



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA**

FECHA DE PRESENTACIÓN:	2010 – 11
ESTACIÓN EXPERIMENTAL:	Santa Catalina/Austro
DEPARTAMENTO:	Biotecnología
PROYECTO:	BIOTECNOLOGIA (D212-023)
RESULTADO:	Prestación de servicios biotecnológicos para usuarios externos e internos
ACTIVIDAD:	Estandarización de técnicas moleculares para el diagnóstico de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , y CMV (Cucumber mosaic cucumovirus)
UBICACIÓN:	Estación Experimental Santa Catalina Estación Experimental del Austro
AUTOR:	Egda. Johanna Buitrón Bustamante
COAUTORES:	Dr. Eduardo Morillo Biol. Denisse Peña
COLABORADORES:	Biol. Katherine Orbe (DNPV, EESC) Dra. Carmen Suárez (DNPV, EETP) Planificación EESC
FECHA DE INICIO:	Diciembre 2010
FECHA DE TERMINACIÓN:	Agosto 2011
PRESUPUESTO:	USD 6550,85
FUENTE DE FINANCIAMIENTO:	INIAP 85,2% TESISTA 14,8%

ANTECEDENTES

La agricultura es la base de la seguridad alimentaria y por tanto el control de plagas debe basarse en un diagnóstico rápido de patógenos en estados o fases tempranas, que permita la toma de decisiones oportuna para garantizar la productividad de los cultivos. La identificación rápida y eficiente de los agentes causales puede hacer la diferencia entre la pérdida de un sembrío o la aplicación de un método que contrarreste al agresor rápida y efectivamente. Cultivos de importancia económica y alimenticia, que suelen ser monocultivos, se ven afectados por una serie de plagas que en su mayoría llevan a la destrucción total de la siembra. Se podría decir que estos monocultivos son en sí mismos generadores de plagas y/o enfermedades. Al estar compuestos por una sola especie, dan las condiciones para que fitopatógenos encuentren un ambiente apropiado para establecerse y diseminarse (Carrere & Lohmann, 1997). Otro aspecto importante en este tema tiene que ver con la introducción o salida de agentes y plagas a o desde un área o país (plagas de importancia cuarentenarias) y la detección rápida es herramienta básica para una comercialización eficiente, especialmente en el comercio internacional. Por lo tanto, la detección temprana de enfermedades bacterianas, fúngicas y el control de enfermedades virales es un paso fundamental para reducir los índices de pérdidas (Rivas, *et al* 2008).

El Ecuador es un país agrícola, por lo que esta actividad es primordial para la economía de sus habitantes ya que el 25% de la población está relacionada con la agricultura. Del la población ecuatoriana que reside en el área rural, el 62% se encuentra directa e indirectamente vinculada a la agricultura, (SICA, 2005); por tanto, la disminución de producción de cultivos por agentes fitopatógenos genera pérdidas económicas significativas.

El hongo *Botrytis cinerea*, es agente causal de la “podredumbre gris”, infecta a más de 200 especies vegetales distintas, generando serias pérdidas económicas (40% de pérdidas en diferentes cultivos) antes y después de la cosecha. El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta (Benito, *et al* 2000). Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene en cultivos de importancia, numerosos estudios se han realizado sobre la biología de *B. cinerea*, sobre sus interacciones con el hospedero y sobre posibles métodos de control del patógeno (Chamorro, 2005).

El trabajo realizado por Rigotti, *et al* (2002) con marcadores moleculares RAPDs reportan polimorfismos en el patógeno, generando marcadores moleculares específicos para la detección de *B. cinerea*. Suarez, *et al* (2005) reporta el uso de PCR en tiempo real, para la detección de marcadores del gen de la b-tubulina, espacios intergénicos (IGS) y un marcador SCAR. Los ensayos para la región IGS y el marcador SCAR [primer P5 (AACGCGCAAC)] demostraron ser altamente específicos para la detección de *B. cinerea*, siendo la región IGS la más sensible para detectar y cuantificar con fiabilidad a partir de 20 fg de ADN de *B. cinerea*.

Por otro lado en nuestro país Chamorro & Orellana (2005) caracterizaron poblaciones de *B. cinerea* resistentes a fungicidas con el uso de PCR demostrándose que los genes de patogenicidad difieren de los de resistencia a fungicidas.

Otro patógeno de importancia es el causante de la marchitez bacteriana, *Ralstonia solanacearum*, esta bacteria constituye una seria amenaza para varios países de América Latina por su amplia gama de hospederos. Esta bacteria es responsable de pérdidas considerables en muchos cultivos hortícolas tales como crucíferos, plantas ornamentales como crisantemos, claveles y estatis, en musáceas y algunas solanáceas como en el cultivo de la papa en el que el patógeno deja inutilizadas grandes extensiones de tierras contaminadas (Iglesia, *et al* 2008). Se han diferenciado cuatro grupos genéticos correspondientes a diferentes orígenes geográficos: el filotipo I (fundamentalmente asiático), equivalente a la división genética I definida por Cook y Sequeira (CookDond Sequeira); el filotipo II con procedencia americana, equivalente a la división II, el cual agrupa las cepas que causa el Moko del plátano y banano perteneciente a la raza 2 (motivo de estudio) y que atacan papa pertenecientes a la raza 3; el filotipo III contiene los aislamientos africanos y el filotipo IV contiene cepas de Indonesia, además de algunos aislamientos de Australia y Japón (Pérez, 2009).

