bactericera cockerelli*), aunque hay virus (PVY, PVX, PLRV) y hongos (*Fusarium* sp.) asociados al síndrome de la punta morada (Jensen *et al.*, 2004). En el valle de Toluca se desarrollan programas de selección de clones de papa con cierta resistencia a la enfermedad, pero se desconoce si ésta se debe a fitoplasmas porque no han sido identificados en el campo experimental. Los fitoplasmas en las plantas presentan títulos muy bajos y su distribución en el hospedante no es uniforme, por lo que su identificación y clasificación requiere usar técnicas moleculares (Levy *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Bertaccini *et al.*, 1996). Sólo las especies silvestres tendrían esta característica de resistencia, pero desafortunadamente no tienen valor comercial. Por ello es importante analizar molecularmente las especies comerciales que presentan cierta resistencia (Cadena, 1993). Por tanto, los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Detectar y caracterizar fitoplasmas asociados a la punta morada presente en clones de papa; 2) tipificar con marcadores moleculares los clones de papa seleccionados durante cuatro ciclos que no manifestaron síntomas; 3) identificar molecularmente si existe relación hospedero-patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Al final del ciclo de cultivo de 2005, justo antes de quemar el follaje, fueron recolectadas muestras foliares de 18 clones de papa que no manifestaron síntomas al síndrome de la punta morada. Estos genotipos fueron generados y proporcionados por el banco nacional de germoplasma de papa, Sturgeon Bay, WI, Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA/ARS) para la evaluación de su resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) en el campo agrícola experimental del Instituto de Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX) en Metepec, Toluca, Estado de México (Cuadro 1). Hubo dos testigos positivos: Follaje del cv. Alpha con síntomas severos de la enfermedad (P+) y amarillamiento letal del cocotero (ALC+), proporcionado por la Dirección General de Sanidad Vegetal, SAGARPA, México. El testigo negativo fue el follaje de papa del cv. Alpha proveniente de minitubérculo sano obtenido en invernadero (P-).

(Leyva *et al.*, 2005; Salazar, 1997; Munyaneza *et al.*, 2005) and its vector (*Bactericera cockerelli*), although there are virus (PVY, PVX, PLRV) and fungi (*Fusarium* sp.) associated with purple top syndrome (Jensen *et al.*, 2004). In the valley of Toluca selection programs are developed of potato clones with certain resistance to the disease, but it is not known if this is due to phytoplasmas, because they have not been identified in the experimental field. Phytoplasmas in plants present very low titles and their distribution in the host is not uniform, thus its identification and classification requires the use of molecular techniques (Levy *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Bertaccini *et al.*, 1996). Only the wild species will have this characteristic of resistance, but unfortunately, they have no commercial value; thus it is important to molecularly analyze the commercial species that present certain resistance (Cadena, 1993). Therefore, the objectives of the present research were: 1) To detect and characterize phytoplasmas associated with purple top present in potato clones; 2) typify with molecular markers the potato clones selected during four seasons which did not manifest symptoms; 3) molecularly identify whether a host-pathogen relationship exists.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

At the end of the 2005 growing season, just before burning the foliage, foliar samples were collected of 18 potato clones that did not manifest symptoms of purple top. These genotypes were generated and provided by the national bank of potato germplasm, Surgeon Bay, WI, U.S. Department of Agriculture (USDA/ARS), for the evaluation of their resistance to late blight (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) in the experimental agricultural field of the Instituto de Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal of the State of México (ICAMEX) in Metepec, Toluca, State of México (Table 1). There were two positive controls: Foliage of cv. Alpha with severe symptoms of the disease (P+) and lethal yellowing of the coconut palm (ALC+) provided by the Dirección General de Sanidad Vegetal, SAGARPA, México. The negative control was the potato foliage of cv. Alpha from healthy minituber obtained from a greenhouse (P-).

Extraction of DNA

To extract the DNA, the method of Stewart and Evis (1993) was used with the following modification: The following were added to the extraction buffer: ascorbic acid 5 mM, sodium metabisulphate at 1 % and RNAasa 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to eliminate polyphenols and RNA.

Cuadro 1. Clones asintomáticos de papa seleccionados para el presente estudio.
Table 1. Asymptomatic potato clones selected for the present study.

Clon	Clave en los geles	Años expuesto	Progenitores
LB 9-21	Clon 9	2°	P00LB5-10 × BANNOCK
LB 4-36	Clon 8	2°	A9095-7 × POR00LB6-1
LB 11-10	Clon 7	2°	P00LB5-13 × A9014-2
LB 99-1	Clon 12	2°	P00LB5-10 × BANNOCK
LB 27-25	Clon 18	2°	P00LB7-9.43 × PA97B3-6
A02327-6	Clon 10	2°	A97011-2LB × A096893-3
A02327-5	Clon 4	2°	A97011-2LB × A096893-3
A02327-66	Clon 6	2°	A97011-2LB × A096893-3
A00419-68	Clon 2	2°	A96764-19 × Stirling
A00419-40	Clon 13	2°	A96764-19 × Stirling
A00419-73	Clon 15	2°	A96764-19 × Stirling
A02499-46	Clon 14	4°	B0767-2 × Lugovskoy
A00499-38	Clon 11	4°	B01575045 × PI 583331
A00535-2	Clon 3	3°	43-43-43 × A96764-19
A02 497-1	Clon 1	2°	B0767-2 × A096 893-3
A02 497-51	Clon 5	2°	B0767-2 × A096 893-3
A01 237-62	Clon 16	3°	A9505-2 × A096 893-3
A01 237-14	Clon 17	3°	A9505-2 × A096 893-3
Alpha c/sintomas	Testigo P+		KRUGER × PREFERENT
Alpha-minis	Testigo P-		KRUGER × PREFERENT
Am. letal cocotero	Testigo +		

Extracción de ADN

Para extraer ADN el método de Stewart y Evia (1993) fue usado con la siguiente modificación: Al amortiguador de extracción se agregó ácido ascórbico 5 mM, metabisulfito de sodio al 1 % y ARNasa 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para eliminar polifenoles y ARN.

PCR-directa

Para detectar los fitoplasmas mediante PCR-D fueron usados los iniciadores P1/P7 (Deng y Hikuri, 1991), R16F2/P7 (Lee *et al.*, 1993; Smart *et al.*, 1996), R16F2/Ayint y P3/P7 (Smart *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998) cuya secuencia se muestra en el Cuadro 2. Las condiciones para la PCR fueron: 100 ng μL^{-1} de ADN de las muestras, 20 moles de cada iniciador, 200 μM de dNTP's, 2

Direct PCR

To detect the phytoplasmas by means of PCR-D the primers P1/P7 were used (Deng and Hikuri, 1991), R16F2/P7 (Lee *et al.*, 1993; Smart *et al.*, 1996), R16F2/Ayint and P3/P7 (Smart *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998), whose sequence is shown in Table 2. The conditions for the PCR were: 100 ng μL^{-1} of DNA of the samples, 20 moles of each primer, 200 μM of dNTP's, 2 mM of MgCl_2 , 1X of Taq buffer and 1U of Taq polymerase enzyme (Promega), adjusting to a final volume of 25 μL with sterile water free of nucleases. The samples were amplified in an automatic thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) with a cycle of initial denaturalization temperature of 94 °C for 2 min; followed by 35 cycles of denaturalization temperature of 94 °C for 1 min, alignment temperature of 60 °C for 2 min,

Cuadro 2. Iniciadores utilizados tanto en la PCR directa como anidada y su ubicación en los genes 16S, 23S rARN y la región intergénica (RI).

Table 2. Primers used in both the direct and nested PCR and their location in genes 16S, 23S rRNA and the intergenic region (IR).

