



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca

JUAN MANUEL PARDO GARCÍA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia
2013

Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca

JUAN MANUEL PARDO GARCÍA

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en protección de Cultivos

Directora

Ph.D Elizabeth Álvarez

Codirector

Ph.D Juan Carlos Vaca

Línea de Investigación:

Fitopatología

Grupo de Investigación:

Programa de Patología de yuca y Frutas Tropicales CIAT-Palmira

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia
2013

Dedicado a:

*A mis Padres, hermana y en especial al
nuevo integrante de la familia Miguelito*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PROTECCIÓN DE CULTIVOS

En Palmira a los 30 días del mes de Noviembre de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores LUCIA AFANADOR KAFURI y JAIME EDUARDO MUÑOZ FLOREZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

JUAN MANUEL PARDO GARCIA

Titulada:


“Desarrollo de una metodología de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de Fitoplasma 16SrIII-L y Reovirus CFSV asociados con la enfermedad del cuero de sapo en Yuca” bajo la dirección de Elizabeth Álvarez Cabrera y Juan Carlos Vaca Vaca.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes LUCIA AFANADOR KAFURI y JAIME EDUARDO MUÑOZ FLOREZ, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA


LUCIA AFANADOR K.


JAIME EDUARDO MUÑOZ F.

Agradecimientos

A Dios porque nunca me desampara y me da la fuerza para seguir adelante cada día

A mis padres por todo su apoyo y comprensión.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y ser una excelente escuela.

A la Doctora Elizabeth Álvarez jefe del programa de Patología de Yuca por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y creer en mi trabajo.

Al Ingeniero Juan Fernando Mejía Investigador Asociado del programa de Patología de Yuca por aportar ideas, conocimiento y apoyo en todo momento.

A la Estación Experimental de la Universidad Nacional Sede Palmira y su a su personal (CEUNP) por prestarme sus instalaciones en el desarrollo del ensayo de campo.

A mis compañeros de laboratorio Zulma Zamora, Viviana Domínguez, German Ceballos, Lederson Gañan, Michael Latorre, Natalia Aristizabal, Margarita Marroquín, Lucia Afanador y Alejandra Cuellar por sus ideas, apoyo y compañía en el desarrollo de la investigación.

Al Ingeniero Juan Bosco Asistente de Investigación del Programa de Arroz por darme su apoyo en los análisis estadísticos.

A mi novia Katherine Castillo Asistente de Investigación del Programa de Genética de Yuca por su apoyo en la final del desarrollo de esta investigación.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo diseñar una metodología de qPCR que permita certificar semilla de yuca a la enfermedad del cuero de sapo, conocer la distribución de cada uno de los agentes asociados a la enfermedad del cuero de sapo y hacer una aproximación al rol de cada uno en el proceso de la enfermedad del cuero de sapo. Se diseñaron sondas TaqMan® y cebadores, a partir del gen *rp* para la detección del fitoplasma 16SrIII-L) y RNA 4 para el reovirus CFSV. Para evaluar la distribución de los microorganismos en la planta se fraccionaron plantas de los genotipos BIPD 284-35, 289-42, 284-43, 249-45, 284B-66, y secundina en tres partes: tercio inferior, medio y superior. Una vez realizadas las detecciones (fitoplasma, virus, fitoplasma-virus y Ct superiores de 35) estas plantas se llevaron a campo. La técnica de qPCR desarrollada presentó una sensibilidad en la detección de 100 y 1000 veces en comparación con RT-PCR y PCR anidado respectivamente; mostrando para la detección de fitoplasma una excelente correlación entre la presencia de síntomas en raíces enfermas y el porcentaje de detección (92.5%), mientras que el virus presentó un porcentaje de 76.47%. La distribución de los dos organismos asociados es de forma irregular en los diferentes tercios de la planta. El comportamiento de las variables de peso en el aire, número de raíces enfermas y porcentaje de severidad al momento de la cosecha, sugiere que la coinfección de virus y fitoplasma en las raíces genera un fenómeno de hipovirulencia dilucidando de esta manera el posible rol de los dos patógenos.

Palabras clave: qPCR, yuca, fitoplasma, reovirus, semilla, hipovirulencia.

ABSTRACT

This study aimed to design a qPCR methodology for certifying seed cassava, knowing the distribution of each of the two pathogens associated with disease and to make an approach to the role of each in the disease process. TaqMan[®] probes and primers were designed from *rp* gene for the detection of phytoplasma 16SrIII-L) and RNA 4 for the reovirus CFSV. For the distribution of the agents associated were fractionated plants genotypes BIPD 284-35, 289-42, 284-43, 249-45, 284B-66, and secundina in the lower third, middle and higher, depending on the detections (phytoplasma, viruses, phytoplasma-virus and higher Ct 35) these plants were sown in the field. qPCR technique developed has a sensitivity 100 to 1000 times higher compared with RT-PCR and nested PCR, respectively, showing for the detection of phytoplasma an excellent correlation with the presence of symptoms in diseased roots and detection rate (92.5%) that the grafting technique, while the virus presented a percentage of 76.47%. The distribution of the two pathogens is irregular in the different parts of the plant. The behavior of the variables of weight in air, root number and percentage of severely at the time of harvest, suggesting that mix infection of viruses and phytoplasma on roots generates a phenomenon of hypovirulence thus elucidating the possible role of two pathogens.

Keywords: qPCR, cassava, phytoplasma, reovirus, seed, hypovirulence.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. Marco Teorico.....	18
2.1 El cultivo de la yuca en Colombia	18
2.2 La enfermedad del Cuero de Sapo en yuca	18
2.3 Antecedentes de metodologías de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas y virus.....	20
2.4 Clasificación de fitoplasmas	23
2.5 La PCR en Tiempo real.....	24
2.6 Fluorocromos utilizados en la PCR en tiempo real:.....	24
2.6.1 Fluorocromos intercalares.....	24
2.6.2 Sondas de hidrólisis	25
2.7 Métodos de cuantificación en PCR en Tiempo Real	26
2.7.1 Método de cuantificación absoluta	26
2.7.2 Métodos de cuantificación relativa	27
2.8 Importancia de la PCR en tiempo real para la detección de fitopatógenos	28
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. METODOLOGÍA.....	33
5.1 Localización del estudio.....	33
5.2 Recolección de material vegetal	33
5.3 Diseño de sonda TaqMan® y cebadores para detección de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV).....	33
5.3.1 Extracción de RNAd y ADN.....	34
5.3.2 PCR anidado y RT-PCR.....	34
5.3.3 Secuenciación y edición de secuencias	35
5.3.4 Diseño de la sonda TaqMan® y de los cebadores	35

5.4	Optimización de la concentración de los cebadores y la sonda TaqMan® y determinación de especificidad.....	36
5.4.1	Optimización de la concentración de los cebadores.....	36
5.4.2	Optimización de la concentración de la sonda TaqMan®.....	36
5.4.3	Evaluación de especificidad las sondas TaqMan® y de los cebadores.....	36
5.5	Determinación de la sensibilidad y cuantificación relativa utilizando estándares externos de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV).....	37
5.5.1	Construcción de estándares externos para cuantificación.....	37
5.5.2	Amplificación de fitoplasma 16Sr III-L y reovirus (CFSV).....	37
5.5.3	Ligación y clonación de productos de PCR.....	37
5.6	Condiciones de amplificación de PCR en tiempo real para fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV).....	38
5.7	Validación de PCR en tiempo real.....	38
5.8	Evaluación de la correlación de síntomas observados en raíces comerciales con la presencia del fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV).....	39
6.	Análisis estadístico.....	41
7.	Resultados y discusión.....	42
7.1	Diseño de la sonda TaqMan® y de los cebadores para la detección de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV).	42
7.1.2	Recolección de material vegetal.....	42
7.1.3	Extracción de RNAcd y ADN.....	42
7.1.4	PCR anidado y RT-PCR.....	43
7.1.5	Diseño de sonda TaqMan® y cebadores	45
7.1.6	Optimización de la concentración de los cebadores y de la sonda TaqMan® y determinación de la especificidad.....	55
7.1.7	Especificidad de la sonda para la detección del fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus (CFSV)	58
7.1.8	Determinación de la sensibilidad, la eficiencia y curva de calibración utilizando estándares externos para la detección del fitoplasma 16SrIII-L.....	61
7.1.9	Sensibilidad, eficiencia y curva de calibración de la prueba de qPCR utilizando estándares para la detección del reovirus (CFSV).....	62
7.2	Validación del PCR en tiempo real para la detección del fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus (CFSV).....	65
7.2.1	Validación de la técnica de qPCR frente a la prueba de injerto en la planta indicadora Secundina.....	67

7.3	Distribución de Fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV)	70
7.3.1	Determinación de mejor tejido para detección.....	70
7.3.2	Determinación de la distribución de Fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV) en tercio bajo, medio y superior de la planta de yuca	74
7.4	Determinación de correlación de síntomas observados en raíces comerciales con la presencia del fitoplasma 16SrIII-L y reovirus.	82
8.	Conclusiones.....	96
9.	Recomendaciones.....	97
10.	Bibliografía.....	98
	Anexo A: Validación de técnica de qPCR con injerto de Secundina.....	106
	Anexo B. Segunda Fase Experimental Sembrada en Centro Experimental Universidad Nacional Sede Palmira	108
	Anexo C: Escala de evaluación Patología de Yuca y Frutas Tropicales- CIAT Palmira...	108
	Anexo D: Escala de evaluación Universidad de Córdoba para selección genotipos resistentes	109
	Anexo F: Resultados de la evaluación de seis genotipos de yuca por la presencia de los agentes asociados al cuero de sapo y distribución en planta expresando como valores de ct número de copias y desviación estándar.....	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes de metodologías basadas en la detección de fitoplasmas con PCR en Tiempo Real.....	21
Tabla 2. Antecedentes de metodologías basadas en la detección de virus con PCR en Tiempo Real.....	22
Tabla 2.1. Lugares y variedades de yuca recolectadas para el diseño de de sonda TaqMan® y cebadorea.....	42
Tabla 3. Homología encontrada entre secuencias de ADN de fitoplasma asociado con el cuero de sapo de la yuca obtenidas por PCR anidado y secuencias del fitoplasma reportadas en GenBank..	51
Tabla 4. Homología encontrada entre la secuencia del aislamiento CFSV-20 del reovirus asociado al cuero de sapo de la yuca obtenida de la variedad MBRA 383 por RT-PCR y secuencias del GenBank.....	512
Tabla 5. Características de las sondas y los cebadores diseñados para el fitoplasma 16Sr III-L y reovirus.	53
Tabla 6. Evaluación de 6 combinaciones de cebadores para fitoplasma.....	56
Tabla 7. Evaluación de 6 combinaciones de cebadores para virus	56
Tabla 8. Ct y desviación estándar de concentraciones de sonda entre 50nM y 400nM para el fitoplasma.	57
Tabla 9. Ct y desviación estándar de concentraciones de sonda entre 50nM y 400nM para virus	57
Tabla 10. Especificidad de sonda TaqMan® para fitoplasma 16SrIII-L	58
Tabla 11. Amplificaciones de ADN de los grupo 16Sr-VI y 16Sr-XV.	59
Tabla 12. Especificidad de la sonda TaqMan® para reovirus (CFSV) segmento RNA 4 donde está ubicado el gen de la polimerasa.	60
Tabla 13. Ct y desviaciones estándar de las amplificaciones de diluciones seriadas de estándares que contienen ligación de parte del gen rp región a la cual se une la sonda diseñada para fitoplasma 16SrIII-L.....	61
Tabla 14. Ct de diluciones seriadas de estándares que contienen que contienen ligación de parte del gen que codifica para la polimerasa que amplifica la sonda diseñada para el reovirus (CFSV).	62
Tabla 15. Resultado de evaluación de cADN de laboratorio de Sanidad Vegetal del banco de germoplasma CIAT-Palmira.	63
Tabla 16. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de reovirus (CFSV).....	64
Tabla 17. Comparación entre resultados obtenidos con PCR en tiempo real, RT-PCR (reovirus (CFSV)) y (fitoplasma 16SrIII-L) PCR anidado para las raíces con síntomas de cuero de sapo	66
Tabla 18. Resultado de la segunda fase de la validación de la técnica de qPCR desarrollada.....	67
Tabla 19. Porcentajes de detección en peciolo, floema secundario, cogollo y floema primario, en el genotipo BIPD 249-45.....	71