Para la detección convencional se utilizan pruebas rápidas de identificación de la bacteria tales como: prueba de ELISA, prueba de Hidróxido de Potasio al 3 % (KOH), tinción Gram y análisis de características morfológicas (Rodríguez, 2007). Los resultados para las pruebas más sencillas basadas exclusivamente en medios selectivos, requieren de tiempos extensos y de densidades bacterianas elevadas para que la prueba de un resultado positivo. Estos datos son reportados en los estudios realizados por Schonfeld, *et al* (2003) y Álvarez, *et al* (2008), donde los niveles de sensibilidad sólo alcanzan en promedio 10^4 UFC/g de tejido ó suelo, similares resultados se obtuvieron al emplear técnicas más elaboradas como ELISA donde estos oscilan entre 10^4 y 10^6 UFC/g de tejido o suelo, con el inconveniente de poder generar falsos positivos o falsos negativos. Con una técnica molecular la sensibilidad aumenta al poder detectar el patógeno con la presencia de 10^2 UFC/g tejido o suelo. Los datos obtenidos por Rodríguez (2007) confirman que la detección molecular es un método eficiente para la identificación de la bacteria siendo éste determinante y de mayor precisión. Además la detección molecular contribuiría a una localización oportuna de la ocurrencia *R. solanacearum* en el país con el fin de implementar la verificación de su ausencia en los principales cultivos del país entre los que se destaca el cultivo de Musa, así como mantener actualizada la situación fitosanitaria para facilitar una respuesta oportuna e inmediata a los problemas fitosanitarios que se presenten de forma que constituyan el principal respaldo de las actividades de control y certificación del ente estatal de Sanidad Vegetal Ecuatoriano (Agrocalidad, 2011). Esta bacteria se encuentra confinada a una parte del Nororiente, considerando que hay otras especies de *Ralstonia* y bacterias en general que pudieran confundirse, una proceso de diagnostico confiable y rápido como el que facilitan técnicas moleculares permitirían evitar que la bacteria se extienda en la zona bananera con el consiguiente perjuicio a la actividad (Carmen Suarez, com. pers.).

Trabajos en los que se emplean métodos moleculares para la detección de *Ralstonia solanacearum* como los realizados por Álvarez, *et al* (2008), Iglesia, *et al* (2008) y Llop, *et al* (1999) mediante el uso de primers específicos reportan alta sensibilidad en la detección y se ven apoyados por pruebas complementarias para verificar su veracidad.

Un tercer patógeno es el *Virus del Mosaico de las Cucurbitáceas* (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV), miembro tipo del grupo de los Cucumovirus. está formado por tres partículas isoméricas de 29 nm y presenta cuatro moléculas de ARN monocatenario en

sentido positivo. EL *CMV* presenta una gama de hospederos naturales muy amplia con más de 800 especies hospederas que incluyen al plátano, banano, fréjol, hortalizas, frutas, tabaco, y 365 géneros pertenecientes a 85 familias de mono y dicotiledóneas (De Blas, *et al* 1993).

El *CMV* es uno de los diez virus de plantas más importantes en el mundo por su gran número de variantes y por su amplia distribución geográfica, favorecida por numerosas especies de áfidos, vectores eficientes de este virus, así como por los daños que causa a una gran cantidad de especies de plantas de interés económico (Gutiérrez, *et al* 2004). Se han identificado alrededor de 39 aislamientos de *CMV* clasificados en dos grandes serogrupos, el subgrupo I, tipificado por el aislamiento DTL (motivo de estudio), que predomina en el trópico y en el Subtrópico; mientras que el subgrupo II, tipificado por el aislamiento ToRS, prevalece en regiones de la zona templada (Reichel, *et al* 1996).

En estudios de Reichel, *et al* (1996), se caracterizó el gen que codifica la proteína de la cápside del virus, identificándose primers específicos para la detección molecular. Los primers o cebadores reportados fueron efectivos para la detección del virus en todos los aislados de *CMV* empleados para las pruebas, estos presentaron amplificación de un fragmento esperado (890 pb), siendo este el punto para determinar si es o no positiva la muestra para *CMV*. Otros trabajos realizados en cuanto a caracterización del virus como es el caso de Rizos, *et al* (1992), Gutiérrez, *et al* (2004) proporcionan datos de primers específicos para la detección del patógeno, estos primers fueron diseñados de regiones conservadas del patógeno y las pruebas realizadas en los estudios presentaron gran sensibilidad. Aunque la detección temprana no es aplicable para *CMV*, en nuestro país el CINCAE reporta la detección del virus en caña de azúcar (Morillo, *et al* 2009) y el INIAP (2009) recomienda medidas de control para reducir el índice de pérdidas ya que estas superan el 80% en cultivos afectados.

Por los beneficios que trae consigo el empleo de herramientas biotecnológicas en la detección de enfermedades agrícolas como pueden ser la presencia de *Ralstonia solanacearum*, *CMV* y *Botrytis cinerea*, con este trabajo se pretende emplear la PCR como un método rutinario, efectivo y económico de detección de estos agentes fitopatógenos en cultivos con importancia económica en diferentes regiones del país.

2. JUSTIFICACIÓN

El intenso y creciente comercio internacional de productos agrícolas demandan técnicas de diagnóstico fitosanitario confiables y rápidas de modo que se pueda generar decisiones de importación/exportación sin causar perjuicio biológico ni económico al país. Por otra parte, el manejo integrado de problemas fitosanitarios y el desarrollo de la agricultura ecológica y orgánica requiere mayor especificidad en el tratamiento sanitario, lo que genera una alta demanda para detectar patógenos que afectan al sector productivo agrícola del país. Los métodos utilizados actualmente para la detección de patógenos en varios cultivos tienen algunos inconvenientes, al estar limitados a un cierto número de patógenos, ser lentos o necesitar de un equipamiento numeroso. Ventajosamente, el avance de la biotecnología ha generado nuevos productos y técnicas que están disponibles para complementar o reemplazar los procedimientos tradicionales. Técnicas serológicas (ELISA, IF) y moleculares (PCR) han contribuido a la solución de problemas. Sin embargo la PCR presenta algunas ventajas en cuanto a tiempo, sensibilidad y especificidad y por ende constituye una alternativa para ser aplicada en el

diagnóstico fitosanitario dirigido a las necesidades de agricultores y en general a los solicitantes de este servicio.