Iniciador	Ubicación	Secuencia de nucleótidos	Referencia
P1 [†]	16S	5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT-3'	Deng y Hikuri, 1991
P7 [†]	23S	5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	Deng y Hikuri, 1991
P3 [†]	16S	5'- GGA TGG ATC ACC TCC TT-3'	Smart <i>et al.</i> , 1996
R16 F2 [¶]	16S	5'- ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3'	Smart <i>et al.</i> , 1996
R16 R2 [¶]	16S	5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'	Smart <i>et al.</i> , 1996
Ayint [§]	RI	5'- TAC AAT TTG CAA GCA AGT TAC-3'	Lee <i>et al.</i> , 1998
R16F2n [†]	16S	5'- GAA ACG ACT AAG ACT GG-3'	Smart <i>et al.</i> , 1996
R2 [†]	16S	5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA CCC G	Lee <i>et al.</i> , 1993
R16mF2 [¶]	16S	5'- CAT GCA AGT CGA ACG GA-3'	Lee <i>et al.</i> , 1993
R16mR1 [¶]	16S	5'- CTT AAC CCC AAT CAT CGA C-3'	Lee <i>et al.</i> , 1993

[†] Sintetizados en Sigma Co; [¶] Sintetizados por Invitrogen; [§] Sintetizados por Gibco BRL.

mM de $MgCl_2$, 1X de amortiguador Taq y 1U de enzima Taq polimerasa (Promega), ajustándose a un volumen final de 25 μL con agua estéril libre de nucleasas. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con un ciclo de temperatura inicial de desnaturalización 94 °C por 2 min; seguido de 35 ciclos de temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 min, temperatura de alineamiento de 60 °C por 2 min, temperatura de polimerización de 72 °C por 3 min, con un ciclo final de temperatura de extensión de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 %, teñidos en solución de bromuro de etidio 0.5 $\mu g mL^{-1}$ y se fotografiaron con un equipo KODAK Digital Science.

PCR-anidada

Los productos obtenidos con la primera amplificación fueron diluidos (1:10 y 1:30) con agua libre de nucleasas y sin diluir se usaron como ADN molde para la segunda amplificación con las condiciones descritas para la PCR-directa, sólo que usando los pares de iniciadores R16mF2/R16mR1, R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee 1996; Lee *et al.*, 1998) y R16F2n/R16R2 (Smart *et al.*, 1996; Cuadro 2), con volumen final de 25 μL . El programa de amplificación fue una temperatura inicial de 94 °C por 2 min y 35 ciclos adicionales con 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1 min de alineamiento a 55 °C; 90 s de polimerización a 72 °C, y una fase de extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos se observaron en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu g mL^{-1}$).

Digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción

Para caracterizar los fragmentos de los fitoplasmas detectados con el par de iniciadores R16F2n/R16R2 (Sigma) en los distintos clones de papa, se digirió el fragmento de 1200 pares de bases (pb) obtenido en la PCR anidada con las enzimas de restricción *Alu* I (Promega), *Eco* R1 (Promega), *Kpn* 1 (Boehringer Mannheim), *Hinf* I (Promega), *Tru* 9 (Promega), *Taq* 1 (Boehringer Mannheim) conforme a las especificaciones del proveedor. Con 1000 ng de ADN se obtuvo un volumen final de reacción de 20 μL . El producto de digestión fue visualizado en geles de acrilamida al 6 % teñidos con nitrato de plata al 0.2 %.

Amplificación del ADN

Para la Amplificación Inespecífica del Polimorfismo de ADN (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) fueron probadas seis series completas de iniciadores, ya que proporcionan gran número de polimorfismos en distintas especies vegetales. Por tanto, fueron seleccionados iniciadores de tres series que para los clones de papa proporcionaron los perfiles más polimórficos: Serie C (iniciador C-09 y C-12); Serie G (iniciador G-02, y G-10); serie K (iniciador K-01 y K-17). Para la reacción fueron usados 20 pmoles de iniciador, 100 ng de ADN y el sistema Taq PCR Core (Quiagen, Alemania) usando 1.5 unidades de la enzima Taq

polymerization temperature of 72 °C for 3 min, with a final cycle of extension temperature of 72 °C for 7 min. The products of PCR were analyzed by electrophoresis in agarose gels at 1.2 %, stained in solution of ethidium bromide 0.5 $\mu g mL^{-1}$ and were photographed with a KODAK Digital Science camera.

Nested PCR

The products obtained with the first amplification were diluted (1:10 and 1:30) with water free of nucleases and without diluting were used as mold DNA for the second amplification with the conditions described for the direct PCR, but using the pairs of primers R16mF2/R16mR1, R16F2/R16R2 (Gundersen and Lee, 1996; Lee *et al.*, 1998) and R16F2n/R16R2 (Smart *et al.*, 1996; Table 2), with final volume of 25 μL . The amplification program was an initial temperature of 94 °C for 2 min and 35 additional cycles with 1 min of denaturalization at 94 °C; 1 min of alignment at 55 °C; 90 s of polymerization at 72 °C, and a final extension phase at 72 °C for 7 min. The products were observed in agarose gels at 1.2 % stained with ethidium bromide (0.5 $\mu g mL^{-1}$).

Digestion of the products of PCR with restriction enzymes

To characterize the fragments of the phytoplasmas detected with the pair of primers R16F2n/R16R2 (Sigma) in the different potato clones, the fragment of 1200 pairs of bases (pb) obtained in the nested PCR was digested with the restriction enzymes *Alu* 1 (Promega), *Eco* R1 (Promega), *Kpn* 1 (Boehringer Mannheim), *Hinf* 1 (Promega), *Tru* 9 (Promega), *Taq* 1 (Boehringer Mannheim) according to the specifications of the supplier. With 1000 ng of DNA, a final volume of reaction of 20 μL was obtained. The product of digestion was visualized in acrylamide gels at 6 % stained with silver nitrate at 0.2 %.

Amplification of the DNA

For the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), six complete series of primers were tested, given that they provide a great number of polymorphisms in different plant species. Therefore, primers of three series were selected which for the potato clones provided the most polymorphic profiles: Series C (primer C-09 and C-12); Series G (primer G-02, and G-10); series K (primer K-01 and K-17). For the reaction 20 pmoles of primer were employed, along with 100 ng of DNA and the Taq PCR Core system (Quiagen, Germany), using 1.5 units of the enzyme Taq polymerase, 200 μM of dNTPs, 25 mM of $MgCl_2$, buffer for enzyme at a concentration of 1X and 5 μL of solution Q; the final volume of reaction was 25 μL . They were placed in a thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) with a cycle at 94 °C for 1 min; 35 cycles at 94 °C (temperature of denaturalization) for 30 s, 40 °C of alignment for 30 s and 72 °C (elongation temperature) for 90 s, and a final extension of a cycle of 72 °C for 150 s. The products of amplification were visualized in agarose gels at 1.2 % stained with

polimerasa, 200 μM de dNTPs, 25 mM de MgCl_2 , amortiguador para enzima a una concentración 1X y 5 μL de solución Q; el volumen final de reacción fue 25 μL . Fueron colocados en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con un ciclo a 94 °C por 1 min; 35 ciclos de 94 °C (temperatura de desnaturalización) por 30 s, 40 °C de alineamiento por 30 s y 72 °C (temperatura de elongación) por 90 s, y una extensión final de un ciclo de 72 °C por 150 s. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y en geles al 6 % de acrilamida teñidos con nitrato de plata al 0.2 %.