Tabla 20. Porcentajes de detección en peciolo, floema secundario, cogollo y floema primario, en el genotipo BIPD 289-25.....	72
Tabla 21. Coeficientes de variación de No de copias para evaluaciones de distribución de los dos patógenos en los diferentes tercios.....	78
Tabla 22. Prueba LSMEANS para peso de raíces en el agua para los diferentes tratamientos.....	85
Tabla 23. Prueba LSMEANS para Número de raíces enfermas en los diferentes tratamientos.....	86
Tabla 24. Prueba LSMEANS para porcentaje de severidad.....	89
Tabla 25. Prueba de correlación de Pearson.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias en amplificación de RT-PCR para CFSV, utilizando dos enzimas retrotranscriptasas diferentes: 1-10 Affinity Script QPCR cADN Synthesis Kit (Stratagene); 12-21 transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen).....	44
Figura 2. Amplificaciones PCR anidado utilizando los cebadores rp de fitoplasma 16Sr-III de plantas de yuca con síntomas cuero de sapo en raíces. Se observa el amplicon de 1200 bp.	44
Figura 3. Geles de poliacrilamida donde se observan perfiles de restricción de amplificaciones de PCR anidado del gen rp con los cebadores rpF1/rpR1 - rp(III)F1/rp(III)R1.....	44
Figura 4. Alineamiento de amplicon diseñado a partir de gen rp, el cual muestra la especificidad de sonda rplII-p y cebadores rplII-PF/rplII-PR en relación con otros fitoplasmas de grupo 16SrIII y otros grupos de fitoplasma..	47
Figura 5. Árbol filogenético construido por el método de maximun parsimony analizando mediante near-full-lenght para fitoplasma.....	48
Figura 6. Alineamiento de amplicon diseñado a partir de un fragmento de 958 bp proveniente del RNA 4..	49
Figura 7. Árbol filogenético construido por el método de maximun parsimony analizando mediante near-full-lenght para el reovirus.....	50
Figura 8. Representación gráfica del diseño de las sondas.....	55
Figura 9. Grafica de optimización de cebadores para fitoplasma 16SrIII-L. Muestra la evaluación de 6 diferentes combinaciones de cebadores.....	56
Figura.10 Optimización de cebadores para reovirus (CFSV). Muestra la evaluación de 6 diferentes combinaciones de cebadores.....	56
Figura 11. Optimización de concentración de sonda TaqMan® para fitoplasma 16SrIII-L..	57
Figura 12. Graficas de optimización de concentración de sonda TaqMan® para reovirus (CFSV). La grafica A muestra concentraciones entre 50nM y 200nM..	57
Figura 13. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasma 16SrIII-L utilizando diluciones seriadas.....	61
Figura 14. Curva de calibración utilizada para cuantificación relativa de fitoplasma 16SrIII-L.....	61
Figura 15. Sensibilidad de qPCR para fitoplasma.....	61
Figura 16. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de reovirus (CFSV).....	62
Figura 17 . Curva de calibración utilizada para cuantificación relativa de reovirus (CFSV)..	62
Figura 18. Sensibilidad de prueba de PCR con los estándares utilizados para la curva de calibración..	62
Figura 19. Gráfica de amplificación por qPCR de evaluación de cADN de laboratorio de Sanidad Vegetal del banco de germoplasma CIAT-Palmira.....	63

Figura 20. Curva de calibración utilizada para cuantificación relativa de reovirus (CFSV). Utilizando diluciones de cADN.....	64
Figura 21. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de reovirus (CFSV).....	64
Figura 22. Sensibilidad de prueba de PCR con los estándares utilizados para la curva de calibración.....	64
Figura 23. Determinación de la concentración de virus y fitoplasma en 11 genotipos de yuca con grado de severidad entre 4 y 5.	65
Figura 24. Concentración de los dos organismos asociados en cuatro tejidos diferentes en el genotipo 249-45.	70
Figura 25. Concentración de los dos organismos asociados en cuatro tejidos diferentes en el genotipo 289-25.....	72
Figura 26. Floema secundario en raíz y tallo.....	74
Figura 27. Síntomas grado 4 en la escala de severidad en algunos de los materiales utilizados para los ensayos de validación, correlación de síntomas.....	75
Figura 28. Experimento de correlación entre síntomas en raíces comerciales y detección de los dos agentes asociados (virus y fitoplasma)..	76
Figura 29. Distribución de los dos microorganismos en los diferentes tercios de la planta para virus y fitoplasma.....	77
Figura 30. Comparación de los porcentajes de detección para los dos microorganismos en tercio inferior, tercio medio, tercio superior.	78
Figura 31. Comparación entre la concentración de cada uno de los agentes asociados en las seis variedades evaluadas..	79
Figura 32 . Porcentaje de detección para las seis variedades evaluadas.	80
Figura 33 . Esquema de distribución de virus y fitoplasma.	80
Figura 34. Porcentajes de detección en semilla asexual de yuca.....	81
Figura 35. Peso de raíces en el aire (Kg) de los diferentes tratamientos.	83
Figura 36. Rendimientos por tratamiento.	84
Figura 37. Comparación entre número de raíces totales y enfermas para cada uno de los tratamientos.....	85
Figura 38. El número de raíces totales incluye tanto raíces enfermas como sanas para cada uno de los tratamientos.	86
Figura 39. Porcentaje de raíces afectadas en los diferentes tratamientos, Se determino teniendo en cuenta el número de raíces afectadas y sanas.....	87
Figura 40. Comparación entre el grosor de raíces enfermas y sanas para cada uno de los tratamientos.....	88
Figura 41. Comparación entre longitudes de raíces sanas y enfermas para cada uno de los tratamientos.	88
Figura 42. Medición de grosor de tocón o cuello de la raíz para cada uno de los tratamientos.....	89
Figura 43. Porcentaje de severidad para cada uno de los tratamientos..	90
Figura 44 . Correlación entre el porcentaje de severidad (psev) y Número de raíces afectadas (nra).....	92

Figura 45. Correlación entre el porcentaje de severidad (psev) y porcentaje de raíces afectadas (pora).	93
Figura 46. Correlación entre porcentaje de severidad (psev) y número de raíces sanas (nrs).	93
Figura 47. Correlación entre número de raíces (nrt) y número de raíces afectadas (nra). 94	
Figura 48. Correlación entre peso de raíces (pra) y grosor de raíces afectadas (gra).	95
Figura 49. Diagrama de componentes principales.	95

1. INTRODUCCIÓN

Este estudio hace parte de un proyecto macro del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural titulado “*Estrategia de Manejo sanitario y fitosanitario para mejorar la productividad en la cadena de yuca y su industria*”. El cual propone en uno de sus objetivos la certificación de semilla libre cuero sapo.

La enfermedad cuero de sapo de la yuca fue descrita por primera vez en Colombia en el año 1971, en el departamento del Cauca, y es considerada como uno de los problemas más perjudiciales para el cultivo de yuca puesto que afecta la producción de raíces, provocando pérdidas en el rendimiento del cultivo del 90% o más (Pineda *et al.*, 1983). La yuca es un eficiente productor de calorías y es la principal fuente de carbohidratos en la dieta de los colombianos. El producto final tiene gran aceptación en el mercado fresco, el almidón es de amplio uso y la comercialización de croquetas y chips ha aumentado considerablemente. Además la yuca seca se está usando en la producción de concentrados para animales. La yuca se adapta bien a un amplio rango de zonas ecológicas y produce rendimientos económicos aún bajo condiciones marginales para la mayoría de los cultivos. Las hipótesis más frecuentemente planteadas sobre el potencial de la yuca en la producción de alimentos balanceados, están basadas, primero, en las supuestas ventajas comparativas que tendría su cultivo en Colombia, por tratarse de un producto con origen en la América tropical, históricamente vinculado al país como cultivo en todos sus departamentos y alimento básico en la mayoría de las regiones. En segundo lugar, se estima que la yuca es un sustituto casi perfecto del maíz en la fabricación de alimentos balanceados, gracias a lo cual, la ampliación de su cultivo no solo reduciría la dependencia de las importaciones del cereal, sino que se convertiría en una actividad generadora de empleo e ingresos razonables para un importante segmento de la población rural (Ceballos, 2002).

Actualmente la enfermedad del cuero de sapo se encuentra en Colombia en las regiones yuqueras de los departamentos de Atlántico, Bolívar, Córdoba, Sucre, Magdalena, Arauca, Amazonas, Casanare, Meta, Vaupés, Quindío, Tolima, Huila, Cauca y Valle del Cauca, también se ha reportado en otros países, como Brasil, Costa Rica, Panamá, Paraguay, Perú y Venezuela. (Calvert, 1994).

La mayor diseminación de la enfermedad se dá por el uso de semillas vegetativas o estacas, provenientes de campos de yuca afectados. El problema es de grandes magnitudes, comportándose de una forma exponencial, puesto que, de una planta afectada en promedio se pueden tomar 10 estacas, que producirán en el segundo ciclo 10 plantas, al tercero 100 y al cabo de 5 años serán 10.000 plantas posiblemente infectadas con la enfermedad siendo una forma rápida de diseminación (Calvert, 1994).

Las investigaciones realizadas durante los últimos años han conducido a la evidencia de la presencia de un Fitoplasma perteneciente al grupo 16SrIII-L (Álvarez *et al.*, 2009) y/o virus de la familia reoviridae (Cuervo, 2008) como posibles agentes causales de la enfermedad. Sin embargo, no existe una clara correlación entre los síntomas observados

en raíces comerciales y la presencia del fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus Cassava Frog Skin Virus (CFSV), sesgando la certificación de semilla hacia la detección de solo uno de los dos microorganismos asociados; por otro lado los actuales métodos de diagnóstico: PCR anidado para fitoplasma (grupo 16Sr III-L) y Retro transcriptasa PCR para el reovirus (CFSV) incluyen complejos protocolos de extracción de ADN y RNAs respectivamente, que además de ser poco sensibles, inespecíficos y dispendiosos, originan falsos negativos en pruebas hechas en semillas con baja cantidad de inóculo, provenientes de plantas enfermas, debido a que los agentes asociados a la enfermedad no tienen una distribución uniforme en la planta, dificultando el proceso de certificación de semilla libre de la enfermedad.

La PCR en tiempo real es una herramienta ideal para la detección de virus y fitoplasmas de manera rápida, sensible y con una alta especificidad, por otro lado no requiere de una manipulación después de la amplificación, evitando de esta manera el uso de sustancias tóxicas como el bromuro de etidio y reduciendo el riesgo de contaminación cruzada.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se planteó para la presente investigación; determinar si existe una asociación entre el reovirus (CFSV) y el fitoplasma (grupo 16Sr III-L) en raíces comerciales con síntomas de la enfermedad, estrategia que permita certificar semilla libre de la enfermedad.

2.MARCO TEÓRICO

2.1 El cultivo de la yuca en Colombia

La yuca *Manihot esculenta* Crantz, junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituyen las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo. La yuca es originaria de América del sur, donde fue domesticada hace unos 5000 años y cultivada extensivamente desde entonces (Ceballos, 2002). En 2011 la producción de yuca en Colombia fue de 2.264.460 ton, con rendimientos de 10.1 ton/ha y con un área sembrada de 222.583 Ha (FAO, 2013).

En el país este cultivo se ubica en tierras cálidas y templadas, siendo las zonas más productoras la Costa Atlántica, especialmente en las regiones de sabanas, los Santanderes, el eje cafetero, Cauca, y los Llanos Orientales. Existen otras zonas productoras como son: La Amazonia, la Orinoquia, el occidente Colombiano (Antioquia, Caldas, Choco, Nariño, y Valle del Cauca).

En Colombia la yuca ha sido un componente importante de la dieta y la economía campesina tradicional, pero en los últimos años ha cobrado una mayor importancia como cultivo industrial debido a que sus uso no solo se ha limitado a la producción de almidón, sino que se ha también se ha extendido su uso a la producción de concentrados para animales y producción de biocombustibles (Ceballos, 2002).