Por la incidencia que tiene *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum*, *CMV* en los rubros de estudio (mora, rosas, musáceas y papaya) es necesario un método de detección eficaz, por ello a través de este trabajo se busca incorporar una herramienta de detección genérica, rápida y efectiva para detectar e identificar fitopatógenos mediante el uso de instrumentos moleculares.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Estandarizar y adaptar protocolos para la detección molecular de *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* y *CMV* en rubros de interés para el sector agroproductivo del país.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Estandarizar protocolos para la detección molecular de *Botrytis cinerea* en mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) y rosas (*Rosa spp.*) obviando el paso del aislamiento del patógeno.
2. Estandarizar protocolos para la detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en musáceas sin pasar por el aislamiento del patógeno.
3. Estandarizar protocolos para la detección molecular de *CMV* en banano (*Musa spp.*)
4. Establecer análisis de costos con otros métodos de detección existentes y opciones de factibilidad operativa con perspectiva de la implementación del servicio de detección molecular de estos patógenos.

4. HIPÓTESIS

Ho. Los métodos de diagnóstico molecular no son eficientes en la detección de *Botrytis Ralstonia* y *CMV* en los hospederos en estudio

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material Vegetal

Serán necesarios muestras de musáceas infectadas con *Ralstonia solanacearum*, muestras de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) y rosas (*Rosa spp*) infectadas con *Botritis cinerea* y muestras de banano (*Musa spp.*) y papaya (*Carica papaya*) infectadas con *CMV*, así como de materiales de referencia de estos patógenos.

5.1.2. Reactivos, Equipos e Instalaciones

Los reactivos y equipos necesarios para la estandarización de protocolos se detallan en el anexo 1.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1.1. Preparación del material vegetal, aislamiento del patógeno, extracción del ácido nucleico.

5.2.1.1.1. Metodología para *Botrytis cinerea*

a) Aislamiento del patógeno

El aislamiento se realizará siguiendo los protocolos reportados por Suárez, *et al* 2005 y Farrera, *et al* 2007 tanto para hojas como para frutos infectados (ver anexo 4).

b) Evaluación de los métodos de extracción de ADN y detección con primers específicos

Tratamientos	
Métodos de extracción	Método de detección
1. Método de extracción expuesto por Möller, <i>et al</i> (1992)	Directo C 729 + Reverso C 729-
2. Método CTAB, Suárez, <i>et al</i> (2005)	Directo C 729 + Reverso C 729-
3. Kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN, CA, USA).	Directo C 729 + Reverso C 729-
4. kit de NORGEN “Fungi Botrytis cinerea PCR Detection Kit”	Kit NORGEN “Fungi Botrytis cinerea PCR Detection Kit”

Los protocolos detallados se encuentran en el anexo 5. El mix de PCR y el programa empleado para el termociclador se puntualizan en el anexo 7.

5.2.1.1.2. Metodología para *Ralstonia solanacearum*

a) Aislamiento del patógeno

Para el aislamiento se tomara el protocolo detallado en OJEU, 2006 tanto para muestras asintomáticas y sintomáticas. Ver Anexo 4.

b) Evaluación de los métodos de extracción de ADN y detección con primers específicos

Tratamientos	
Método de extracción	Primers de detección
1. Método de Pastrik (2000) 2. Método fenol cloroformo 3. Kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN, CA, USA).	Directo OLI-1 Reverso Y-2
	Directo Ps-1 Reverso Ps-2
	Directo 759 Reverso 760

Los protocolos detallados se encuentran en el anexo 5. PCR y el programa empleado para el termociclador se puntualizan en el anexo 7.

5.2.1.1.3. Metodología para CMV

a) Evaluación de los métodos de extracción de ADN y detección con primers específicos

Tratamientos	
Método de extracción	Primers de detección
1. Método Morris con modificaciones citado por Rizos H. <i>et al</i> (2002)	Directo 5'CP
	Reverso 3'CP
2. Método fenol cloroformo	Directo CMV/MPF
	Reverso CMV/MPR

Los protocolos detallados se encuentran en el anexo 5. El mix de RetroTranscriptasa-PCR y el programa empleado para el termociclador se puntualizan en el anexo 7.

5.2.1.2. Cuantificación y validación

El ADN antes de la detección del patógeno se cuantificará en geles de agarosa al 1% con tampón TAE 1X comparándolo con el estándar ADN Low Mass Ladder y se validará mediante marcadores moleculares RAPD's. El ARN se cuantificará mediante Quant-iT™ RNA Assay Kit.

5.2.2. Interpretación de datos

La prueba PCR es positiva si se detecta el amplicón PCR específico para los diferentes patógenos, siempre que no se amplifique a partir de ninguna de las muestras de control negativo. Se realizará análisis de frecuencias determinando una proporción (x éxitos sean observados en n ensayos) para efectuar una prueba binomial.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Revisión Bibliográfica	X	X	X									
Aprobación anteproyecto		X										
Pruebas preliminares		X	X									
Obtención del material vegetal	X	X	X									
Extracción y cuantificación de ADN/ARN (Patógenos)			X	X	X							
Estandarización de protocolos de detección molecular				X	X	X	X	X	X			
Análisis datos e interpretación									X	X	X	
Transferencia tecnología a EEA				X				X				X
Redacción de tesis										X	X	X

7. PRESUPUESTO

7.1 Personal

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total
BECARIO	Mes	323,85	9	2914,65
TESISTA	Mes	323,85	3	971,55
TOTAL				3886,2

7.2 Aislamiento de patógenos

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Agar papa dextrosa	g	0,46	50	23,00
Agar nutritivo	g	0,30	50	15,00
K2HPO4	g	0,36	5	1,80
Sacarosa	g	0,56	20	11,20
Peptona proteosa	g	0,8	5	40,00
MgSO4	g	0,45	15	6,75
NaNO3	g	0,43	15	6,45
Glicerol	mL	0,58	20	11,60
SUBTOTAL				115,80

7.3 Extracción de ADN (métodos convencionales, cuantificación y validación)

Rubro	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Extracción ADN, método convencional (1-18 muestras)	15,00	6	90,00
Cuantificación ADN (1-20 muestras)	15,00	5	75,00
Validación de ADN con marcadores RAPD (96 muestras)	68,00	2	136,00
SUBTOTAL			301,00