Análisis de resultados

Con los fragmentos amplificados de las combinaciones de iniciadores de PCR, productos de la digestión con enzimas de restricción y con el uso de iniciadores RAPDs fueron elaborados matrices binarias de datos, agrupándose los fitoplasmas con el método UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard en el programa estadístico NTSYS 2.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PCR directa

No fue detectado ningún fragmento con los iniciadores P1/P7 en las muestras de ADN de papa, aunque sí en el testigo positivo para el amarillamiento letal del cocotero con una banda de 1800 pb (Cuadro 3). Esto podría deberse a que el fitoplasma se encontraba en título muy bajo por lo que con PCR directa no se presentó amplificación (Gundersen *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1997). El par de iniciadores R16F2/P7 amplificó un fragmento de 1200 pb en 12 de los 18 clones, así como en los dos testigos positivos de coco y papa (Cuadro 3; Figura 1A). Esto corresponde al gen 16S rADN reportado por Lee *et al.* (1993). Con el par de iniciadores P3/P7 se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 pb en todas las muestras (Cuadro 3; Figura 1B). Estos iniciadores abarcan la región entre los genes 16S y 23S del rADN que a pesar de ser una región específica para los fitoplasmas, presenta una gran variabilidad, situación usada para la separación de grupos (Smart *et al.*, 1996). Al usar los iniciadores R16F2/Ayint se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 900 pb en 10 muestras (Cuadro 3), observándose amplificaciones inespecíficas de menor peso molecular donde el fragmento del testigo positivo fue de menor tamaño (Figura 1C). Smart *et al.* (1996) señalan que con el par de iniciadores P1/Ayint se detectan fitoplasmas correspondientes al grupo del Amarillamiento del aster, pero en el presente trabajo se reemplazó al P1 por R16F2 ya que éste indujo amplificación en todas las

ethidium bromide ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and in gels at 6 % of acrylamide stained with silver nitrate at 0.2 %.

Analysis of results

With the amplified fragments of the combinations of primers of PCR, products of digestion with restriction enzymes and with the use of primers RAPDs, binary matrices of data were made, grouping the phytoplasmas with the UPGMA method and the similarity coefficient of Jaccard in the statistical program NTSYS 2.2.

RESULTS AND DISCUSSION

Direct PCR

No fragment was detected with the primers P1/P7 in the samples of potato DNA, although they were detected in the positive control for the lethal yellowing of coconut palm with a band of 1800 pb (Table 3). This could be due to the fact that the phytoplasma was found in very low title, thus with direct PCR there was no amplification (Gundersen *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1997). The pair of primers R16F2/P7 amplified a fragment of 1200 pb in 12 of the 18 clones, as well as in the two positive controls of coconut and potato (Table 3; Figure 1A). This corresponds to the gene 16S rDNA reported by Lee *et al.* (1993). With the pair of primers P3/P7, amplification of a fragment of approximately 350 pb was achieved in all of the samples (Table 3; Figure 1B). These primers cover the region between the genes 16S and 23S of the rDNA, which in spite of being a specific region for the phytoplasmas, presents a great variability, situation used for the separation of groups (Smart *et al.*, 1996). When the primers R16F2/Ayint were used, a fragment of approximately 900 pb was amplified in 10 samples (Table 3), observing random amplifications of lower molecular weight where the fragment of the positive control was of smaller size (Figure 1C). Smart *et al.* (1996) point out that with the pair of primers P1/Ayint, phytoplasmas corresponding to the group of Aster yellow are detected, but in the present work P1 was replaced by R16F2, given that the latter induced amplification in all of the combinations used, although the fragment obtained was smaller because the primer R16F2 is found deeper inside the gene 16S (Gundersen and Lee, 1996; Lee *et al.*, 1998) in reference to P1.

Nested PCR

For the nested PCR with amplifications of different fragments, three pairs of primers were used for each case (Table 3; Figure 1D, E, F). With primers R16mF2/

Cuadro 3. Amplificaciones obtenidas con los diferentes iniciadores.
Table 3. Amplifications obtained with the different primers.

Clon	PCR directa				PCR-anidada		
	P1/P7 1800 pb	R16F2/P7 1400 pb	P3/P7 350 pb	R16F2/Ayint 900 pb	R16mF2/R16mR1 1400 pb	R16F2/R16R2 1200 pb	R16F2n/R16R2 1200pb
A02497-1	—	+	+	+	+	—	+
A00419-68	—	—	+	—	—	+	+
A00535-2	—	+	+	+	+	+	+
A02327-5	—	—	+	—	+	—	+
A02497-51	—	+	+	—	+	—	+
A02327-66	—	—	+	—	+	—	+
LB-11-10	—	—	+	—	—	+	+
LB-4-36	—	—	+	—	—	—	+
LB-9-21	—	+	+	+	+	—	+
A02327-6	—	+	+	+	+	—	+
A00499-38	—	—	+	—	—	—	+
LB-99-1	—	+	+	+	—	—	+
A00419-40	—	+	+	—	—	—	+
A02499-46	—	+	+	—	+	+	+
A00419-73	—	+	+	+	+	—	+
A01237-62	—	+	+	+	+	+	+
A01237-14	—	+	+	+	+	—	+
LB-27-25	—	+	+	+	+	+	+
P+	—	+	+	+	+	+	+
ALC+	+	+	+	+	+	+	+
P—	—	—	—	—	—	—	—

+ Sí se presentó amplificación del fragmento esperado; — No se presentó amplificación del fragmento esperado; A+, Testigo positivo, cv. Alpha enferma con síntomas de punta morada; ALC+, Testigo positivo a Amarillamiento Letal del cocotero; A—, Testigo negativo, cv. Alpha, minitubérculo de invernadero.

combinaciones empleadas, aunque el fragmento obtenido fue más pequeño debido a que el iniciador R16F2 se encuentra más al interior del gen 16S (Gundersen y Lee, 1996; Lee *et al.*, 1998) en referencia con P1.

PCR-anidada

Para la PCR anidada con amplificaciones de distintos fragmentos fueron usados tres pares de iniciadores para cada caso (Cuadro 3; Figura 1D, E, F). Con los iniciadores R16mF2/R16mR1 se obtuvieron 14 muestras positivas de las 21 analizadas y el fragmento amplificado fue 1400 pb (Cuadro 3; Figura 1D), como lo refieren Gundersen y Lee (1996). Estos resultados muestran coincidencia con la PCR directa (10 de las 14 muestras). El testigo positivo (ALC+) amplificó un fragmento de 1200 pb, coincidiendo con lo obtenido en la PCR directa. Con el par de iniciadores R16F2/R16R2 se amplificó un fragmento de 1200 pb en ocho muestras, cinco de las cuales coinciden con el par ya descrito y con la PCR directa (Cuadro 1; Figura 1E). Hubo amplificación inespecífica de un fragmento de menor tamaño que, según Almeyda *et al.* (2001), se puede atribuir a la formación de dímeros durante la amplificación. Con el par de iniciadores R16F2n/R16R2 se presentó la

R16mR1, 14 positive samples were obtained from the 21 analyzed, and the amplified fragment was 1400pb (Table 3; Figure 1D), as referred to by Gundersen and Lee (1996). These results show coincidence with the direct PCR (10 of the 14 samples). The positive control (ALC+) amplified a fragment of 1200 pb, coinciding with what was obtained in the direct PCR. With the pair of primers R16F2/R16R2, a fragment of 1200 pb was amplified in eight samples, five of which coincide with the previously described pair and with the direct PCR (Table 1; Figure 1E). There was random amplification of a fragment of smaller size, which according to Almeyda *et al.* (2001), can be attributed to the formation of dimers during amplification. With the pair of primers R16F2/R16R2 a fragment of 1200 pb was amplified in eight samples, five of which coincide with the previously mentioned pair and with the direct PCR (Table 1; Figure 1E). There was random amplification of a smaller fragment which, according to Almeyda *et al.* (2001), can be attributed to the formation of dimers during amplification. With the pair of primers R16F2n/R16R2 the amplification of the expected fragment appeared of approximately 1250 pb in the clones, coinciding with the same size of fragment in the positive controls. In most of the samples the band is defined and thick, except in three