2.2 La enfermedad del Cuero de Sapo en yuca

El Cuero de Sapo es una enfermedad que fue descrita por primera vez en 1971, en el departamento del Cauca. Es considerada como uno de los problemas más perjudiciales para el cultivo de la yuca puesto que afecta directamente la producción de raíces, provocando pérdidas en el rendimiento del orden del 90% o más (Pineda, 1983). Su origen, pudo ser en la región amazónica de Brasil o Colombia, afectando diferentes variedades de yuca cultivadas por las comunidades indígenas. En 1981 se reportó en la Costa Norte de Colombia, zona en la que fue llamada Mosaico caribeño, por los síntomas de mosaico que se presentan en las hojas de la variedad "Secundina". Investigaciones realizadas en el CIAT (Calvert, 1994). han demostrado que la sintomatología en raíces de plantas en el Amazonas y el mosaico caribeño correspondían a diferentes síntomas de la misma enfermedad. Se ha presentado en la mayoría de las regiones yuqueras de Colombia, incluyendo los Departamentos de Atlántico, Bolívar, Córdoba, Sucre, Magdalena, Arauca, Amazonas, Casanare, Meta, Vaupés, Quindío, Tolima, Huila, Cauca y Valle del Cauca. También se ha reportado en los países de Brasil, Costa Rica, Panamá, Perú, Venezuela (Calvert, 1994) y Paraguay (Alvarez, 2013).

La expresión de síntomas varía de acuerdo a la temperatura y al genotipo. Los síntomas o señales de la enfermedad en muchas variedades sólo se expresan en las raíces y únicamente se observan cuando se cosechan las plantas. Generalmente no presentan síntomas, en ramas, ni hojas; algunas variedades como CM 6740-7 conocida comúnmente como "La Reina", y " Mcol 2063 conocida comúnmente como Secundina" - presentan síntomas tipo mosaico y crespera, difícilmente distinguibles bajo condiciones de campo por cuanto se confunden con daño ocasionado por ácaros, trips, deficiencias de elementos menores o toxicidad de herbicidas; además de enmascarse bajo condiciones de temperatura mayores de 30°C (Calvert & Cuervo, 2002).

Los síntomas de la enfermedad consisten en pequeñas fisuras longitudinales, localizadas cerca del tallo donde se originan las raíces; posteriormente, las fisuras se prolongan a lo largo de las raíces. A medida que las raicillas aumentan de diámetro las fisuras tienden a cicatrizar, dando a las lesiones forma de labio. Cuando las raíces maduran, las lesiones aumentan en tamaño y número semejando, en conjunto; una especie de red o panal. La cáscara o epidermis de la raíz presenta una apariencia corchosa que se desprende con facilidad. Dependiendo de la severidad de los síntomas, la profundidad y el número de las lesiones aumentan hasta deformar la raíz. Todos los síntomas descritos suelen presentarse a lo largo de la raíz o restringirse a la parte media de ésta (Calvert & Cuervo, 2002).

Las raíces pueden ser muy delgadas aunque no siempre y con menor contenido de almidón, el tocón y los tallos pueden ser muy gruesos. El aumento del grosor en la base del tallo está relacionado con la falta de acumulación de almidón en las raíces, características que pueden llevar a que estas plantas sean preferidas por el agricultor para la obtención de semilla vegetativa (Calvert & Cuervo 2002).

Las investigaciones realizadas durante los últimos años en el laboratorio de Fitopatología de Yuca y la Unidad de Virología del CIAT han confirmado la presencia de un fitoplasma (Álvarez *et al.*, 2009) y/o reovirus (Calvert *et al.*, 2008) como unas de las posibles causas de la enfermedad. El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar mediante un examen visual de las raíces, observando los síntomas característicos.

Durante mucho tiempo se ha utilizado como diagnóstico de la enfermedad la transmisión por medio de injertos, prueba que consiste en usar como patrón las plantas a evaluar y como injerto la variedad indicadora Secundina (Accesión CIAT, MCol 2063). La respuesta de cada genotipo ante el injerto, se evalúa bajo condiciones de invernadero con humedad relativa (HR): 80% y temperatura (T°): 20-25°C (día/noche), después de 3 o 4 semanas, los injertos deben ser revisados para verificar la presencia de síntomas tipo mosaico o decoloración foliar en el follaje de los cogollos, lo cual indica como positiva a la enfermedad la variedad o planta evaluada. (Cuervo, 2006).

Las metodologías basadas en marcadores moleculares con las cuales se obtuvieron las asociaciones con fitoplasma y/o virus, han permitido establecer dos métodos de diagnóstico, uno basado en cebadores específicos para el fitoplasma (grupo 16Sr III) mediante PCR anidado y otro basado en RT-PCR (RetroTranscriptasa PCR), que requieren de ciertos ajustes para ser implementados a mayor escala. Estos métodos son más confiables para la detección de los dos microorganismos y permiten la certificación de semilla para intercambio de germoplasma de yuca (Álvarez *et al.*, 2006; Cuervo, 2004).

Hasta el momento los resultados reportados de epidemiología y transmisión en campo, indican que la enfermedad del cuero de sapo se propaga de planta a planta; y los patrones de distribución en campo sugieren que la enfermedad es transmitida por un vector aéreo. La obtención de dos organismos asociados con la enfermedad hace suponer que el cuero de sapo se presenta como una asociación de más de un microorganismo, los cuales son transmitidos por semilla vegetativa y por insectos vectores del Sub orden Auchenorrhyncha. (CIAT, 2005).

Estudios realizados en el programa de mejoramiento de yuca del CIAT, indican que la frecuencia de la enfermedad ha ido en aumento en los valles de altitud media. La forma de diseminación de la enfermedad, sugiere que uno o más vectores están en estas zonas, pero no en otras regiones donde la enfermedad se ha mantenido en un nivel bajo como la Zona cafetera..

Investigaciones realizadas por Ángel y colaboradores (1990) reportaron a la mosca blanca *Bemisia tuberculata*, transmitiendo fitoplasma y virus en un bajo rango de eficiencia, sin embargo los resultados no fueron concluyentes, lo cual indica que el vector aun no ha sido identificado. Estudios realizados por CIAT, sugieren que hay un vector aéreo involucrado (CIAT, 2005).

Se considera que los estudios sobre grupos de variedades o clones, para seleccionar material genético tolerante o resistente a la enfermedad, es el método más apropiado, práctico, ecológico y deseable; para ser utilizado en el manejo integrado del cuero de sapo. Evaluaciones en campo e invernadero realizados en el CIAT permitieron identificar el genotipo M Per 183, como tolerante.

Desde 1995 la Unidad de Virología del CIAT ha evaluado la resistencia a cuero de sapo en la colección elite de germoplasma del CIAT conformada por 640 accesiones (líneas representativas de la colección de yuca del CIAT conformada por cerca de 6000 materiales)-(Banco de germoplasma de CIAT donde se conserva *in vitro* la mayor colección de yuca del mundo (CIAT, 2002). Los resultados de estas investigaciones muestran que la tolerancia a cuero de sapo en el germoplasma de yuca es muy amplia, conformada por más de 100 líneas tolerantes las cuales son fuentes potenciales de resistencia a la enfermedad. En los últimos años, 42 líneas con resistencia a cuero de sapo se han evaluado por sus características agronómicas y resistencia a otras plagas y enfermedades. Todas estas líneas catalogadas como resistentes a la enfermedad, han permanecido en como tal por lo menos ocho ciclos del cultivo sin mostrar ninguna sintomatología característica de la enfermedad (CIAT 2004).

2.3 Antecedentes de metodologías de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas y virus

Se han desarrollado diferentes metodologías para la detección de fitoplasma basados en PCR en Tiempo Real (Tabla 1) sin embargo no se ha desarrollado hasta el momento un método de PCR en Tiempo Real para la detección de fitoplasmas del grupo X disease (16SrIII), al cual pertenece el fitoplasma asociado con la enfermedad del cuero de sapo de la yuca.

No se ha reportado ninguna metodología basada en PCR en Tiempo Real para la detección de ningún virus de la familia *Reoviridae* en plantas (Tabla 2). Se han reportado para enfermedades causadas por esta familia de virus en humanos y animales (Fernández *et al.*, 2008; Adlhoch *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2010).

Tabla 1. Antecedentes de detección de fitoplasma con PCR en Tiempo Real.

Fitoplasma	Grupo 16Sr	Referencia
Onion yellows	16SrI	Wei <i>et al.</i> , 2004
Chrysanthemum yellows Phytoplasmas	16SrI	Marzachí and Bosco, 2005
Apple proliferation	16SrX	Baric and Dalla-Via, 2004; Jarausch <i>et al.</i> , 2004; Galetto <i>et al.</i> , 2005; Torres <i>et al.</i> , 2005
Flavescence dorée	16SrV	Angelini <i>et al.</i> , 2007; Margaria <i>et al.</i> , 2007; Hren <i>et al.</i> , 2007
Bois noir	16SrXII	Angelini <i>et al.</i> , 2007; Margaria <i>et al.</i> , 2007; Hren <i>et al.</i> , 2007
Aster yellows	16SrI	Angelini <i>et al.</i> , 2007; Margaria <i>et al.</i> , 2007; Hren <i>et al.</i> , 2007
Candidatus Phytoplasma mali	16SrX	Aldaghi <i>et al.</i> , 2007
Columbia Basin potato purple top phytoplasma	16SrVI	Crosslin <i>et al.</i> , 2006
<i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum	16SrX	Thebaud <i>et al.</i> , 2008
Universal		Christensen <i>et al.</i> , 2004; Galetto <i>et al.</i> , 2005

Tabla 2. Antecedentes de detección de virus con PCR en Tiempo Real.

Virus	Genero	Referencia
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	Roberts <i>et al.</i> , 2000; Boonham <i>et al.</i> , 2002
<i>Maize streak virus</i>	<i>Mastrevirus</i>	Lett <i>et al.</i> , 2002
<i>Potato yellow vein virus</i>	<i>Crinivirus</i>	Lopez <i>et al.</i> , 2006
<i>Grapevine leafroll-associated virus</i>	<i>Ampelovirus</i>	Monique <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrus tristeza virus</i>	<i>Closterovirus</i>	Susans <i>et al.</i> , 2007
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>	<i>Begomovirus</i>	Giovanna <i>et al.</i> , 2008
<i>Rice stripe virus</i>	<i>Tenuivirus</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Tobacco etch virus</i>	<i>Potyvirus</i>	Carrasco <i>et al.</i> , 2006
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	<i>luteovirus</i>	Balaji <i>et al.</i> , 2003
<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	<i>polerovirus</i>	Balaji <i>et al.</i> , 2003
<i>Plum pox virus</i>	<i>Potyvirus</i>	Aniko & Delano 2004
<i>Citrus leaf blotch virus</i>	<i>Citivirus</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2009
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	<i>Trichovirus</i>	Salmon <i>et al.</i> , 2002
<i>Banana streak virus</i>	<i>BaADNvirus</i>	Delanoy <i>et al.</i> , 2003
<i>Dahlia mosaic virus</i>	<i>Caulimovirus</i>	Nicolaisen., 2003
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	<i>Ilarvirus</i>	Marbot <i>et al.</i> , 2003
<i>Potato leafroll virus</i>	<i>Polerovirus</i>	Agindotan <i>et al.</i> , 2006
<i>Potato virusX</i>	<i>Potexvirus</i>	Agindotan <i>et al.</i> , 2006
<i>Potato virus A</i>	<i>Potyvirus</i>	Agindotan <i>et al.</i> , 2006
<i>Potato virus Y</i>	<i>Potyvirus</i>	Agindotan <i>et al.</i> , 2006
<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	<i>Polerovirus</i>	Korimbocus <i>et al.</i> , 2001

No se ha reportado ninguna metodología basada en PCR en Tiempo Real para la detección de ningún virus de la familia *Reoviridae* en plantas (Tabla 2) sin embargo existen metodologías basadas en serología, RT-PCR, e IC-PCR (Adlhoch *et al.*, 2011). Se han reportado para enfermedades causadas por esta familia de virus en humanos y animales (Fernández *et al.*,2008; Adlhoch *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2010).

En general todas las metodologías de PCR en Tiempo Real diseñadas para virus y fitoplasmas son sensibles y específicas permiten discriminar en algunos casos, dependiendo del tipo de sonda, hasta una sola base; sin embargo para el diseño de estas metodologías es necesario el conocer muy bien el microorganismo, las regiones conservadas del genoma de éste que permitan identificar con exactitud un microorganismo específico, tener un adecuado protocolo de extracción de ADN o RNA y determinar con exactitud el tejido de la planta donde está presente el microorganismo , aspectos muy importantes para detección de microorganismos en plantas asintomáticas.