7.4 Kits

Rubro	Costo (USD)
Quant -IT RNA Assay kit x 100 rxn. INVITROGEN	103,00
DNeasy Plant Mini Kit- QUIAGEN	345,80
first strand cDNA kit- ROCHE	580,00
Fungi <i>Botrytis cinerea</i> PCR detection kit – NORGEN	450,00
SUBTOTAL	1478,80

7.5 **Primers de detección**

Primer	Costo (USD)
OLII	21.00
Y-2	24.00
PS-1	19.00
PS-2	23.00
759	21.00
760	24.00
5'CP	28.00
3'CP	33.00
CMV/MPF	24.00
CMV/MPR	24.00
C729+	20.00
C729-	20.00
SUBTOTAL	281,00

7.6 **Materiales de Oficina**

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Copias	Unidad	0.03	1200	36.00
Empastados	Unidad	15.00	8	120.00
CDs	Unidad	5.00	4	20.00
SUBTOTAL				176.00

7.7 **Costo total**

RUBRO	TOTAL (USD)
Tesista	971,55
Beca	2914,65
Aislamiento	115,80
Extracción, cuantificación y validación	301,00
Kits	1478,90
Primers específicos	281,00
Materiales de oficina	176,00
SUBTOTAL	6238,90
Imprevistos 5%	311.95
TOTAL	6550,85

7.8 **Fuentes de financiamiento**

Fuente	USD	Porcentaje (%)
P. BIOTECNOLOGIA (D212-023)	5579,30	85,2%
Tesista	971,55	14,8%

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. 2011. Sanidad Vegetal [En línea www.agrocalidad.gov. Consultado enero 2011]
- Álvarez J., Rodríguez P., Marín M. 2008. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology*, vol. 33, 3, p. 197-203.
- Benito E., Arranz M., Eslava P., 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea* *Rev Iberoam Micol* ; 17: p. S43-S46
- Carrere, R. y Lohmann, L. 1997. El papel del Sur. Plantaciones forestales en la estrategia papelera internacional [En línea: <http://www.wrm.org.uy/plantaciones/material/papel>. Consultado en octubre del 2010]
- Chamorro D., Orellana H. 2005. Caracterización de poblaciones de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas en rosas (*rosa* sp.) En las provincias de Pichincha y Cotopaxi. Ecuador. [En línea [http://www.uce.edu.ec /upload /20090209 104945 .pdf](http://www.uce.edu.ec/upload/20090209_104945.pdf)]
- De Blas C., Carazo G., Castro S., Romero J. 1993. Estudios epidemiológicos sobre el virus del mosaico del pepino en diferentes cultivos y provincias españolas: identificación serológica de los subgrupos DTL y ToRS. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19: p. 345-353
- Farrera R., Zambrano A., Ortiz F. 2007 .Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 24: 269-281
- Gutiérrez C., Ruiz R., Piedra E., De la Torre R. 2004. Caracterización de una variante del virus del mosaico del pepino (CMV) asociada con los síntomas de moteado amarillo de la azucena en México. *Agrociencia* vol. 38 número 33 p. 343-354
- INIAP. 2009. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, www.iniap-ecuador.gov.ec.
- Iglesia A., Álvarez E., Martínez Y., García A. 2008. Diagnóstico molecular de la marchitez bacteriana. *Rev. Protección Veg.* Vol. 23 No. 2 p. 75-79
- Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C., López M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37 p. 23–31.
- Morillo, E. Escobar, J. Taípe, M. 2009. Catálogo Nacional de Laboratorios de Agrobiotecnología del Ecuador. INIAP-IICA-PROCIANDINO. Quito – Ecuador
- Möller E., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No. 22 6115 6116
- Official Journal of the European Union (OJEU). 2006. Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum*. 206/36 p. 206-106
- Pérez L. 2009. Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)/Bioversity International RELAC. Vol. 2 No.1.
- Rigotti S., Gindro K., Richter h., Viret O. 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 209, p. 169:174
- Rivas E., De Armas Y., Barreto R., Ramírez M., Drake L., Merina R. 2008. Temas de Ciencia y Tecnología. El diagnóstico y su papel en la fitoprotección vol. 12 número 35, p. 47 - 54

- Rizos H., Gunn L., Pares R., Gillings M. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73, p. 2099-2103.
- Reichel H., Mariño L., Kummert J., Benalcázar S., Narváez J. 1996. Caracterización del Gen de la Proteína de la Cápside de dos aislados de virus del mosaico del peino (CMV), obtenidos de Plátano y banano (*Musa spp.*). *Revista Corpioca* vol. 1 núm. 1.
- Rodríguez D. 2007. Determinación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. Y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala. Tesis previa obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad San Carlos de Guatemala.
- Schonfeld J., Heuer H., Van J., Smalla K. 2003. Specific and sensitive detection of *ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 69. p. 7248–7256.
- SICA. 2005. Sistema de Información y Censo Agropecuario. Ministerio de Agricultura. III Censo Nacional Agropecuario. Ecuador. www.sica.gov.ec
- Suárez M., Walsh K., Boonham N., O'Neill T., Pearson S., Barker I. 2005. Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 890–899.

ANEXOS

Anexo 1. Reactivos, Equipos y materiales necesarios para el presente estudio.
Medios para el aislamiento y el cultivo de *R. solanacearum* y *B. cinerea*

Reactivos para medios de cultivo		Equipos	Materiales
Agar papa dextrosa	Violeta cristal	Autoclave	Papel filtro
Agar nutritivo	Polimixina-B-Sulfato		Puntas 1 ml. 200 ul y 1000 ul
Extracto de levadura	Bacitracina	Refrigerador	Papel parafilm
Bacto-peptona	Cloranfenicol		Pipetas
D(+)-glucosa (monohidrato)	Penicilina-G	Agitador	Papel absorbente
Bacto-agar	Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio	Sorbona	
Sacarosa	Sacarosa	Balanza analítica	Papel aluminio
K2HPO4	Peptona proteosa	Microondas	Cajas petri
MgSO4.7H2O	K2HPO4		Bisturi
Casaminoácidos	MgSO4	Baño maria	Elenmeyer (1000ml)
Dextrosa	NaNO3		Palillos
Casaminoácidos	Glicerol	Hot plate	

• Extracción de ADN, amplificación, corrida y revelado de geles.