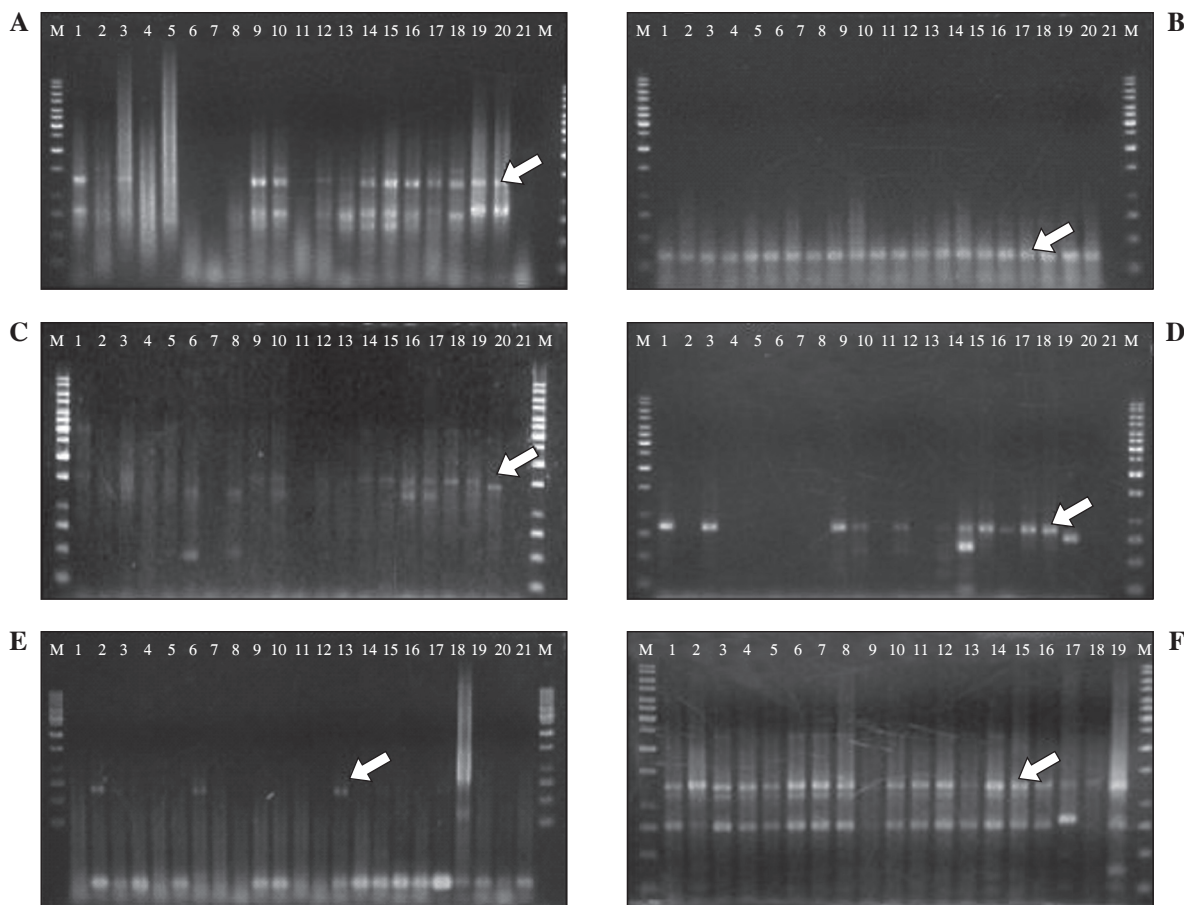


Figura 1. Productos de amplificaciones de PCR. Carriles 1-18 clones asintomáticos de papa; carril 19, cv. Alpha con síntomas; carril 20, testigo positivo del amarillamiento letal del cocotero y carril 21 cv. Alpha sana. A, PCR directa con los iniciadores R16F2/P7. B, iniciadores P3/P7. C, iniciadores R16F2/Ayint. D, PCR anidada con los iniciadores R16mF2/R16mR1. E, iniciadores R16F2/R16R2. F, con el par de iniciadores R16F2n/R16R2. M, marcador de 1 kb (Fermentas).

Figure 1. Products of amplifications of PCR. Rows 1-18 asymptomatic potato clones; row 19, cv. Alpha with symptoms; row 20, positive control of lethal yellowing of coconut palm and row 21 healthy cv. Alpha. A, direct PCR with the primers R16F2/P7. B, primers P3/P7. C, primers R16F2/Ayint. D, nested PCR with primers R16mF2/R16mR1. E, primers R16F2/R16R2. F, with the pair of primers R16F2n/R16R2. M, marker of 1 kb (Fermentas).

amplificación del fragmento esperado de aproximadamente 1250 pb en los clones, coincidiendo con el mismo tamaño de fragmento en los testigos positivos. En la mayoría de las muestras se aprecia la banda definida y gruesa salvo en tres muestras con banda tenue (Cuadro 3; Figura 1F), lo que indica una concentración menor del fitoplasma (Davis *et al.*, 1997; Davis y Sinclair 1998; Lee *et al.*, 2000). Este fragmento estuvo acompañado por dos bandas, una con un peso de 1100 pb y otra alrededor de 750 pb, cuya presencia pudiera deberse a la posibilidad de inestabilidad o formación de dímeros que no se pueden alinear al realizar la PCR (Almeyda *et al.*, 2001). Los iniciadores R16F2n/R16R2 facilitan la detección de fitoplasmas en bajas concentraciones, debido a que amplifican una región conservada del gen 16S rRNA

samples with a light band (Table 3; Figure 1F), which indicates a lower concentration of phytoplasma (Davis *et al.*, 1997; Davis and Sinclair, 1998; Lee *et al.*, 2000). This fragment was accompanied by two bands, one with a weight of 1100 pb and another of around 750 pb, whose presence could be due to the possibility of instability or formation of dimers that can not be aligned when the PCR is made (Almeyda *et al.*, 2001). The primers R16F2n/R16R2 facilitate the detection of phytoplasmas in low concentrations, because they amplify a conserved region of the gene 16S rRNA (Lee *et al.*, 1993). This is confirmed by comparing these results with those obtained with the other pairs of primers included in the present study, for although they were amplified with the same dilution, they did not give the same results.

(Lee *et al.*, 1993). Esto es confirmado al compararlos con los resultados obtenidos con los otros pares de iniciadores incluidos en este estudio, pues aunque fueron amplificados con la misma dilución no dieron los mismos resultados.