2.4 Clasificación de fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular perteneciente a la clase mollicutes, clasificados dentro de orden *Acholeplasmatales*. Los fitoplasmas se caracterizan por colonizar el floema de las plantas y algunos insectos, causan síntomas como enanismos, amarillamientos, filodias y enrojecimientos prematuros entre otros.

Los fitoplasmas desde el año 2004 se agruparon dentro del nuevo género '*Candidatus* (Ca.) phytoplasma' agrupándose dentro de este nuevo género 25 especies, agrupadas según características moleculares como su homología (97.5%) con el gen 16Sr y características biológicas como vector que lo trasmite, rango de huéspedes y reacción a anticuerpos (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team., 2004)

La caracterización molecular de fitoplasmas se hace analizando los patrones de restricción (RFLP) utilizando 17 enzimas de restricción en amplificaciones del gen 16Sr los cuales se comparan con los de otros fitoplasmas que se encuentran reportados en la literatura como referencia (Lee *et al.*,1998). Dependiendo del patrón de restricción los fitoplasmas se pueden clasificar en 25 grupos y cerca de 41 subgrupos. Para nombrar el grupo primero se coloca el nombre del gen 16Sr, seguido por el grupo escrito en números romanos y el subgrupo en letras mayúsculas anteceditas por un guion medio (Lee *et al.*,1998). Por ejemplo el fitoplasma asociado al cuero de sapo de la yuca se clasifica como 16SrIII-L

Para una diferenciación de fitoplasmas mucho más específica y detallada se utilizan los genes *rp*, *secY*, *tuf*, *groEL* y 16S-23S rRNA para los cuales también existen patrones de restricción definidos mejorando la caracterización y clasificación de los fitoplasmas (Duduk & Betaccini., 2011).

2.5 La PCR en Tiempo real

La PCR en Tiempo Real permite medir los productos amplificados mientras están siendo acumulados (o en "Tiempo Real") y la cantidad de producto en un punto en el cual la reacción se encuentra en un rango exponencial. Durante la fase exponencial una señal umbral de fluorescencia es determinada para todas las muestras. Este umbral es calculado y graficado constituyendo el momento en el que la señal generada de la muestra se incrementa de manera exponencial. El número fraccional de ciclos de PCR requeridos para generar una señal fluorescente para alcanzar este umbral es definido a su vez como ciclo umbral o Ct (*Cycle Threshold*). Esos valores de Ct son proporcionalmente más altos cuando se parte de menos cantidad inicial de templado, relación que es empleada para calcular mediadas del número de copias de ADN (Ginzinger et al., 2002)

Los primeros estudios sobre la PCR en Tiempo Real fueron realizados por Higuchi y colaboradores en 1993, quienes describieron un ensayo cuantitativo para una secuencia específica de ADN. En el estudio se utilizó una cámara de video para monitorear múltiples reacciones en cadena de la polimerasa durante el transcurso de la amplificación, lo cual fue posible con la adición a la reacción de bromuro de etidio y así poder detectar la acumulación de ADN de doble cadena en cada ciclo de PCR, midiendo el incremento de la fluorescencia del bromuro de etidio intercalado en el ADN. Años más tarde esta innovación fue automatizada con el desarrollo de termocicladores especiales y diferentes software permitiendo el desarrollo de formatos de detección en Tiempo Real de productos de PCR por medio de novedosos fluorocromos.

En términos generales la PCR en Tiempo Real comparte características de una PCR convencional. Sin embargo, presenta diferencias como el uso de fluorocromos durante la reacción, para determinar el incremento de la fluorescencia en cada ciclo de amplificación.

2.6 Fluorocromos utilizados en la PCR en tiempo real:

Existen dos grupos de fluorocromos para monitorear la cantidad de producto de PCR en Tiempo Real: el primer grupo está conformado por los fluorocromos intercalares en el ADN, se unen a la doble hélice del ADN. El segundo es denominado sondas de hidrólisis y son mucho más específicas.

2.6.1 Fluorocromos intercalares

A este grupo pertenece el SYBR Green el cual al excitarse emite fluorescencia únicamente cuando se intercala en ADN de doble cadena. Por esta razón a medida que se aumenta el producto de PCR se observa mayor fluorescencia. Sin embargo, el SYBR Green puede unirse a productos inespecíficos de PCR como dímeros y ADN no objetivo,

por esta razón los resultados se pueden analizar en un gráfico de la fluorescencia en función de la temperatura o curva de disociación. La especificidad con esta tecnología se limita a los cebadores; sin embargo, ésta es fácil de usar, económica y es la ideal para optimizar condiciones de PCR (Stratagene, 2007).

Los productos inespecíficos se pueden observar mediante la curva de disociación, la cual muestra la fluorescencia en función de la temperatura, observándose amplificaciones con Ct tempranos y temperaturas de disociación (T_m) bajas.

La temperatura de disociación se define como la temperatura a la que el 50 % del ADN es denaturado, por tal motivo ésta varía dependiendo de la longitud y composición del amplicon (Stratagene, 2007).

2.6.2 Sondas de hidrólisis

Tienen una mayor especificidad en comparación con el SYBR Green debido a que si en la muestra no se encuentra ADN blanco la sonda no se hibrida, además otorga una mayor sensibilidad, a este grupo pertenecen las sondas: TaqMan[®], Molecular Beacon, , sondas FRET. Las más utilizadas son las sondas TaqMan[®], esta tecnología se basa en la acción 5' exonucleasa de la Taq Polimerasa, la cual hidroliza cualquier nucleótido presente en el amplicon. (Stratagene, 2007).

Las sondas TaqMan[®] son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Estas sondas son diseñadas para hibridar con una región complementaria, cuando se inicia la extensión la acción exonucleasa de la Taq polimerasa hidroliza el fluorocromo donador emitiendo fluorescencia. La fluorescencia se incrementa en cada ciclo dependiendo de la cantidad de ADN blanco presente en la muestra (Ginzinger et al., 2002).

Existen diferentes variaciones de la sonda TaqMan[®] como lo son: las MGB (Minor Groove binder), las cuales tienen una fracción de unión al surco menor del ADN en el extremo 3' permitiendo que la hibridación sea más estable. El efecto estabilizador hace que la secuencia de la sonda sea más corta (hasta ~ 13 pb). Una sonda más corta induce el aumento de la temperatura de melting incrementando la sensibilidad y discriminando una diferencia hasta de un nucleótido. Existen también las sondas LNA (Locked Nucleic Acids), las cuales aumentan la estabilidad de la hibridación, la especificidad y permiten una mayor flexibilidad en el diseño de secuencias problemáticas (Sugden, 2005).

Las sondas Molecular Beacon tiene forma de bucle, lo que permite que el donador este muy cerca del receptor, generándose fluorescencia únicamente cuando hibrida con la secuencia de interés. Esta sonda no necesita de la acción exonucleasa de la Taq polimerasa y la reacción tiene un efecto reversible, es decir que en cada ciclo de amplificación, las sondas se reciclan. Las sondas Scorpion[®] funcionan bajo el mismo principio de las Molecular Beacon, pero en este caso, la sonda esta unida al cebador, lo que ofrece una mayor especificidad (Sugden, 2005).

2.7 Métodos de cuantificación en PCR en Tiempo Real

Existen dos métodos para conocer el número de copias de una muestra: cuantificación relativa y cuantificación absoluta. La cuantificación absoluta relaciona la señal de PCR para determinar el número de copias usando una curva de calibración, mientras que la cuantificación relativa mide las cantidades con relación a un gen de referencia.

La cantidad de ADN interés obtenido al final de la reacción de PCR y la eficiencia de la reacción pueden ser determinados utilizando la ecuación:

$$X_n = X_0(1+E)^n$$

En donde X_n es la cantidad de ADN blanco obtenido en el ciclo n ; X_0 es la cantidad inicial de ADN; E es la eficiencia de la amplificación; y n = numero de ciclos. Cuando la eficiencia es perfecta tiene un valor de 100%, lo que quiere decir que por cada ciclo se obtienen dos copias del ADN de interés (Stratagene, 2007).

2.7.1 Método de cuantificación absoluta

La cuantificación por medio de estándares externos es denominada cuantificación absoluta, debido a que permite identificar un número determinado de moléculas de ADN (o cADN). En este método se comparan las amplificaciones de las muestras de ácidos nucleídos de interés, con las amplificaciones de la curva estándar preparada con concentraciones conocidas de la misma secuencia de interés. La curva estándar debe tener un comportamiento lineal y debe abarcar todas las amplificaciones de la muestra problema (Roche molecular biochemicals, 2000). La curva estándar al tener un comportamiento lineal debe tener una pendiente cercana a -3.32 (negativo porque un C_t (threshold cycle o ciclo del umbral) alto significa baja cantidad de ADN blanco en la muestra) y eficiencia cercana al 100%. La eficiencia se calcula con la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

Son aceptables valores con eficiencias entre 90%-110%, el valor de R^2 de la curva debe ser superior a 0.985, lo que indica el grado de ajuste de la recta (Stratagene, 2007).

El fundamento matemático de esta técnica parte de conocer X_n , y la eficiencia de la amplificación E para calcular X_0 . Al generar la curva estándar se pueden obtener valores de pendiente e intercepto para determinar X_n y la eficiencia, para desarrollar la ecuación ($X_n = X_0(1+E)^{ct}$ ct = ciclo en el cual la fluorescencia tiene un incremento exponencial y

determinar X_0 . Esto lo hace automáticamente el software para PCR en Tiempo Real (Stratagene, 2007).

Mediante la cuantificación absoluta los resultados finales pueden ser expresados en términos de copias por célula, copias por unidad de cuantificación de ácidos nucleicos iniciales, copias por gramo de tejido, etc. La precisión de los resultados de la cuantificación por este método, dependen de la precisión de los estándares, incluyendo su diseño, producción, y determinación exacta de la concentración de este, así como su estabilidad en el tiempo y almacenaje (Pfaff, 2004).

Una de las limitaciones de esta metodología es que no toma en cuenta los inhibidores de la PCR que pueden estar presentes en la muestra. Los estándares y la muestra deben amplificar eficiencias idénticas (Roche molecular biochemicals, 2000).

La curva estándar está basada en una serie de diluciones del estándar, el cual debe contener la misma secuencia que el gen a amplificar, y a su vez se debe conocer la concentración inicial o número de copias iniciales del mismo. Los estándares se amplifican conjuntamente con las muestras. Las moléculas estándar pueden ser ADN recombinante en plásmidos, productos de PCR, u oligonucleótidos sintéticos (Pfaff, 2004).

2.7.2 Métodos de cuantificación relativa

La cuantificación relativa estima el número de copias o los niveles de ARN de un gen con relación a un control interno ADN o RNA. Este gen de referencia es un gen *housekeeping* y puede ser amplificado en un ensayo multiplex en un mismo tubo o puede ser amplificado en tubos separados. Este método permite calcular las cantidades relativas de ADN blanco sin la necesidad de una curva estándar (Stratagene, 2007).

Los resultados son calculados como “cantidad relativa al calibrador”, donde el calibrador tiene un valor arbitrario de 1 y todas las muestras son expresadas en términos de la diferencia de Ct con el estándar.

Es importante aclarar los siguientes términos de cuantificación relativa: Estándar: es una muestra de cantidad de la secuencia de interés conocida; gen de referencia: es utilizado para normalizar los datos por ejemplo un gen endógeno (*housekeeping*); calibrador: es una muestra usada como base para la comparación de resultados.

El método principal para la cuantificación relativa es el método de $\Delta\Delta$ Ct. En el cual se requiere un control endógeno y un calibrador, y se caracteriza por eficiencias de PCR iguales entre el gen de interés y el control endógeno preferiblemente superior al 90%. El método parte de dos premisas: la primera considera que si todas las amplificaciones son generadas con la misma eficiencia, la diferencia (Δ Ct) entre el Ct para determinado gen y el Ct para un gen control endógeno es constante, independientemente de la cantidad de ADN total. La segunda premisa establece que se puede asumir que la eficiencia de un ensayo es consistente entre una corrida y otra.