Reactivos	
Etanol	Na2HPO4 (anhidro)
Nitrógeno líquido	KH2PO
Tris	KCl
EDTA	Copos de Lubrol
SDS	Compuesto DC silicona antiespumante
Proteínasa K	Pirofosfato tetrasódico
NaCl	Na2HPO4.12H2O
CTAB	NaH2PO4.2H2O
Cloroformo	Fenol
Alcohol isoamílico	acetato sódico
Acetato de Amonio	RNAasa
Isopropanol	Lisozima
Tris HCl	taq Polimerasa (Go taq, green taq)
Metanol	Buffer para PCR 10X
Mercaptoetanol	BSA
Bromuro de amonio hexadeciltrimetil	dNTP's
Na 2SO3	MgCl2
polyvinylpyrrolidona (PVP)	MgCl2.6H2O
Bromuro de etidio	

Equipos	Materiales
Baño maría	Papel filtro
Vórtex	Hielo
Refrigerador	Papel parafilm
Termociclador	Maceradores
Cámaras electroforéticas	Separadores, Peines
Estufa	Papel parafilm
Centrífuga	Puntas 1 ml, 200 ul y 1000 ul
Transiluminator UV	Pipetas
Agitador	Papel absorbente
Sorbona	Tubos eppendorf 1.5
Balanza analítica	

Anexo 2. Preparación de medios

Medios de cultivo en general

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo	23,0 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Medios de enriquecimiento validados

Caldo SMSA, Elphinstone, citado por OJEU (2006).
Preparar como para medio de agar selectivo SMSA pero omitir Bacto-agar y cloruro de 2,3,5-tetrazolio.

Caldo Wilbrink modificado, Caruso, citado por OJEU (2006).

Sacarosa	10 g
Peptona proteosa	5 g
K2HPO4	0,5 g
MgSO4	0,25 g
NaNO3	0,25 g
Agua destilada	1 l

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y enfriar a 50 °C.
Añadir soluciones estándar de antibióticos como para el caldo SMSA.

Anexo 3. Buffer para el procedimiento para extracción de ADN

Buffer de extracción (buffer fosfato 50 mM, pH 7,0)

Este buffer se utiliza para la extracción de la bacteria del tejido de las plantas mediante la homogeneización o la agitación.

Na2HPO4 (anhidro)	4,26 g
KH2PO4	2,72 g
Agua destilada	1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Buffer de precipitado (buffer fosfato 10 mM, pH 7,2)

Este buffer se utiliza para la resuspensión y la dilución de extractos de cuñas basales de tubérculos de patata tras la concentración en un precipitado mediante centrifugación.

Na2HPO4.12H2O	2,7 g
NaH2PO4.2H2O	0,4 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo 4. Aislamiento de patógenos

a. Para *Ralstonia solanacearum* (OJEU, 2006).

En muestras con síntomas:

1. Coger exudado o secciones de tejido decolorado del anillo vascular del tubérculo o de los haces vasculares de plantas huésped en proceso de marchitamiento. Poner en suspensión en un volumen reducido de agua destilada estéril o en buffer de extracción (30 mM Na₂HPO₄, 30 mM KH₂PO, ver anexo 3) y dejar entre cinco y diez minutos.
2. Preparar una serie de diluciones de la suspensión.
3. Colocar 50-100 µl de la suspensión y las diluciones en un medio nutritivo general (NA, YPGA o SPA y/o en un medio de tetrazolio de Kelman y/o un medio selectivo validado, ver anexo 2). Extender o hacer estrías con una técnica adecuada de dilución en placas.
4. Incubar las placas entre dos y seis días a 28 °C.

b. Para *Botrytis cinérea* (Suarez *et al* 2005 y Farrera *et al* 2007)

Para hojas:

1. A partir de las hojas, realizar discos de aproximadamente 17 mm de diámetro.

2. Desinfectar el tejido mediante inmersiones secuenciales de los discos en etanol al 70% (v/v) por 30 segundos, desinfectante comercial al 5% (v/v) por 2 minutos y finalmente en agua destilada estéril por 5 minutos

Protocolo tomado de para fruto

1. Lavar los frutos con agua corriente durante 15 min y agua destilada.
2. Sumergir los frutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% por espacio de 5 min y luego en una de alcohol etílico al 70% para su flameado en el mechero.

Cortes de tejidos internos de las lesiones se sembraron en placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) e incubadas a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días.

Anexo 5. Protocolos de extracción de ADN y ARN

I. Método de Pastrik, citado por OJEU (2006).

1. Vertir con una pipeta 220 μl de buffer de lisis [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
2. Añadir 100 μl de extracto de muestra y colocar en un calentador o al baño maría a 95°C durante diez minutos.
3. Colocar el tubo en hielo durante cinco minutos.
4. Añadir 80 μl de solución estándar de lisozima (50 mg de lisozima por ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
5. Añadir 220 μl de solución A Easy DNA® (Invitrogen), mezclar adecuadamente por agitación e incubar a 65°C durante 30 minutos.
6. Añadir 100 μl de solución B Easy DNA® (Invitrogen) y agitar vigorosamente hasta que el precipitado se mueva libremente en el tubo y la muestra sea uniformemente viscosa.
7. Añadir 500 μl de cloroformo y agitar hasta que disminuya la viscosidad y la mezcla sea homogénea.
8. Centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4°C para separar las fases y formar la interfase.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf.
10. Añadir 1 ml de etanol al 100 % (-20°C), agitar brevemente e incubar en hielo durante diez minutos.
11. Centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4°C y desechar el etanol.
12. Añadir 500 μl de etanol al 80 % (-20°C) y mezclar invirtiendo el tubo;
13. Centrifugar a 15 000 g durante diez minutos a 4°C , eliminar el etanol.
14. Dejar que el pellet se seque a temperatura ambiente.
15. Resuspender el pellet en 100 μl de agua ultrapura estéril y dejar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos
16. Almacenar a -20°C hasta que se necesite para la prueba PCR.
17. Centrifugar todo precipitado blanco y utilizar 5 μl del sobrenadante que contenga ADN para la prueba PCR.