Digestión con enzimas de restricción

Los patrones de restricción generados del fragmento de 1200 pb obtenido en la PCR anidada con los R16F2n/R16R2 fueron uniformes para la mayoría de las muestras con la enzima *Tru* 9. Se presentó una banda de 120 pb en todas las muestras, y otra de 250 pb en la mayoría. Además, el microorganismo proveniente del clon A02497-1 (muestra 1) presentó una banda de aproximadamente 310 pb y A00419-68 (muestra 2) una de 260 pb (Figura 2A). La enzima *Taq* 1 generó sólo una banda de 400 pb aproximadamente, por lo que se considera que no hubo digestión del ADN (Figura 2B). Con la enzima *Hinf* 1 se presentaron tres bandas en los microorganismos de los clones 3, 4, 5 y 7 (ver la identificación de los clones en el Cuadro 1). Otra banda de 280 pb se presentó en la mayoría

Digestion with restriction enzymes

The restriction patterns generated from the fragment of 1200 pb obtained in the nested PCR with R16F2n/R16R2 were uniform for most of the samples with the enzyme *Tru* 9. There was a band of 120 pb in all of the samples, and another of 250 pb in most of the samples. Furthermore, the microorganism from clone A02497-1 (sample 1) presented a band of approximately 310 pb and A00419-68 (sample 2) one of 260 pb (Figure 2A). The enzyme *Taq* 1 generated only a band of approximately 400 pb, thus it is considered that there was no digestion of the DNA (Figure 2B). With the enzyme *Hinf* 1, three bands appeared in the microorganisms of the clones 3, 4, 5 and 7 (see the identification of the clones in Table 1). Another band of 280 pb appeared in most of the phytoplasmas except in the one from clone A02497-1, and a third band of 320 pb was observed in most of the phytoplasmas, except in the microorganisms of clones 1, 8 and 10 (Figure 2C). The digestion pattern with the enzyme *Kpn* I was the same for all of the samples, three bands: one of 550 pb, the second of

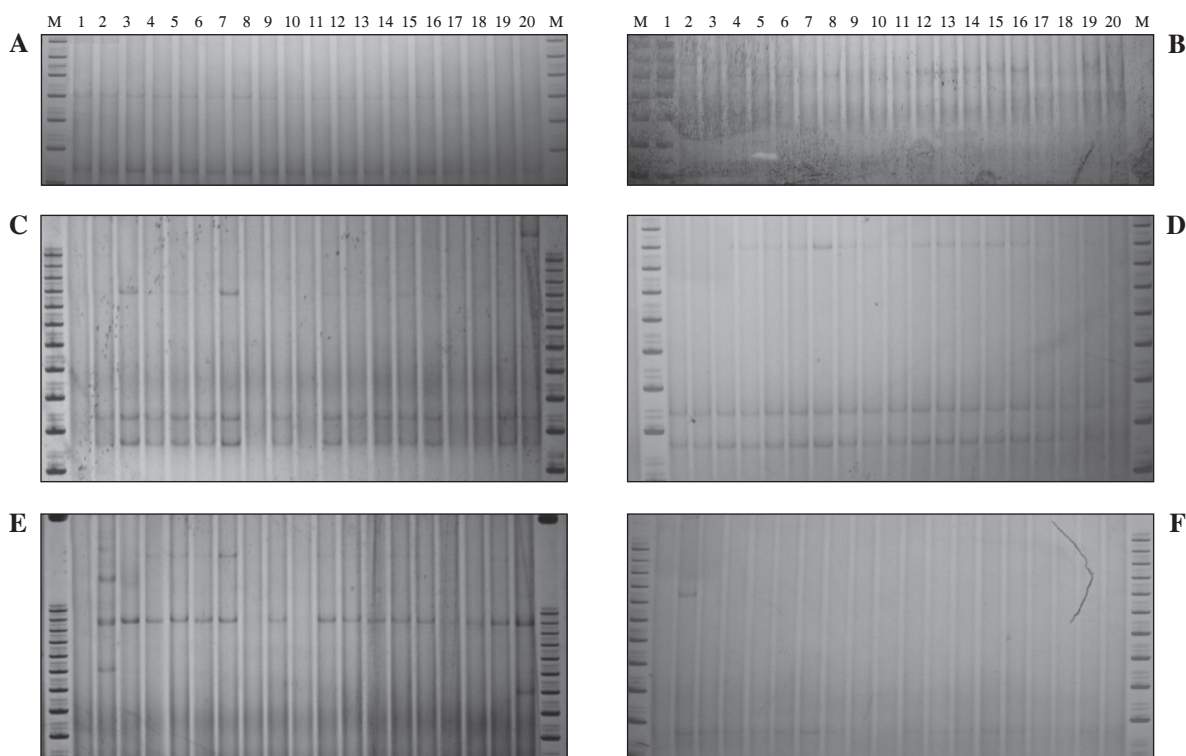


Figura 2. Digestión con enzimas de restricción (RFLP) de productos de PCR anidada con iniciadores R16F2n/R16R2. A, *Tru* 9. B, *Taq* 1. C, *Hinf* 1. D, *Kpn* 1. E, *Eco* R1. F, *Alu* 1. M, marcador, 50 pb, (Promega). Los números corresponden a las muestras tomadas de los clones identificados en el Cuadro 1.

Figure 2. Digestion with restriction enzymes (RFLP) of products of nested PCR with primers R16F2n/R16R2. A, *Tru* 9. B, *Taq* 1. C, *Hinf* 1. D, *Kpn* 1. E, *Eco* R1. F, *Alu* 1. M, marker, 50 pb, (Promega). The numbers correspond to the samples taken from the clones identified in Table 1.

de los fitoplasmas excepto en el proveniente del clon A02497-1 y se observó una tercera banda de 320 pb en la mayoría, salvo en los microorganismos de los clones 1, 8 y 10 (Figura 2C). El patrón de digestión con la enzima *Kpn* I fue el mismo para todas las muestras, tres bandas: una de 550 pb, la segunda de 270 pb y la tercera de 240 pb (Figura 2D). Con la enzima *Eco* R1 hubo un patrón variado. El clon A00419-68 (muestra 1) tuvo una banda de 500 pb y otra de 700 pb aproximadamente; los provenientes de los clones 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14 y 15 mostraron otro patrón de dos bandas (una de 780 pb y otra de 700 pb) mientras que los de los clones 1, 8, 10 no presentaron bandas (Figura 2E). Por último, la enzima *Alu* I originó un fragmento de 230 pb aproximadamente y en el fitoplasma del clon 2 se presentó una banda de 520 pb (Figura 2F). La amplificación se repitió tres veces para cada muestra, luego las muestras fueron colocadas en geles, realizando cuatro repeticiones de cada gel. Seemüller *et al.* (1998) reportaron que la secuenciación del gen 16S RNAr proporciona datos más precisos que los obtenidos por patrones de restricción. Sin embargo, el hecho de tener diferencias de uno o varios nucleótidos no implica necesariamente que estos estén codificando para aminoácidos diferentes y probablemente no se trate de grupos diferentes; por tanto, estos autores concluyen que es válido el agrupamiento por análisis de enzimas de restricción. Al comparar los patrones de restricción obtenidos en este trabajo con los obtenidos para PPT (Potato Purple Top o punta morada de la papa, Leyva *et al.*, 2002) se observa una similitud en los patrones de las enzimas *Alu* I y *Kpn* I. Por tanto, los fitoplasmas encontrados se asocian con el PPT perteneciente al grupo I del Aster Yellow (Leyva *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998), lo cual concuerda con lo reportado por Almeyda *et al.* (2001) usando las enzimas *Alu* I y *Eco* R1.