Este método de cuantificación utiliza la fórmula (Stratagene, 2007):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen endógeno}} - Ct_{\text{normalizador}})_{\text{calibrador}} - (Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{gen endógeno}})_{\text{muestra}}$

2.8 Importancia de la PCR en tiempo real para la detección de fitopatógenos

Los métodos convencionales de identificación de patógenos han dependido generalmente de la identificación de síntomas de la enfermedad, aislamiento y cultivo de los organismos mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y microscopía (Agrios, 2005). Las mayores limitantes de estas estrategias basadas en la morfología de los agentes causantes de la enfermedad, son la capacidad del organismo a ser cultivado, el tiempo requerido y el requerimiento de amplia experiencia taxonómica. Además, el diagnóstico de enfermedades de plantas puede ser aun más difícil cuando se trata de material de propagación vegetativa asintomático tales como material de vivero a ser utilizado en la producción de injertos en árboles frutales o en el caso de tubérculos de papa, estacas de yuca, etc (Agindotan *et al.*, 2006).

El uso de métodos moleculares puede resolver muchas de estas deficiencias. En consecuencia, hay avances significativos en el área de la detección molecular de fitopatógenos en las últimas tres décadas. La llegada de la detección basada en anticuerpos, los anticuerpos monoclonales y la técnica de ELISA, fueron un punto de partida importante en virología y bacteriología. Luego le siguieron las tecnologías basadas en el ADN, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual revolucionó el diagnóstico molecular y las ciencias biológicas (Baric *et al.*, 2006).

En la última década, el rango de problemas que pueden ser diagnosticados utilizando PCR ha crecido enormemente. La alta flexibilidad y variaciones de aplicación específica en el han permitido el desarrollo de muchas variantes de la PCR adaptadas a un rango amplio de aplicaciones. La PCR convencional ha sido mejorada por medio de la introducción de la PCR de segunda generación, conocida como PCR en tiempo real, en la cual es posible la detección de patógenos por fluorescencia en tubos cerrados y la cuantificación durante la amplificación de la PCR (en tiempo real), eliminando así la necesidad de etapas laboriosas de procesamiento de muestras posteriores a la PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación (Sugden *et al.*, 2005).

Con el uso de la PCR en tiempo real es posible, no solo detectar la presencia o ausencia del patógeno problema, también es posible cuantificar el patógeno y desarrollar PCR múltiple teniendo la capacidad de detectar en una misma muestra hasta tres patógenos al mismo tiempo, lo cual ahorra tiempo dando un diagnóstico oportuno, lo cual es crucial para estimar los riesgos potenciales con respecto al desarrollo de la enfermedad y provee bases útiles para la toma de decisiones en el manejo de la misma (Crosslin *et al.*, 2006).

Los cultivos pueden ser atacados por muchos patógenos, los cuales adicionalmente, ocurren frecuentemente en complejos. Por lo tanto, muchas aplicaciones de diagnóstico de enfermedades requieren la detección simultánea y la cuantificación de varios patógenos. Sin embargo las limitaciones metodológicas, son en muchos casos la razón para desarrollar pruebas diseñadas para pocos patógenos (Simplex). La tecnología de los Microarreglos y Macroarreglos de ADN, originalmente diseñada para estudiar expresión génica y generar polimorfismo de perfiles de un solo nucleótidos (SNP), actualmente es una tecnología emergente para el diagnóstico de patógenos, la cual en teoría, ofrece una plataforma de capacidad múltiple ilimitada (Multiplex). Esta tecnología origina un cambio en el diagnóstico molecular. (Lievens et al., 2005).

Recientemente se ha diseñado una técnica llamada Nicking Enzyme Amplification Reaction (NEAR) o amplificación enzimática de corte, la cual es una técnica sensible, rápida, puede discriminar hasta un nucleótido, no requiere de extracciones complejas de ácidos nucleídos y tarda en dar el resultado de 5 a 10 minutos a una temperatura constante. NEAR utiliza sondas tipo molecular Beacon, nucleótidos, la enzima Taq Polimerasa, enzimas que abren una parte de la doble hélice y el equivalente a los cebadores usados en la PCR (Spenlinhauer et al., 2009).

El crecimiento rápido de la base de datos generada por investigaciones sobre genómica y biosistemática provee oportunidades únicas para el diseño de pruebas moleculares más versátiles, de alto rendimiento, sensibles y específicas las cuales podrían resolver las mayores limitaciones de las tecnologías actuales y beneficiar a la fitopatología.

Sin embargo, mientras la especificidad y sensibilidad en la detección de patógenos se ha mejorado grandemente y la detección de los patógenos se ha hecho más simple y rápida; aunque persisten algunos problemas de naturaleza técnica y económica, los cuales requieren ser resueltos para asegurar la emergencia de un sistema de detección confiable que sirva para aplicaciones rutinarias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Diseñar una metodología sensible y específica para el diagnóstico de la enfermedad del cuero de sapo de la yuca para la certificación de semilla.

3.2 Objetivos específicos.

- Diseñar y optimizar sondas (TagMan®) y cebadores específicos para la detección de fitoplasma del subgrupo 16Sr III-L y el reovirus (CFSV).
- Evaluar la correlación entre los síntomas encontrados en raíces comerciales a partir de la presencia del fitoplasma (16Sr III-L) y el reovirus (CFSV).
- Estimar la posible distribución de los dos agentes asociados con la enfermedad en semilla vegetativa y en la planta.

4. JUSTIFICACIÓN

La mayor diseminación de la enfermedad del cuero de sapo se dá por el uso de semillas vegetativas o estacas, provenientes de campos de yuca afectados. El problema es de grandes magnitudes, dándose de una forma exponencial, ya que de una planta afectada en promedio se pueden tomar 10 estacas, las que en el segundo ciclo produzcan 10 plantas, al tercero 100 y al cabo de 5 años serán 10.000 plantas posiblemente infectadas con la enfermedad siendo una forma rápida de diseminación. La otra forma de diseminación de la enfermedad según los resultados reportados (CIAT, 2005) de epidemiología y transmisión en campo, indican que la enfermedad del cuero de sapo se propaga de planta a planta; y los patrones de distribución sugieren que la enfermedad es transmitida por un vector aéreo hasta el momento desconocido, razón por la cual no se

pueden tomar o diseñar estrategias de manejo integrado de plagas para evitar la propagación de la enfermedad. (CIAT, 2005).

La única medida de control de la enfermedad es sembrar semilla proveniente de plantas sin síntomas en las rices comerciales, la medida es práctica para plantaciones pequeñas pero para las grandes extensiones resulta demorado y costoso para el agricultor, lo cual hace necesaria una metodología rápida, sensible y específica que permita detectar fácilmente la presencia de los microorganismos y así poder producir semilla certificada.

Es muy importante tener en cuenta que el mayor riesgo de diseminar la enfermedad está en el uso de materiales de propagación infectados, por tanto el control de la misma es fundamental en el empleo de semilla procedente de plantas madre sanas.

Conocer la correlación entre los síntomas observados en raíces comerciales y la presencia del fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV) va a permitir dirigir el método de diagnóstico para certificación de semilla hacia el microorganismo directamente relacionado con la enfermedad o hacia los dos microorganismos, evitando de esta manera sesgos en el diagnóstico.

Es necesaria una metodología para la certificación de germoplasma de yuca para cuero de sapo teniendo en cuenta que el banco de germoplasma del CIAT se encuentran conservados *invitro* la mayor colección de yuca del mundo y moviliza germoplasma a diferentes países.

El desarrollo de una metodología de diagnóstico para cuero de sapo va a facilitar la identificación del posible vector aéreo de la enfermedad, aportando una importante herramienta para el manejo integrado dirigida al control del insecto vector.

Por otro lado, el cuero de sapo, no sólo es una enfermedad limitante para los agricultores a quienes les genera pérdidas de hasta 100%, sino también para mejoradores, entomólogos y fisiólogos; afectando los trabajos enfocados en la búsqueda de mejorar los rendimientos de las variedades y asegurar la estabilidad de la producción. Estos problemas se presentan debido al poco conocimiento que se tiene sobre el agente causal, prácticas de manejo y desconocimiento de los síntomas en etapas iniciales de la enfermedad.

Sumado a esto, se debe tener en cuenta que en los programas de mejoramiento en yuca, el factor –continuidad- es particularmente importante porque cada ciclo de selección es muy prolongado, requiriéndose hasta 5 años. Durante este ciclo se mantiene un riesgo constante de perder materiales con importantes características como rendimiento, resistencia a plagas, carotenos, materia seca, almidón, etc., debido a ataques severos de la enfermedad, que cortan y retrasan el ciclo, obligando a establecer cuarentenas, vedas y limpiar materiales mediante cultivo de tejidos, convirtiéndose procesos costosos y que requieren de mucho tiempo.

En la búsqueda de herramientas y metodologías eficientes para la certificación de semilla y manejo de esta enfermedad, las investigaciones se centran en técnicas moleculares que permitan la detección del patógeno en plantas asintomáticas. La PCR en tiempo real es una herramienta sensible permitiendo la detección en plantas asintomáticas o con títulos bajos del patógeno no detectables con cualquier otro método. Por otro lado la técnica de qPCR presenta una alta especificidad para la detección de microorganismos, además de ser rápida y no presentar una alta sensibilidad a los inhibidores de la PCR. En comparación con la PCR normal, no requiere de una manipulación de las muestras luego

del PCR reduciendo el riesgo de contaminación cruzada y permite la cuantificación del patógeno lo cual aporta herramientas y ayuda en la toma de decisiones para el manejo de la enfermedad.

5. METODOLOGÍA

5.1 Localización del estudio

Este estudio fue realizado en los laboratorios y casas de malla del Centro Internacional de Agricultura Tropical ubicado en Palmira, Valle del Cauca. El experimento de campo fue sembrado en el Centro Experimental de la Universidad Nacional Sede Palmira.

5.2 Recolección de material vegetal

El material de yuca compuesto de raíces con síntomas característicos de la enfermedad, además de hojas y tallos se colectó en las principales zonas productoras de yuca en el país con presencia de la enfermedad, como son los Llanos Orientales, la Costa Atlántica, Cauca y Valle del Cauca.

5.3 Diseño de sonda TaqMan® y cebadores para detección de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV).

La sonda y cebadores para la detección del fitoplasma 16SrIII-L asociado con el cuero de sapo de la yuca, se diseñaron basados en el gen *rp*, dentro de una región de 1200 bp que se ubica en las posiciones *rps* 19 hasta *rps* 3, que codifican para proteínas ribosomales. Este gen es utilizado para la clasificación taxonómica de fitoplasmas, debido a que es altamente conservado y tiene un menor número de características similares con bacterias gram positivas y entre los diferentes *Candidatus* phytoplasma (Lim & Sears., 1992; Martini et al., 2007), lo que otorga una mayor especificidad a la sonda y cebadores diseñados.

En el diseño de la sonda y los cebadores para la detección del virus asociado con la enfermedad del cuero de sapo de la yuca, se utilizó, el segmento RNA 4 en el cual está ubicado el gen de la polimerasa, altamente conservado permitiendo conocer fácilmente diferencias genéticas y es utilizado en estudios de variabilidad (Cuervo., 2006)

Una vez identificados los genes con base en los cuales se diseñaron las sondas y cebadores, se amplificaron las dos regiones mencionadas utilizando PCR anidado para el fitoplasma 16SrIII-L y RT-PCR para el reovirus (CFSV), con el fin de obtener secuencias de los dos microorganismos.

5.3.1 Extracción de RNAdc y ADN

La extracción de ADN de las hojas y raíces se hizo siguiendo el método propuesto por Price *et al* (1993) utilizando las nervaduras de las hojas, de las raíces se realizó un raspado sobre el floema secundario. Para la extracción de RNAdc se siguió el protocolo propuesto por Cuervo (2006) utilizando tejido de raíces, tallos y hojas.

5.3.2 PCR anidado y RT-PCR

Para la detección del fitoplasma se utilizó la técnica de PCR anidado, utilizando los cebadores P1/P7 (Smart *et al.*, 1996) para la PCR 1, los cuales amplifican un fragmento de 1785 bp ubicado en la región 16S rRNA y parte del 23S rADN y los cebadores R16R2/R16F2N (Gundersen *et al.*, 1996) para la segunda PCR que genera un amplicón de 1200 bp.