II. Método fenol cloroformo para *R. solanacearum*

1. Si se utilizan placas de agar, recoger las colonias con un asa estéril y suspenderlas en 5mL de buffer de suspensión (3,3mL de NaCl 3M; 1,0mL de

- Tris 1M pH 8,0; 2,0mL de EDTA 0,5M pH 8,0; 58,5mL de sacarosa y ajustar el volumen a 100mL). Si se utiliza medio de crecimiento, centrifugar las colonias durante 5min a 3600×g a 4°C, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5mL de buffer de suspensión.
2. Centrifugar la suspensión durante 5min a 3600×g a 4°C. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 3,78mL de buffer de suspensión.
 3. Añadir 200µL de SDS al 20% y mezclar completamente mediante inversión. Incubar la mezcla a 37°C durante 30min. Añadir 20µL de proteinasa K (20mg/mL), mezclar y continuar incubando a 37°C durante otro 30min.
 4. Añadir 720µL de NaCl (5M), mezclar completamente, añadir 600µL de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y mezclar por inversión. Incubar a 65°C durante 10min y a 37°C durante 5min.
 5. Añadir un volumen igual de PCI (25:24:1 fenol-cloroformo-alcohol isoamílico). Centrifugar a 1500×g durante 15min. Traspasar la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Añadir un volumen igual de CI (24:1 cloroformo-alcohol isoamílico) y centrifugar durante 15min a 1500×g.
 6. Traspasar la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Añadir 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%, mezclar por inversión y mantener a -70°C durante 30min.
 7. Centrifugar durante 30min a 14500×g. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet mediante vacío. Resuspender el pellet en 400µL de buffer TE (Tris HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0)
 8. Añadir 1µL de una dilución 1:3 en agua estéril de RNasa T₁. Incubar la mezcla a 37°C durante 1h.
 9. Centrifugar a 19900×g durante 2min.
 10. Traspasar la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y mezclar bien. Precipitar el DNA con 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%. Mantener a -70°C durante 20-30min.
 11. Centrifugar durante 8min a 19900×g. Eliminar el sobrenadante. Lavar el pellet con 500µL de etanol al 70% y volver a centrifugar durante 8min.
 12. Descartar el sobrenadante, secar el DNA a vacío (15-30min) y disolver el pellet de DNA en 100-400µL de agua estéril.

III. Método de extracción expuesto por Möller *et al* (1992)

Para el cultivo de hongos siempre que sea posible se emplearan medios que no estimulen la producción de polisacáridos.

Son necesarios entre 30 y 60 mg de material seco o una cantidad de muestra fresca correspondiente al mismo peso en seco

1. Moler el micelio, mediante el congelamiento con nitrógeno líquido
2. Colocar el micelio en polvo en un microtubo con 500 ul TES (100 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 2% SDS),
3. Añadir 50-100 ug proteinasa K a partir de una solución stock apropiada
4. Incubar durante 30 min hasta 1 h, a 55°-60 ° C, mezclar ocasionalmente.
5. Ajustar la concentración de sal a 1,4 M con 5 M NaCl (= 140 ul),
6. Añadir 1 / 10 vol (= 65 ul) 10% CTAB, incubar durante 10 minutos a 65°C.
7. Añadir 1 vol CIA (Id = 700), mezclar suavemente, incubar durante 30 min a 0 ° C, centrifugar durante 10 min a 4 ° C, max rpm.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml, añadir 225 uL de 5 M NH₄Ac, mezclar suavemente, dejar en hielo durante aprox. 30 minutos (cuanto más tiempo mejor); centrifugar , 4 ° C, max rpm

9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, añadir 0.55 vol isopropanol (= 510 ul) para precipitar el ADN; centrifuga inmediatamente por 5 min, max rpm,
10. Si no hay ADN visible (hilillos) colocar las muestras en hielo antes de centrifugar durante aprox. 15-30 min.
11. Desechar el sobrenadante y lavar dos veces la pastilla de ADN con etanol frío al 70%
12. Eliminar el etanol y dejar secar la pastilla, disolver el ADN en 50 uL TE.
Opcional: Después del paso 8 puede ser insertado RNasa al tratamiento.

Extracción de ADN a partir de frutas órganos y los tejidos vegetales.

Moler el tejido vegetal (paso 1) obtenido el polvo de los tejidos, realizar la extracción con 1 ml de metanol que contiene 0,1% mercaptoetanol y centrifugar, eliminar el sobrenadante (realizar este proceso tres veces).

Dejar secar el pellet por lo menos 1 hora a temperatura ambiente y se continúe con el paso 2 del protocolo anterior.

IV. Método CTAB, Suarez *et al* (2005).

1. Son necesarios discos de hojas (que corresponde a 100 mg aproximadamente).
2. Moler el tejido tras congelar con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino.
3. Mezclar el tejido molido con 1 ml de tampón de homogeneización (20 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 100mMTris-HCl pH 8.0, 1,4 M NaCl, 20 g/L bromuro de amonio hexadeciltrimetil, 10 g/L Na₂SO₃, 20 g/L polyvinylpolyrrolidone) en un tubo de microcentrifuga.
4. Después se incuban las muestras a 65 ° C durante 15 minutos,
5. Realizar dos extracciones con cloroformo / alcohol isoamílico (24:1)
6. El ácido nucleico se precipita desde la capa acuosa mediante la adición de 0,5 volúmenes de 5 M NaCl y un volumen igual de isopropanol helado.
7. Después de centrifugar, lavar el pellet con 70% (v / v) de etanol,
8. Resuspender el pellet en 50 ul de agua libre de nucleasas.