Coefficiente de similitud

La amplificación de la secuencia 16S rDNA mediante PCR anidada y el análisis de los patrones de restricción con seis enzimas, caracterizaron y diferenciaron a los fitoplasmas en tres grupos con un coeficiente de similitud de 0.7. El grupo A contiene las muestras positivas con el mayor número de iniciadores y en este grupo están los testigos positivos de papa y de cocotero, aunque con cierto distanciamiento entre ellos. De hecho, la muestra positiva de coco fue la más distante al resto del grupo (Figura 3), lo cual se debe a que el amarillamiento del cocotero está ubicado en el grupo IV del Amarillamiento del aster (Davis y Sinclair, 1998; Lee *et al.*, 1998), diferentes de los fitoplasmas reportados por Leyva *et al.*

270 pb and the third of 240 pb (Figure 2D). With the enzyme *Eco* R1 there was a varied pattern. Clone A00419-68 (sample 1) had a band of 500 pb and another of approximately 700 pb; those from clones 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14 and 15 presented another pattern of two bands (one of 780 pb and another of 700 pb), while those from clones 1, 8 and 10 did not present bands (Figure 2E). Finally, the enzyme *Alu* I originated a fragment of approximately 230 pb and in the phytoplasm of clone 2 a band of 520 pb appeared (Figure 2F). The amplification was repeated three times for each sample, then the samples were placed in gels, making four replicates of each gel. Seemüller *et al.* (1998) reported that the sequencing of the gene 16S RNAr provided more precise data than those obtained by restriction patterns. However, the fact of having differences of one or various nucleotides does not necessarily imply that they are codifying for different aminoacids and probably does not imply different groups. Therefore, these authors conclude that the grouping by analysis of restriction enzymes is valid. When comparing the restriction patterns obtained in the present work with those obtained for PPT (Potato Purple Top, Leyva *et al.*, 2002), a similarity was observed in the patterns of the enzymes *Alu* I and *Kpn* I. Therefore, the phytoplasmas found are associated with the PPT pertaining to group I of Aster Yellow (Leyva *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998), which agrees with what was reported by Almeyda *et al.* (2001) using the enzymes *Alu* I and *Eco* R1.

Coefficient of similarity

The amplification of the sequence 16S rDNA through nested PCR and the analysis of the restriction patterns with six enzymes, characterized and differentiated the phytoplasmas in three groups with a coefficient of similarity of 0.7. Group A contains the positive samples with the highest number of primers, and this group includes the positive controls of potato and coconut palm, although with certain distancing between the two. In fact, the positive sample of coconut was the most distant from the rest of the group (Figure 3), which is due to the fact that the yellowing of the coconut is located in group IV of Aster yellow (Davis and Sinclair, 1998; Lee *et al.*, 1998), different from the phytoplasmas reported by Leyva *et al.* (2002) for potato. Groups B and C include the samples with lowest amplifications. When this diagram is compared with the information of Table 1, it is observed that there was no coincidence among the groups and the parents or genotypes of the hosts from which the phytoplasmas were isolated. The similarity

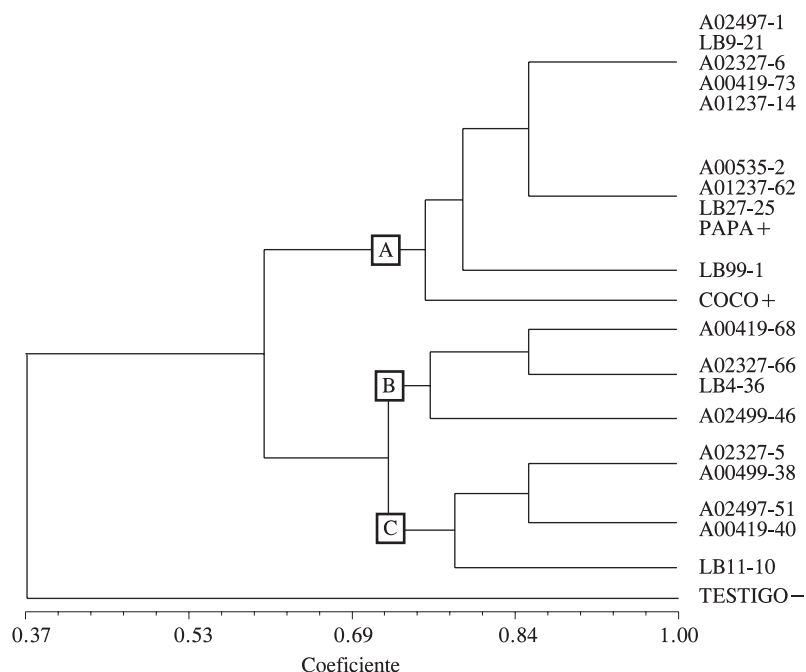


Figura 3. Agrupamiento de los fitoplasmas de acuerdo con el análisis estadístico de los fragmentos amplificados con los diferentes iniciadores. Método UPGMA y el coeficiente de similitud Jaccard en el programa estadístico NTSYS 2.2.

Figure 3. Grouping of the phytoplasmas according to the statistical analysis of the fragments amplified with the different primers. UPGMA method and the Jaccard coefficient of similarity in the statistical program NTSYS 2.2.

(2002) para papa. Los grupos B y C incluyen a las muestras con menores amplificaciones. Al comparar este diagrama con la información del Cuadro 1 se observa que no hubo coincidencia entre los agrupamientos y los progenitores o genotipos de los hospedantes de los cuales fueron aislados los fitoplasmas. La similitud en la formación de grupos con la PCR directa, la PCR anidada y los patrones generados por las enzimas de restricción dan validez al análisis de RFLP para la caracterización y diferenciación a nivel de grupos (Lee *et al.*, 1998). Por tanto, los resultados del presente trabajo se asocian con lo reportado para fitoplasmas en México (Cadena, 1993; Leyva *et al.*, 2002).

La separación en grupos muestra que la presencia del fitoplasma sí determinó la asociación. El uso del coeficiente de asociación de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973) eliminó la consideración de las dobles ausencias como motivo de similitud que frecuentemente conduce a errores, ya que pueden ser ausencias no homólogas, es decir es un coeficiente de asociación que omite los valores de ausencia (Johnson, 2000). De esta manera el resultado es menos afectado por bandas erráticas (Moreno, 2001). En un estudio de especies diploides y morfológicamente muy similares del género *Solanum*, Spooner *et al.* (1996) calcularon que 650 es el número mínimo de bandas requeridas para establecer relaciones genéticas precisas a nivel intraespecífico. En el presente estudio no se pudo delimitar las bandas que correspondían a esta característica en cada iniciador usado. Las plantas infectadas de las asintomáticas y con síntomas fueron diferenciadas

in the formation of groups with direct PCR, nested PCR and the patterns generated by the restriction enzymes give validity to the analysis of RFLP for the characterization and differentiation at the group level (Lee *et al.*, 1998). Therefore, the results of the present study are associated with what was reported for phytoplasmas in México (Cadena, 1993; Leyva *et al.*, 2002).

The separation into groups shows that the presence of the phytoplasma did determine the association. The use of the coefficient of association of Jaccard (Sneath and Sokal, 1973) eliminated the consideration of the double absences as motive of similarity which frequently leads to errors, given that they can be non-homologous absences, that is, a coefficient of association that limits the values of absence (Johnson, 2000). In this way the result is less affected by erratic bands (Moreno, 2001). In a study of diploid species and morphologically very similar of the genus *Solanum*, Spooner *et al.* (1996) calculated that 650 is the minimum number of bands required to establish precise genetic relationships at the intraspecific level. In the present study it was not possible to delimit the bands that corresponded to this characteristic in each primer used. The infected plants of the asymptomatic plants and those with symptoms were differentiated with respect to the positive and negative controls. The analysis of the results suggests the search for or the use as parents of these materials as possible sources of resistance to the disease, which agrees with Jansky and Rouse (2003), who affirm that the wild species are the source of genes of resistance to multiple diseases.

respecto a los testigos positivo y negativo. El análisis de los resultados sugiere la búsqueda o el uso como progenitores de estos materiales como posibles fuentes de resistencia hacia la enfermedad, lo que concuerda con Jansky y Rouse (2003) quienes afirman que las especies silvestres son la fuente de genes de resistencia a múltiples enfermedades.