Las condiciones del PCR anidado fueron: 1X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.32U de Taq polimerasa, 0.4 moles de cebadores y 1 µl de ADN extraído de hojas, tallos y raíces a concentración de 20 ng en un volumen final de 25 µl. El perfil de amplificación consistió en denaturación inicial a 94°C por 1 minuto y 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, hibridación 50°C durante 2 minutos y extensión a 72 por 3 minutos, seguido de una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Para la segunda PCR se tomó 1 µl del amplificado y se diluyó en 29 µl de agua, posteriormente se utilizó 1 µl de la dilución para la segunda amplificación con los cebadores universales R16R2/R16F2N y las mismas condiciones del primer PCR.

Los productos de la amplificación utilizando las condiciones de la PCR 1 obtenidos con los cebadores R16R2/R16F2N se utilizaron para hacer un RFLP con las enzimas de restricción *Mse* I, *Hha*I y *Hpa*II, y así confirmar la identificación del fitoplasma como perteneciente al grupo 16Sr III (Lee *et al.*, 1998).

Una vez confirmado que las muestras presentaban los patrones característicos de los fitoplasmas del grupo 16SrIII, se hizo un PCR anidado del gen *rp* utilizando los cebadores rpF1/rpR1 para la PCR 1 (Lim & Sears., 1992; Martini *et al.*, 2007) y rp(III)F1/rp(III)R1 para la PCR 2 (Martini *et al.*, 2007). Las condiciones de PCR fueron las mismas utilizadas para los cebadores P1/P7 y R16R2/R16F2N, excepto el perfil de amplificación el cual consistió en una denaturación inicial de 94°C por 1 minuto y 38 ciclos a 94°C por 1 minuto, hibridación 55°C durante 2 minutos y extensión a 72 por 3 minutos, seguido de una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Para la detección del reovirus, se utilizó la técnica de RT-PCR de acuerdo al protocolo descrito por Cuervo (2006), para la retrotranscripción se utilizó la enzima Affinity Script QPCR cADN Synthesis Kit (Stratagene) incubando 25°C por 5 min, seguido 42°C por 15 min, y finalmente a 95°C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.2% en cámara de electroforesis horizontal.

5.3.3 Secuenciación y edición de secuencias

Una vez se obtuvieron los productos del PCR, tanto de fitoplasma como del reovirus (CFSV), estos se enviaron a secuenciar a la Universidad de Iowa State al departamento de ADN Facility. Para la edición de las secuencias se utilizó el Software Chromas Pro (versión 1.49 beta) (Hren et al., 2007).

Para el fitoplasma 16Sr III-L, se hicieron cuatro tipos de alineamientos a partir de los genes *rp* y 16S rRNA reportadas en GenBank utilizando el software MEGA 4.1. Estos cuatro alineamientos se deben hacer con el fin de encontrar las regiones más adecuadas para el diseño de las dos sondas, una del gen 16S RNA y otra del gen que codifica para la proteína *rp*, buscando la mayor especificidad posible. En el primer alineamiento se incluyeron todas aquellas secuencias presentes en el GenBank y que han sido obtenidas a partir del gen 16S rRNA de todos los grupos de fitoplasmas. En el segundo alineamiento se incluyeron las secuencias de los fitoplasmas del grupo 16Sr III incluidas las reportadas para el fitoplasma asociado con el cuero de sapo. En el tercer alineamiento se incluyeron secuencias obtenidas a partir de un gen que codifica para una proteína ribosomal llamada *rp*, tomando solamente secuencias de fitoplasmas que no pertenecen al grupo 16SrIII; por último se hizo un cuarto alineamiento igual que el anterior pero solo con los fitoplasmas del grupo 16SrIII.

Para el reovirus se hicieron alineamientos con el programa MEGA 4.1 usando las 39 secuencias reportadas por Cuervo (2006) (pertenecientes al segmento 4 donde se encuentra el gen de la polimerasa, el cual es altamente conservado) y otras secuencias obtenidas a partir de RT-PCR de tejidos de plantas con los síntomas característicos de la enfermedad.

5.3.4 Diseño de la sonda TaqMan® y de los cebadores

Para el diseño de las sondas y los cebadores se utilizó el Software Beacon Designer 7.5 (Premier Biosoft International). El diseño de la sonda y de los cebadores para la detección del fitoplasma 16SrIII-L se hizo a partir de los resultados de los cuatro alineamientos descritos anteriormente. Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones, cebadores y sondas para el virus y el fitoplasma, se confirmó la especificidad utilizando la herramienta BLAST (Hren *et al.*, 2007).

5.4 Optimización de la concentración de los cebadores y la sonda TaqMan[®] y determinación de especificidad.

5.4.1 Optimización de la concentración de los cebadores

La concentración óptima de los cebadores se determinó utilizando una matriz de 4x4 de 200, 300, 400 y 600nM con el fin de lograr la amplificación más temprana (menor valor de Ct), alta fluorescencia, mayor reproducibilidad de los resultados. Para estas pruebas se utilizó el fluorógeno SYBR Green. (Korimbocus *et al.*, 2001).

5.4.2 Optimización de la concentración de la sonda TaqMan[®]

Se evaluaron concentraciones de sonda desde 50nM hasta 400nM con incrementos cada 50 nM, buscando la mayor reproducibilidad de los resultados, el menor valor de Ct y la mayor fluorescencia (Mumford *et al.*, 2000).

5.4.3 Evaluación de especificidad las sondas TaqMan[®] y de los cebadores

Se evaluó la especificidad de las dos parejas de cebadores y de las sondas TaqMan[®] diseñados para la detección del fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus (CFSV) con el fin de observar la presencia o no reacciones de cruzadas con otros grupos de fitoplasmas y otros microorganismos como virus, bacterias, hongos o ADN procedente de plantas sanas e insectos (Angelini *et al.*, 2007).

La especificidad de los cebadores y de la sonda TaqMan[®] diseñados para el fitoplasma 16SrIII-L se evaluó frente a los grupos de fitoplasmas: 16SrI (*Aster yellow*), 16SrII (*Peatunt WB*), 16SrIII (*X disease*), 16SrIV (*Lethal yellow*), 16SrV (*Elm yellows*), 16SrVI (*Periwinkle virescence*), identificados en estudios previos realizados por Assunta Berttaccini de la Universidad de Bologna, Italia.

La especificidad de los cebadores y de la sonda TaqMan[®] diseñados para la detección del reovirus (CFSV) se evaluó utilizando RNA y ADN de diferentes familias de virus como Carmovirus, Potyvirus, Potexvirus, Foveavirus y Comoviridae suministrados por la unidad de Virología del CIAT.

Se evaluó también ADN de bacterias, hongos, tejido sano y RNA de posibles insectos vectores.

5.5 Determinación de la sensibilidad y cuantificación relativa utilizando estándares externos de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV)

5.5.1 Construcción de estándares externos para cuantificación.

Los estándares externos se construyeron para generar curvas de calibración que permitieron cuantificar, determinar la sensibilidad y la eficiencia de las dos parejas de cebadores y sondas diseñadas (Torres *et al.*, 2005).

5.5.2 Amplificación de fitoplasma 16Sr III-L y reovirus (CFSV)

Para la construcción de los estándares externos del fitoplasma 16SrIII-L se utilizó tejido de hojas y raíces infectadas con cuero de sapo; para la extracción de ADN se siguió el protocolo descrito por Price *et al* (1993), posteriormente el ADN se diluyó a una concentración de 20 ng.

Para el PCR anidado se utilizaron los cebadores rpF1/rpR1 para la primera PCR (Lim & Sears.,1992; Martini *et al.*, 2007) y rp(III)F1/rp(III)R1 para la segunda PCR (Martini *et al.*, 2007). Las condiciones de amplificación fueron las mismas descritas anteriormente.

Para la extracción de RNAdc y posterior amplificación por RT-PCR se siguió el protocolo descrito por Cuervo (2006). Para los estándares externos del reovirus (CFSV) se hicieron diluciones seriadas del cADN sintetizado.

5.5.3 Ligación y clonación de productos de PCR

Los productos de PCR de los dos microorganismos se clonaron utilizando el vector pGEM-T[®] Easy vector (Promega), para la ligación se siguieron las recomendaciones del fabricante. Para la purificación del plásmido se utilizó el kit QIAprep[®] miniprep (Qiagen GmbH, Germany). El plásmido extraído se utilizó para hacer diluciones seriadas 1:10 con ADN de plantas sanas provenientes de cultivo *invitro* (Torres *et al.*, 2005).

Para cada set de cebadores y sonda diseñados se evaluaron las diluciones 1×10^{-1} hasta 1×10^{-10} con tres réplicas por dilución y tres corridas en diferentes momentos con el fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados, la eficiencia y el R^2 .

Para cuantificar la cantidad de los microorganismos en el tejido enfermo se utilizó la cuantificación relativa, para lo cual se prepararon estándares externos, utilizando como unidad de medida el número de copias del plásmido, calculado con base en el peso molecular, usando la siguiente fórmula de número de copias= (Cantidad en nano gramos X número de Avogadro)/longitud del plásmido en pares de bases X 1 X 10^9 X 660 daltons) (Tatineni *et al.*, 2008).

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Concentración en nanogramos} \times \text{número de Avogadro}}{\text{Longitud del plásmido en pares de bases} \times 1 \times 10^9 \times 660 \text{ daltons}}$$

5.6 Condiciones de amplificación de PCR en tiempo real para fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV)

Para las amplificaciones se utilizaron placas ópticas de 96 pozos en un termociclador Mx3005P® (Stratagene, La Jolla, CA, USA) con perfil de amplificación estándar Fast Two Step que consiste 95°C por 15 minutos, 40 ciclos 95°C por 10 segundos y 60°C por 30 segundos.

Para la amplificación del ADN del fitoplasma 16SrIII-L se utilizó un volumen de 25 µL por reacción compuesto de 1 µL de ADN, 30nM de Reference Dye, 12.5 µL de SYBR® Green Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Para el reovirus (CFSV) se realizó una retrotranscripción con la enzima Affinity Script QPCR cADN Synthesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) utilizando las siguientes condiciones 7.4 µl de RNAd, 0.8 µl del cebador R1067, la reacción se incubó por 3 minutos a 100°C y en hielo por al menos 4 minutos, posteriormente se adicionaron 10 µl de mezcla maestra de la enzima y 1 µl de enzima Affinity Script QPCR cADN Synthesis, la reacción se incubó a 25°C por 5 minutos, 42°C por 15 minutos y 95°C por 5 minutos.

Para la PCR en tiempo real para los dos microorganismos se utilizó un volumen por reacción de 25 µL, que contiene 2 µL de cADN, 30nM de Dye de referencia, 12.5 µL de SYBR® Green mezcla maestra (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

5.7 Validación de PCR en tiempo real para fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV)

La validación de la prueba de qPCR desarrollada se dividió en dos partes: En la primera parte se buscaba comparar las detecciones en raíces enfermas vs el diagnóstico tradicional por PCR anidado y RT-PCR. En la segunda parte se comparó el resultado de qPCR con la técnica de injerto utilizada rutinariamente. El resultado obtenido por la dos metodologías se confirmó llevando las plantas a campo y evaluado síntomas luego de 10 meses de cultivo.

Para la primera parte de la validación se utilizaron más de 20 raíces de yuca que presentaban síntomas de la enfermedad del cuero de sapo, obtenidas de 10 genotipos diferentes. Se analizaron dos raíces por genotipo.

El ADN total de las plantas infectadas se extrajo utilizando el kit Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI). Para el RNA se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI).

Las muestras se amplificaron por RT-PCR según lo reportado por Cuervo (2006) metodología nombrada anteriormente para la detección del reovirus (CFSV) y por PCR anidado según lo reportado por Martini et al., (2007) para fitoplasmas del grupo 16SrIII con los cebadores rpF1/rpR1 (Lim & Sears.,1992; Martini et al., 2007) y rp(III)F1/rp(III)R1 para el segundo PCR (Martini et al., 2007).

Una vez se analizaron las raíces por los métodos tradicionales se hizo las detecciones por PCR en tiempo real con las parejas de cebadores y sondas diseñadas para los dos agentes asociados con la enfermedad del cuero de sapo utilizando las condiciones de PCR estandarizadas anteriormente.