V. Método Morris con modificaciones, citado por Rizos H. *et al* (2002)

1. Para la extracción es necesario tejido follor infectado
2. Homogenizar 5 g de tejido vegetal con 12 ml de buffer de extracción (85 mM Tris-HCl, 165 mM NaCl, 2 mM-EDTA, SDS 1-25%, 1% polivinilpirrolidona).
3. Añadir 4 ml de fenol y CIA (24:1) a la mezcla y agitar para formar una emulsión, mantener a temperatura ambiente por 30 minutos
4. Centrifugar a 12000 rpm a 4° C durante 20 minutos
5. Recoger el sobrenadante y colocar 30 ml de STE (100 mM NaCl, 50 mM Tris--HCl, 1 mM-EDTA, pH 7,0) y se ajustó a 16% (v / v) de etanol.
6. Las muestras se llevaran a través de una columna de 2 ml de Whatman CF-I polvo de celulosa equilibrada con STE 16% de etanol (v / v). Para extraer el ADN celular y ssARN de la columna lavar con aproximadamente 70 ml de etanol STE/16% (v / v).
7. El dsRNA retenido será eluido con 9 ml de tampón STE, luego se precipitado con etanol al 100% y finalmente se resuspendido en 100 uL de tampón TE (10 mMTris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). Almacenar a -20 ° C.

VI. Método fenol cloroformo *para CMV*

1. Homogenizar las muestras en buffer (TE pH 7.6, 1 X PBS pH 6.5, / Hepes pH 7.6, 60 mM/ citrato de sodio pH 5.0, 0.5M).
2. Centrifugar por 20 minutos a 10000 rpm, recuperar el sobrenadante.
3. Trabajar con el 50%. Añadir una cantidad similar de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:25:1). Mezclar bien por inversión (formación de una emulsión).
4. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad.
5. Retirar la fase acuosa y repetir el paso anterior si se presentase gran cantidad de proteínas.
6. Es necesario tener en cuenta el volumen de líquido obtenido para el siguiente paso.
7. Añadir al volumen obtenido Acetato de Sodio 3M (3M CH₃COONa), Etanol al 100% en una relación:
Volumen de la muestra * 3 = volumen total (CH₃COONa + etanol)
Volumen de la muestra * 4 = xxx * 10% = Volumen de CH₃COONa
Volumen total – volumen de CH₃COONa = Volumen del Etanol
8. Dejar toda la noche a -20 ° C.
9. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
10. Añadir 100 uL de etanol al 100%, desprender o resuspender el pellet.
11. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad, eliminar el sobrenadante.
12. Añadir 100 uL de etanol al 70% Desprender el pellet y centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante.
13. Secar el pellet.
14. Añadir un volumen (no menor a 50 uL) de Buffer o agua libre de nucleasas.

Anexo 6. Fungi Botrytis cinerea PCR detection kit

PROTOCOLO

A. Aislamiento de ADN Genómico

1. Preparación del lisado

- a. Para hongos en placas:
Añadir aproximadamente 5 ml (puede ajustarse) de la solución “**Collection Solution**” a la placa y recoger suavemente las esporas y micelio con una asa y punta, asegurarse de no recoger agar. Transferir hasta 1 ml de esporas lavadas o de micelio húmedo a un tubo
Para hongos en tejido vegetal o frutas:
Lavar el tejido o fruta con una cantidad apropiada de agua libre de DNasa con agitación. Transferir hasta 1ml de esporas lavadas o de micelio húmedo a un tubo
- b. Centrifugar a 14000 rpm por 2 minutos. Retirar el sobrenadante
- c. Añadir 500 uL de solución de lisis “**lysis solution**” al pellet. Resuspender el pellet mediante agitación suave.
- d. Transferir la mezcla a un tubo “**bead tube**”, asegurándose que el tubo quede en posición horizontal
- e. Dar vortex por 5 min a máxima velocidad

- f. Incubar el **bead** tubo con el lisado a 65 °C por 10 minutos. Dar un mezclado por inversión 2 o 3 veces durante la incubación
- g. Asegurarse que no exista líquido en la tapa y transferir todo el contenido a un tubo mediante una pipeta, asegurarse de no transferir las cuentas (beads).
- h. Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm
- i. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo libre de DNasa , tenga en cuenta el volumen
- j. Añadir un volumen igual de etanol al 70 % al lisado. Agitar para mezclar.
- k. Continuar con el paso 2

2. Unión de ADN a la columna

- a. Ensamblar la columna en un tubo, mediante un giro
- b. Añadir 10 uL de **B. cinérea Isolation Control (Iso C)** al lisado
- c. Aplicar hasta 600 uL del lisado con etanol a la columna y centrifugar por un minuto a 14000 rpm. Descartar el líquido del tubo. Si el lisado no a travesado por completo centrifugar nuevamente
- d. Dependiendo del volumen del lisado, repita le paso 2c si fuese necesario.

3. Lavado de la columna

- a. Aplicar 500 uL de solución de lavado “**Wash solution**” a la columna y centrifugar por 1 minuto, asegurarse que la solución atraviere la columna si no es así centrifugue nuevamente.
- b. Descarte el líquido Deseche el líquido del tubo y ensamble la columna en el tubo de colector “**collection tube**”
- c. Repita el paso 3a
- d. Descarte el líquido Deseche el líquido del tubo y ensamble la columna en el tubo de colector “**collection tube**”
- e. Gire la columna por unos 2 minutos con el fin de secar bien la resina. Deseche el tubo de recolección.

4. Elución de ADN

- a. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.7 mL “**Elution Tube**”
- b. Adicionar 75 uL de “**Elution Buffer**” a la columna
- c. Centrifugar por dos minutos a 2000 rpm seguido de un minuto a 14000 rpm. Si la buffer no atraviesa la columna centrifugar por un minuto más.

5. Almacenamiento.

Para un periodo corto almacenar el ADN purificado a -20 °C , si se trata de un periodo de tiempo largo congela a -70 °C.

B. Preparación para la PCR

La cantidad de B. cinerea 2X PCR Master Mix es suficiente para hasta 32 reacciones de PCR (24 PCR de muestras, 4 para control positivo de PCR 4 negativos.

Preparación de muestra:

COMPONENTES	Volumen por reacción
B. cinerea 2X PCR Master Mix	10 uL
Sample ADN	1 a 5 ul.
Nuclease-Free Water	hasta 10 ul.
Volumen total	20 ul.