Amplificación del ADN (RAPDs)

Con base en el número de fragmentos amplificados en el ADN de las distintas muestras de plantas de papa, fue generado un dendrograma (Figura 4) conformado por tres grupos. El grupo A fue dividido en dos grupos homogéneos; en uno fueron ubicados los clones A00535-2, A00499-38 y A02499-462, sin progenitores comunes entre ellos. El grupo B incluye a A00419-68, A00419-40 y al A00419-73, con detección de fitoplasma con pocos iniciadores, siendo los tres clones progenie de una misma cruce (A96764-19 X Stirling). El grupo C fue el más numeroso y heterogéneo, incluyendo al resto de los clones de papa y al testigo positivo. La mayoría de las muestras resultaron positivas a fitoplasma con un número significativo de iniciadores, excepto el clon LB 436 que amplificó con dos iniciadores para fitoplasma, y el clon LB 99 que amplificó con cuatro iniciadores y con un alto coeficiente de similitud con el testigo positivo. Este grupo comparte al menos un progenitor entre ellos, aunque los RAPD tienen bajo nivel de reproducibilidad y son marcadores dominantes (Torres y Moreno, 2001; Weising *et al.*, 2005). Ipek *et al.* (2003) compararon AFLP, RAPD e isoenzimas en

Amplification of DNA (RAPDs)

Based on the number of amplified fragments in the DNA of the different samples of potato plants, a dendrogram was generated (Figure 4) conformed by three groups. Group A was divided into two homogeneous groups, in one were located clones A00535-2, A00499-38 and A02499-462, with no common parents among them. Group B includes A00419-68, A00419-40 and A00419-73, with detection of phytoplasma with few primers, the three clones being the progeny of the same cross (A96764-19 X Stirling). Group C was the most numerous and heterogeneous, including the rest of the potato clones and the positive control. Most of the samples resulted positive to phytoplasma with a significant number of primers, except clone LB 436, which amplified with two primers for phytoplasma, and clone LB 99, which amplified with four primers and with a high coefficient of similarity with the positive control. This group shares at least one parent among them, although the RAPD have a low level of reproducibility and are dominant markers (Torres and Moreno, 2001; Weising *et al.*, 2005). Ipek *et al.* (2003) compared AFLP, RAPD and isoenzymes in garlic, finding 70 % similarity between the AFLP and the RAPD, with a correlation between dendrograms of 0.96, indicating high concordance between the two techniques for grouping the garlic. This situation has been repeated in melon (*Cucumis melo*, García *et al.*, 2000), rice (*Oryza sativa*, Virk *et al.*, 2000) and chile (*Capsicum Nahum*, Lefebvre *et al.*, 2001), thus the use of RAPD was considered valid for the present research.

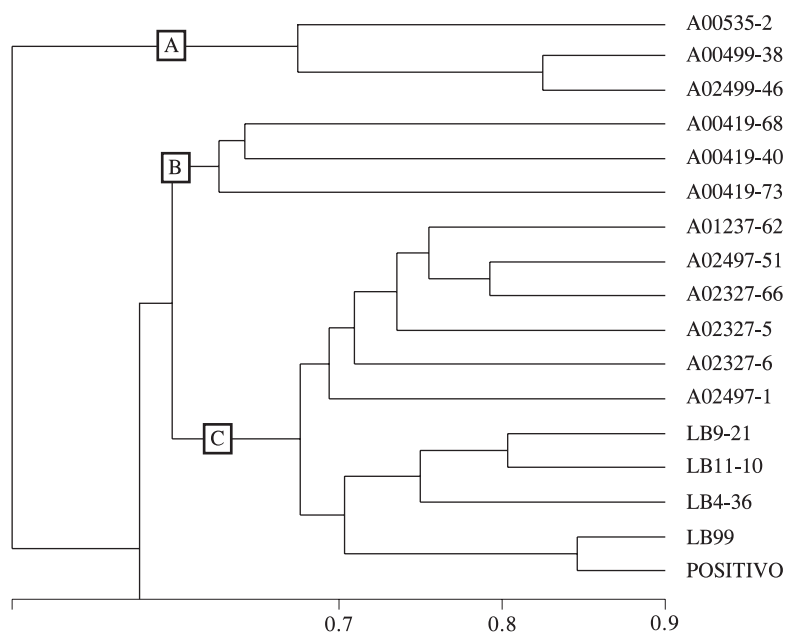


Figura 4. Agrupamiento de los clones por RAPDs. Método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) y coeficiente de similitud Jaccard, en el programa estadístico NTSY.

Figure 4. Grouping of the clones by RAPDs. UPGMA method (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) and Jaccard coefficient of similarity, in the statistical program NTSY.

ajo, encontrando 70 % de similitud entre los AFLP y los RAPD, con una correlación entre dendrogramas de 0.96 indicando alta concordancia entre ambas técnicas para el agrupamiento del ajo. Esta situación se ha repetido en melón (*Cucumis melo*, García *et al.*, 2000), arroz (*Oryza sativa*, Virk *et al.*, 2000) y chile (*Capsicum Nahum*, Lefebvre *et al.*, 2001), por lo que el uso de RAPD fue considerado válido para la presente investigación.

El análisis multivariado factorial por correspondencia simple de los resultados permitió agrupar las bandas obtenidas de cada clon de papa con los cinco iniciadores usados, lo cual facilitó la interpretación del análisis en forma numérica (Cuadro 4 y Figura 5), donde se explica la variabilidad entre los componentes principales (Johnson, 2000). Así, el clon A02499-46 se aleja de la agrupación con el iniciador de la serie G-10 (ROTH), al igual que los clones A00535-2 y A00499-38 con el iniciador de la serie C-09 (ROTH). Los iniciadores que mejor explicaron la agrupación de bandas en este análisis fueron los de la Serie C, particularmente el 09, siendo los mismos que mostraron los polimorfismos en los geles de acrilamida.

CONCLUSIONES

La mayoría de los iniciadores incluidos en el presente estudio detectaron la presencia del fitoplasma asociado a la punta morada, identificándose tres grupos, todos ubicados como del grupo I del Amarillamiento del aster (Western aster yellows). Se tipificaron tres grupos del hospedante y sólo en uno de ellos se detectó relación hospedero-patógeno.

The factorial multivariate analysis by simple correspondence of the results made it possible to group the bands obtained from each potato clone with the five primers used, which facilitated the interpretation of the analysis in numerical form (Table 4 and Figure 5), where the variability among the principal components

Cuadro 4. Valores propios de los clones de papa basados en el análisis factorial por correspondencia simple.

Table 4. Values proper of potato clones based on factorial analysis by simple correspondence.