Para la segunda parte de la validación se utilizaron 40 estacas provenientes de plantas con síntomas de cuero de sapo en las raíces y cinco plantas sanas provenientes de cultivo *invitro* del banco de germoplasma de CIAT-Palmira. La estacas de aproximadamente cinco yemas cada una se sembraron en bolsas negras plásticas, se dejaron crecer durante aproximadamente 45 días, luego se injertaron con la variedad de yuca secundina utilizada como indicadora, la cual expresa moteados en las hojas luego de injertada sobre plantas enfermas; simultáneamente se hicieron detecciones de los microorganismos en estas estacas de yuca.

Para correlacionar los resultados de la prueba de indexación por injerto con las detecciones por qPCR, las plantas se sembraron bajo condiciones de una casa de malla en CIAT-Santander de Quilichao (Anexo A) las plantas fueron tratadas con insecticidas (Dimethoate, Malathion, Tiametoxam y Lambdacihalotrina) y luego de ocho meses se cosecharon para evaluar los síntomas en las raíces.

5.8 Evaluación de la correlación de síntomas observados en raíces comerciales con la presencia del fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV).

5.7.1 Primera fase:

Para establecer la correlación de síntomas de raíces comerciales con la presencia de los dos microorganismos, se colectaron en campo plantas de cinco variedades diferentes que presentaban los síntomas característicos en las raíces; de cada variedad se tomaron 30 estacas (semilla vegetativa), las cuales se sembraron en bolsas plásticas de tres kilos y se ubicaron en jaulas de malla (para evitar la entrada de insectos) en un diseño de parcelas divididas, en donde la parcela principal fue el genotipo y la subparcela correspondió al tercio de la planta (inferior, medio y superior). En cada jaula se ubicaron seis plantas del mismo tercio y misma variedad. El ensayo fue establecido en CIAT Palmira.

Las plantas luego de dos a tres meses de sembradas se evaluaron por la presencia de los dos microorganismos utilizando para ello la metodologías de PCR en tiempo real descritas previamente para el fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus (CFSV), teniendo como variable de respuesta el número de copias del gen de la polimerasa (reovirus CFSV) y el gen *rp* (fitoplasma 16SrIII-L).

Estos análisis mostraron las siguientes combinaciones en cuanto a la presencia de los dos microorganismos:

1. Plantas con fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV).
2. Plantas con fitoplasma 16SrIII-L
3. Plantas con reovirus CFSV.
4. Plantas con valores de Ct superiores de 35
5. Control negativo. (ADN de plantas *in vitro* evaluado para los dos microorganismos por la metodología de PCR en tiempo real con resultado negativo).

Con base en los resultados obtenidos se estableció una segunda fase, bajo condiciones de campo, para ello las plantas fueron confinadas en una casa de malla en el Centro Experimental de la Universidad Nacional sede Palmira (CEUNP) ubicado en el corregimiento de Villa Gorgona (Anexo B). Las combinaciones encontradas en la primera fase se consideraron como tratamientos para la segunda fase de evaluación.

5.7.2 Segunda fase

Las plantas permanecieron en campo (Anexo B) durante nueve meses, se fertilizaron durante los primeros tres meses con 60 gr de elementos mayores (15, 15, 15) y se regaron según la necesidad. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cinco repeticiones y 25 plantas por cada tratamiento (Fitoplasma, Virus, Fitoplasma-Virus, Plantas con valores de Ct superiores de 35, Controles negativos). Pasados nueve meses las plantas se cosecharon y se midieron las siguientes variables: Severidad (evaluada de acuerdo a la escala raíz por raíz de 1-5 (Anexo C) y escala utilizada por la Universidad de Córdoba en pruebas de resistencia varietal (Anexo D) evaluando de 1-10 todo el conjunto de raíces de la planta), número de raíces enfermas, sanas y totales, grosor de tocón, grosor de raíces sanas y enfermas, peso de raíces en el aire y longitud de raíces sanas. Las variables fueron evaluadas en cada una de las plantas de cada tratamiento, por tal motivo el peso de las raíces en algunas plantas con una severidad alta no fue posible hacer la medición de peso en el agua (para este peso rutinariamente se utiliza un peso de tres kilos).

6. Análisis estadístico

La primera fase del ensayo se analizó de acuerdo a un diseño de parcelas divididas, en donde la parcela principal fue el genotipo y la subparcela el tercio de la planta. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el número de copias de los dos patógenos en los tres tercios de la planta y genotipo, además se hicieron pruebas de comparación de medias (Test de DUNCAN). Con los resultados del número de copias de cada uno de los microorganismos se hicieron agrupamientos de las plantas para ser utilizados como tratamientos en la segunda fase del ensayo.

La segunda fase del ensayo se analizó de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar, para determinar diferencias entre tratamientos (agrupamientos encontrados en la fase 1 del ensayo) se utilizó la prueba de ANOVA y para establecer diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba de LSMEANS con un nivel de significancia del $P < 0.1$, adicionalmente se hizo una prueba de correlación de PEARSON entre las variables y posteriormente regresiones simples para explicar la variación de variables correlacionadas.

Se desarrolló una prueba de componentes principales (Anexo E) para agrupar las variables de peso de raíces en el aire, número de raíces totales, número de raíces sanas, porcentaje de raíces afectadas, grosor de raíces enfermas, grosor de raíces sanas, logitud de raíces sanas y longitud de raíces enfermas.

7. Resultados y discusión

7.1 Diseño de la sonda TaqMan® y de los cebadores para la detección de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus (CFSV).

7.1.2 Recolección de material vegetal

Se colectaron raíces y tallos de yuca de plantas con síntomas de la enfermedad (Tabla 2.1) de los genotipos CM 1219-9, HMC-1 MCOL 2489, MCOL2547, colectados en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) ubicado en Palmira, Departamento del Valle de Cauca. En el Departamento del Cauca se recolectaron tallos y raíces del genotipo Reina, SM 909-25, MBRA 383, CM 5460, Secundina 80 y 86. Por último del Departamento de Córdoba se recolectaron tallos y raíces de plantas de los genotipos Venezolana y Verónica.

Tabla 2.1. Zonas y genotipos de yuca recolectadas para el diseño de la sonda TaqMan® y cebadores

Departamento	Genotipo	Tejido
Cauca	SM 909-25, MBRA 383, CM 5460, Secundina 80 y 86	raíces y tallos
Valle del Cauca	CM 1219-9, HMC-1 MCOL 2489, MCOL2547	raíces y tallos
Córdoba	Venezolana y Verónica	raíces y tallos

7.1.3 Extracción de RNAcd y ADN

Para la extracción de RNA se evaluó el kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI, USA) frente al protocolo propuesto por Cuervo (2006).

Para la extracción del ADN se evaluó el protocolo Wizard® Genomic ADN Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) frente al utilizado rutinariamente propuesto por Gilberton *et al.*, (1983). Esto se hizo con el fin de estandarizar la calidad de las extracciones con la confiabilidad, reproducibilidad y robustez que ofrece un kit comercial. (Stratagene., 2009). La validación se hizo a partir de la extracción de ADN de raíces de plantas de la variedad Reina con síntomas de la enfermedad y hojas de plantas de esta misma variedad de semilla sembrada en invernadero.

7.1.4 PCR anidado y RT-PCR

Se amplificó el ADN del fitoplasma y el cADN del reovirus. Se encontró al momento de hacer la retrotranscripción del cADN del reovirus que la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), presentaba bandas únicas y bien definidas pero con poca sensibilidad como se muestra en la Figura 1 en los carriles 12 a 21, para mejorar la sensibilidad en la detección del reovirus, se evaluó la enzima Affinity Script QPCR cADN Synthesis Kit (Stratagene), la cual es una versión mejorada para qPCR de la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), lográndose una mayor eficiencia en la conversión de RNA a cADN otorgando una mayor sensibilidad, detectando el reovirus en la mayoría de las muestras analizadas provenientes de plantas de campo con síntomas en raíces.

En la PCR anidada, se obtuvieron bandas de 1200 bp (Figura 2) las cuales coinciden con el tamaño reportado para el grupo 16SrIII del fitoplasma (Martini *et al.*, 2007), al hacer las digestiones con las enzimas *Tsp5091* y *AluI* se observó un patrón de restricción que coincide con el grupo rplII-H (Figura 3) reportado anteriormente por Álvarez *et al.*, 2009, quienes no encontraron diferencias en los patrones de restricción de las muestras amplificadas a partir del gen 16S rRNA y *rp*, concluyendo que el fitoplasma asociado al cuero de sapo de la yuca podría estar dentro de un nuevo subgrupo según la clasificación por proteínas ribosomales (*rp*).

En la Figura 4 se observa el alineamiento de fragmentos de secuencias de fitoplasmas obtenidas del GenBank pertenecientes al gen *rp*, este alineamiento completo se utilizó para hacer el árbol filogenético (Figura 5), en donde se observa CFSD 16SrIII *rp*-H MB (extraído de de *Bemisia taberculata*) y CFSD 16Sr *rp*-H (extraído de raíces de la variedad SM 909-25) se encuentran agrupados dentro del mismo grupo de los fitoplasmas del grupo 16SrIII, pero separados de los demás subgrupos, lo cual soporta la existencia del subgrupo rplII-H (subgrupo determinado en base al gen *rp*), por otro lado el análisis de bootstrap de éste nuevo subgrupo tiene un valor de 100% lo que comprueba lo descrito por Álvarez *et al.*, (2009) para el gen 16S rRNA.

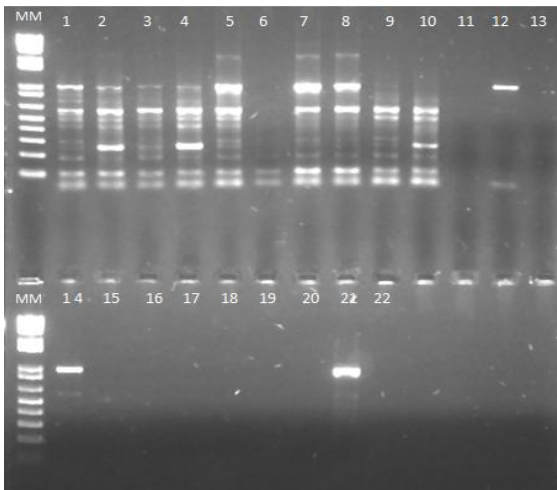


Figura 1. Amplificación de cADN del revirus mediante la técnica de RT-PCR para CFSV, utilizando dos enzimas retrotranscriptasas: 1-10 Affinity Script QPCR cADN Synthesis Kit (Stratagene); 12-21 transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen).

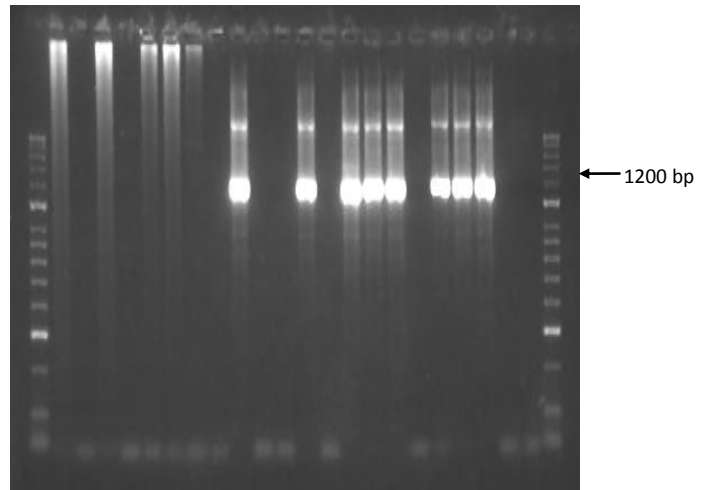


Figura 2. Amplificación del ADN del fitoplasma 16Sr-III mediante PCR anidado utilizando los cebadores rp a partir de raíces de yuca con síntomas de cuero de sapo.