Preparación del control positivo:

COMPONENTES	Volumen por reacción
B. cinerea 2X PCR Master Mix	10 uL
B. cinerea Positive control	10 uL
Volumen total	20 ul.

Preparación del control negativo:

COMPONENTES	Volumen por reacción
B. cinerea 2X PCR Master Mix	10 uL
Nuclease-Free Water	10 uL
Volumen total	20 ul.

Anexo 7. PCR y RT-PCR

a. Para *Ralstonia solanacearum*

Productos amplificados en la región 16S rRNA de *R. solanacearum*

Seal, citado por Llop P (1999).

Directo OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Reverso Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = **288 bp**.

- Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción (uL)
Agua ultra pura estéril	17.65
10x buffer PCR + 15 mM MgCL2	2.5
dNTP's (20mM)	0.25
Cebador OLI-1 (20 uM)	1.25
Cebador Y-2 (20uM)	1.25
Taq Polimerasa (5 U/uL)	0.1
Volumen de muestra	2
Volumen total	25

- Condiciones de reacción PCR. Se aplicará el siguiente programa:

1 ciclo de: i) 2 minutos a 96 °C (desnaturalización del molde de ADN)
 35 ciclos de: ii) 20 segundos a 94 °C (desnaturalización del molde de ADN)
 iii) 20 segundos a 68 °C (hibridación de los cebadores)
 iv) 30 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
 1 ciclo de: v) 10 minutos a 72 °C (extensión final)
 vi) mantener a 4 °C.

Pastrik y Maiss, citado por OJEU (2006).

Directo Ps-1 5'- AGT CGA ACG GCA GCG GGG G -3'

Reverso Ps-2 5'- GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA -3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = **553 bp.**

- Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción (uL)
Agua ultra pura estéril	16,025
10x buffer PCR + 15 mM	
MgCL2	2,5
BSA (fracción V) (10 %)	0,25
dNTP's (20mM)	0,125
Cebador Ps-1 (10uM)	0,5
Cebador Y-2 (10uM)	0,5
Taq Polimerasa (5 U/uL)	0,1
Volumen de muestra	5
Volumen total	25

- Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
 iii) 30 segundos a 68 °C (hibridación de los cebadores)
 iv) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
 vi) mantener a 4 °C.

Opina, citado por Álvarez *et al.* (2008)

Directo: 759: 5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3';

Reverso: 760: 5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = **282 bp.**

- Mezcla para la reacción PCR

Las PCR consistieron de un volumen total de 20 µL conteniendo 0.1 µM de cada *primer*, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante, 0.2 mM de cada dNTP, 1X de buffer de enzima, 1,5 mM MgCl2 , 1 µL de BSA 10X y 3 µL del ADN extraído.

- Condiciones de reacción PCR
- 1 ciclo de: i) 2 min a 96 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- 40 ciclos de: ii) 20 segundos a 94 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- iii) 20 segundos a 64 °C (hibridación de los cebadores)
- iv) 30 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
- vi) mantener a 4 °C.

b. Para CMV

- Diseñados a partir de proteínas de cápside
Rizos *et al.* 1992
Directo: 5'CP (5'CTCGAATTCGGATCCGCTTCTCCGCGAG 3')
Reverso: 3'CP (5'GGCGAATTCGAGCTCGCCGTAAGCTGGATGGAC 3')
Tamaño esperado del amplicón = **870 pb.**
- Diseñados a partir de la proteína del movimiento
Gutiérrez *et al.* 2004.
Directo: CMV/MPF (5' ATG GCT TTC CAA GGT ACC AGT AGG- 3')
Reverso: CMV/MPR (3' CTA AAG ACC GTT AAC CAC CTG CGA-5')
Tamaño esperado del amplicón = **850 pb.**

RT- PCR

RT- PCR Kit Roche

(cDNA primera cadena)
[Transcriptor first stand cDNA synthesis Kit (ROCHE)].

1. En un tubo colocar:

RNA	13 uL
Primers	2uL

vol. Total rx. 15 ul

Se puede reducir la cantidad de RNA siendo necesario completar el volumen con agua.

2. Incubar 10 minutos a 65°C
3. Añadir al tubo

RT- transcriptasa	0.5 uL
Buffer -RT- Transcriptasa	4 uL
Protector de inhibición RNAsa	0.5 uL
dNTP's	2 ul

vol. Total rx 22 uL

4. Incubar una hora a 50°C.
5. Incubar 5 minutos a 85°C.
6. Guardar a -20 ° C

PCR

1. Preparar:

cDNA	5 uL
Primer R	1 uL
Primer F	1 uL
Buffer 10X	5ul
MgCl2	1.2 ul
dNTP's	0.75 ul
Taq 5U/uL	0.4
H2O	5.65 ul
vol. Total rx	25ul

c. Para *Botrytis cinerea*

Rigotti *et al.*. 2002

Directo: C₇₂₉+ 5' AGC TCG AGA GAG ATC TCT GA 3'

Reverso: C₇₂₉- 3' CTG CAA TGT TCT GCG TGG AA 5'

Tamaño esperado del amplicón = 750 pb.

Anexo 8. Abreviaturas y siglas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- BSA : albúmina de suero bovino
- CTAB: bromuro de alquiltrimetilo mixto-amonio
- dNTPs: trifosfatos de deoxinucleósidos
- EDTA: tetracetato de etilendiamina
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- fg: fento gramo
- g: gramo (-s)
- h: hora (-s)
- IF: Prueba de Inmuno fluorescencia
- KOH: hidróxido de potasio
- min: minuto (-s)
- ml: mililitros
- ng: nanogramo (-s)
- nm: nanómetro (-s)
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- SDS: dodecilsulfato sódico
- Seg: segundo (-s)
- STE: tris-EDTA sódico (también TEN)
- TE: tris-EDTA (amortiguador)
- Tris: tris(hidroximetil)aminometano
- °C: grado Celsius
- µg: microgramo (-s)
- µl: microlitro (-s)
- UFC: unidad formadora de colonias