Componente principal	Valor propio	Varianza explicada (%)	Varianza acumulada (%)
1	0.1705	19.43	19.43
2	0.1297	14.78	34.21
3	0.0734	8.36	42.57
4	0.0679	7.74	50.32
5	0.0561	6.40	56.71
6	0.0537	6.12	62.83
7	0.0435	4.96	67.79
8	0.0414	4.72	72.51
9	0.0377	4.30	76.81
10	0.0306	3.49	80.29
11	0.0252	2.88	83.17
12	0.0225	2.56	85.73
13	0.0192	2.19	87.92
14	0.0172	1.96	89.88
15	0.0155	1.77	91.65
16	0.0134	1.52	93.17
17	0.0125	1.42	94.59
18	0.0112	1.28	95.87
19	0.0090	1.03	96.90
20	0.0079	0.91	97.81
21	0.0061	0.70	98.50
22	0.0053	0.60	99.10
23	0.0048	0.54	99.65
24	0.0031	0.35	100.00

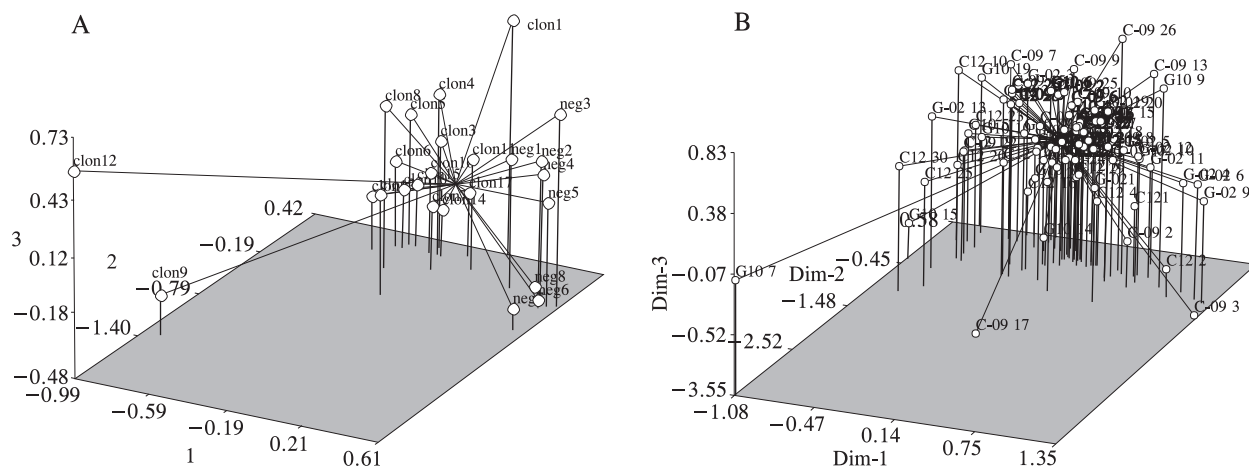


Figura 5. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para los clones de papa (A) y para las bandas obtenidas por cada uno de los iniciadores (B), producto del análisis factorial por correspondencia simple.

Figure 5. Three-dimensional representation of vector set proper of potato clones (A) and for bands obtained for each primer (B), product of the factorial analysis by simple correspondence.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado, al Centro Nacional de Referencia fitosanitaria por proporcionar los testigos positivos y al PICTIPAPA por los clones de papa utilizados en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Almeyda, L. H., M. A. Rocha, J. Piña, and J. P. Martínez. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Rev. Mex. Fitopat.* 19: 1-9.
- Bertaccini, A., L. Mitterpergher, and M. Vibio. 1996. Identification of phytoplasmas associated with a decline of European hackberry. *Ann. Appl. Biol.* 128: 245-253.
- Cadena, H., M. 1993. La punta morada de la papa en México. Incidencia y búsqueda de resistencia. *Agrociencia* 4: 247-256.
- Cadena, H. M. A., P. R. Guzmán, M. Díaz, T. E. Zavala, L. H. Almeyda, H. López D., A. Rivera, P., y C. O. Rubio. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21: 248-258.
- Davis, R. E., E. L. Dally, D. E. Gundersen, Lee, I. M., and N. Habili. 1997. "Candidatus phytoplasma australiense", a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 262-269.
- Davis, R. E., and W. A. Sinclair. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88: 1372-1376.
- Deng, S. L., and Y. C. Hikury. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. *J. Microbiol. Met.* 14: 53-61.
- García, M. J. M., H. Oliver, P. Gómez, and M. C. Vicente. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.* 101: 860-864.
- 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.
- Ipek, K. M., A. Ipek, and P. W. Simon. 2003. Comparison of AFLP, RAPD markers and isoenzymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germoplasm collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 246-252.
- Jansky, S. H., and D. I. Rouse. 2003. Multiple disease resistance in interspecific hybrids of potato. *Plant Dis.* 87: 266-272.
- Jensen, A., P. Hamm, P. E. Thomas, J. Crosslin, J. E. Munyaneza, A. Schreiber, and K. Pike. 2004. Purple top and leafhoppers: an update. *Potato progress*. IV: 1-3.
- Johnson, D. E. 2000. Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos. Editorial Thomson. México. 566 p.
- Lee, I. M., E. Dawn, D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis, and I. M. Bartoszyk. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bact.* 48: 1153-1159.
- Lee, I. M., R. Hammond, R. E. Davis, and D. E. Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee, I. M., R. E. Davis, and D. E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 221-255.
- Lefebvre, V., B. Goffiner, J. C. Chauvet, B. Caromel, P. Signoret, R. Brand, and A. Palloix. 2001. Evaluation of genetic distances between peppers inbred lines for cultivar protection purposes: Comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theor. Appl. Genet.* 103: 741-750.
- is explained (Johnson, 2000). Thus, clone A02499-46 is distanced from the grouping with the primer of the series G-10 (ROTH), as well as for clones A000535-2 and a00499-38 with the primer of the series C-09 (ROTH). The primers that best explained the grouping of bands in this analysis were those of Series C, particularly 09, the same ones that presented the polymorphisms in the acrylamide gels.

CONCLUSIONS

Most of the primers included in the present study detected the presence of the phytoplasma associated with purple top, identifying three groups, all placed as being from group I of Western aster yellows. Three groups of the host were typified and the host-pathogen relationship was detected in only one of them.

—End of the english version—



- Leyva, L. N. E., S. J. C. Ochoa, K. D. S. Leal, and J. P. Martínez. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México. *Can. J. Microbiol.* 48: 1062-1068.
- Levy, L., I. M. Lee, and A. Hadidi. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J. Virol. Meth.* 49: 295-304.
- Lorenz, K. H., B. Schneider, U. Ahrens, E. Seemüller. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 83: 971-976.
- Moreno, V. S. 2001. Análisis de resultados en la caracterización molecular. In: González, A. F., y V. J. M. Pita (eds). *Conservación y Caracterización de Recursos Filogenéticos*. INEA Universidad de Ingeniería Técnica Valladolid, España. pp: 253-266.
- Munyaneza, J. E., A. S. Jensen, P. B. Hamm, and J. M. Crosslin. 2005. Phenology of the beet leafhopper, major vector of the potato purple top phytoplasma in the Columbia Basin. *Potato Assoc. Am. Annual Meeting (abstract G73)*.
- Salazar, L. F. 1997. Identificación y control de enfermedades virales y fitoplasmas de la papa. *Simpósio Internacional de la Papa México*. www.codesan.org/org/e-foros/infopapa/papa27.htm.
- Seemüller, E., C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino, and M. Göschl. 1998. Current status of molecular classifications of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80: 3-26.
- Smart, C. D., B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrinson, 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 region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.
- Spooner, D. M., J. Tivang, J. Nienhuis, J. T. Miller, D. S. Douches, and A. Contreras. 1996. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *eutuberosum*. *Theor. Appl. Gen.* 92: 532-540.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practices of Numerical Classification*. WH Freeman and Co., USA. pp: 115-133.

- Stewart, C., and L. Via. 1993. A rapid CTAB ADN isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14: 748-749.
- Torres, L. M. E., y V. S. Moreno 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. *In*: González, A. F., y V. J. M. Pita (eds). *Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos*. INEA Universidad de Ingeniería Técnica Valladolid, España. pp: 235-252.
- Virk, P. S., J. Zhu, H. J. Newbury, G. J. Bryan, M. T. Jackson, and B. Ford-Lloyd. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice germoplasm. *Euphytica* 112: 275-284.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications*. 2nd. ed. CRC Press. USA. 444 p.