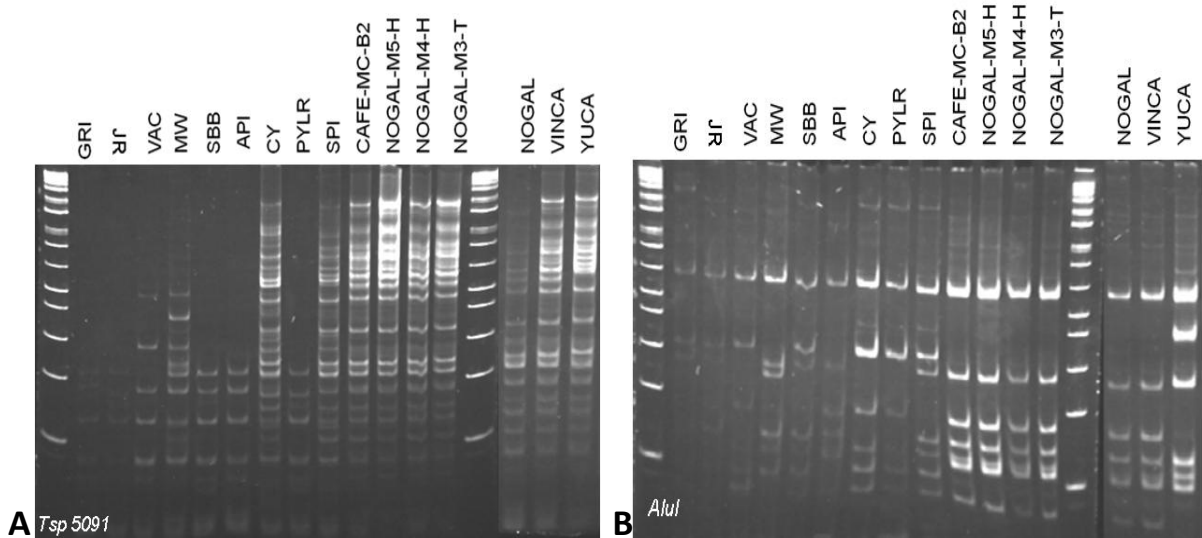


Figura 3. Perfiles de restricción del producto amplificado mediante PCR anidado del gen rp con los cebadores rpF1/rpR1 - rp(III)F1/rp(III)R1. A; Patrón de restricción correspondiente a la enzima *Tsp 5091*. B; Patrón de restricción correspondiente a la enzima *AluI*. Como referencia se corrieron fitoplasmas de grupo 16SrIII: GRI, golden rod yellows; JR, poinsettia branch-inducing; VAC, Vaccinium witches; MW, milkweed yellows; SBB, big bug; MWI, API phytoplasma from *Euscelidius variegatus* from Italy; CY, clover yellow edge phytoplasma; PYLR, peach yellowleaf roll; SPI, spirea stunt; CAFE-MC-B2, NOGAL-M5-H, NOGAL-M4-H, NOGAL-M3-T, NOGAL, fitoplasmas del grupo 16SrIII identificados en Colombia en plantas de nogal (*Cordia alliodora*) y café (*Coffea arabica*); YUCA es el fitoplasma asociado del grupo 16SrIII-L.

7.1.5 Diseño de sonda TaqMan® y cebadores

La mayoría de sondas descritas para fitoplasmas (Tabla1) han sido diseñadas para amplificar regiones del gen 16S rRNA, un gen altamente conservado muy utilizado para estudios filogenéticos en procariontes. Sin embargo, esta región no permite diferenciar algunos grupos de fitoplasma que son biológica y ecológicamente diferentes. El gen *rp*, al igual que el gen 16S rRNA es conservado en todas las especies de bacterias, pero a diferencia de éste último, permite hacer una clasificación mucho más específica de los diferentes grupos de fitoplasmas, debió a que ésta región es mucho más polimórfica, permitiendo el diseño de cebadores grupo específicos (Martini *et al.*, 2007).

En la Tabla 3 se observan homologías entre el 97 y el 98% para los fitoplasma del grupo 16Sr III: Clover yellow, Western X, Pecan bunch, Milkweed yellows, Vaccinium witches'-broom, Goldenrod yellows, Dandelion virescence, Canadian peach X, Poinsettia branch-inducing, Walnut witches'-broom Peach X-disease. En algunas accesiones la homología fue de 98% debido a una variación en dos bases de la secuencia del fitoplasma CFSD 16SrIII-L (Figura 4). Las cuales se encuentran en la posición de la sonda. Homología de 97% en las secuencias se deben a la variación en las mismas bases y una adicional en la posición del cebador sentido, estas variaciones deberían otorgar una especificidad única para el grupo 16SrIII-L. Sin embargo al hacer las pruebas de especificidad (Tabla 10) se encontró que la sonda y los cebadores amplificaron todos los subgrupos analizados (A, B, D, E, F, H) del grupo 16SrIII, por otro lado en la prueba de especificidad se incluyeron muestras de ADN de fitoplasmas de los grupos 16SrVI y 16SrXV, extraídos de yuca con síntomas de witches' broom; donde en ninguna de esta muestras se detectó el fitoplasma 16SrIII-L asociado al cuero de sapo de la yuca (Tabla 11).

Teniendo en cuenta los resultados de especificidad mostrado en las Tablas 10 y 11 se puede ver que la sonda es específica para el grupo 16SrIII pero no para el subgrupo L a pesar de tener dos bases de diferencia en la posición de la sonda como se indico previamente. Posiblemente esto se deba a inespecificidad propia de la sonda TaqMan® estándar, por el contrario las sondas TaqMan® MGB o Molecular Beacon® son sondas que pueden discriminar hasta un nucleótido (Aldaghi *et al.*, 2007; Baric *et al.*, 2004). Por otro lado el cebador sentido presenta una diferencia de al menos un nucleótido con los subgrupos del grupo 16SrIII: C, G D, E y F (Figura 4) el cebador anti-sentido no detecta ninguna diferencia dentro de los aislamientos de grupo 16Sr III alineados. Es posible que una sonda TaqMan® normal pueda discriminar de uno a dos nucleótidos, si entre los dos cebadores existe una variación de siete nucleótidos como lo demuestra Angelini *et al.*, 2007 con el diseño de tres sondas para detectar fitoplasmas causantes de amarillamientos en uva pertenecientes a los grupos 16Sr I, 16Sr V, 16Sr XII a partir del gen 16S rRNA.

La sonda diseñada para el reovirus se basó en la metodología de Cuervo (2006) en la cual los cebadores fueron diseñados para amplificar el RNA 4 del genoma del virus teniendo en cuenta los siguientes criterios: El alto nivel de conservación que posee esta región, la cual es responsable de codificar la enzima polimerasa permitiendo detectar fácilmente diferencias genéticas lo que favorece su empleo en estudios de variabilidad.

Los estudios de variabilidad hechos por Cuervo (2006) mostraron la presencia de tres variantes o cepas diferentes del virus: El primero conformado por la cepa Amazonas 16, el segundo por FSD 29, y el tercer grupo conformado por aislamientos procedentes de la

Costa, los Llanos, Cauca, Regional Tolima y demás (Figura 7). Los cebadores diseñados por Cuervo (2006) permiten detectar las tres cepas identificadas del virus hasta el momento. Lo cual hace que la región de 958 bp (Tabla 4) promisorio para el diseño de sondas de PCR en Tiempo Real. Sin embargo al analizar las secuencias publicadas por Cuervo (2006) de las diferentes cepas del virus se observó que en esta región a pesar de ser conservada presenta gran polimorfismo. Se escogió para el diseño de la sonda un fragmento de 339 bp (Tabla 5) conservadas en todas las cepas reportadas por Cuervo (2006).

En la Figura 6 se observa que el cebador sentido, identificado en el primer recuadro amarillo presenta variaciones de un solo nucleótido con los aislamientos de Amazonas y Cauca A, la sonda presenta una variación de un nucleótido con un aislamiento de regional Tolima y con los tres de Amazonas, por otro lado el cebador anti- sentido tiene una variación de un nucleótido solamente con el aislamiento regional Tolima C; dichas variaciones no representan un riesgo de escapes al momento de hacer los diagnósticos..

En esta familia de virus a pesar de tener dsRNA y presentar una alta variabilidad genética a causa de mutaciones ocurridas durante la replicación del RNA, ha permitido el diseño de pruebas de PCR en Tiempo Real a partir de alineamientos de regiones conservadas como la de la polimerasa viral. (Wu *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2008; Adlhoch *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2010) por lo que la prueba de PCR en tiempo real diseñada no es la primera para esta familia de virus.

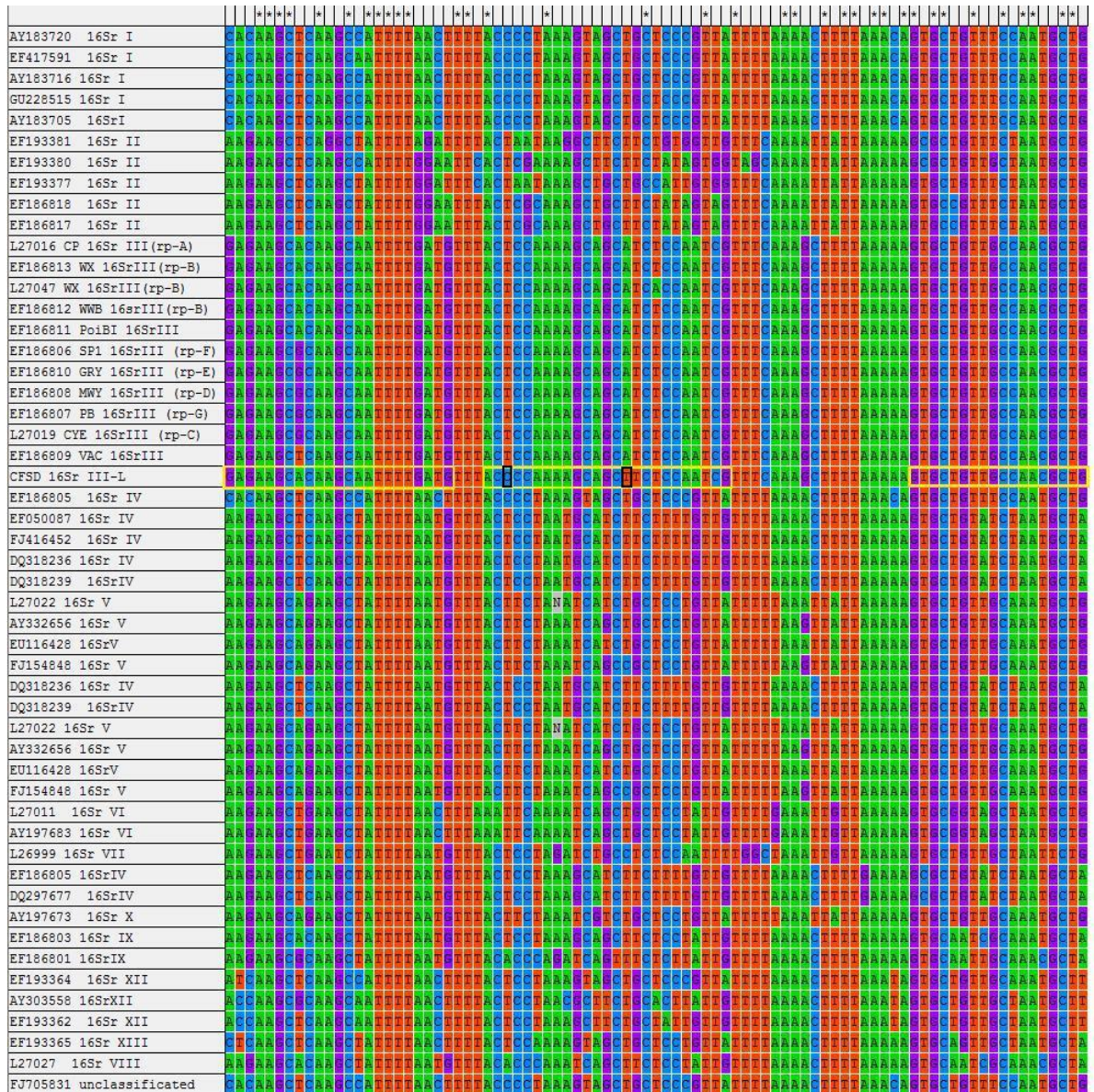


Figura 4. Alineamiento del amplicón obtenido a partir de la sonda y los cebadores diseñados a partir del gen *rp*, el cual muestra la especificidad de la sonda *rpIII-p* y de los cebadores *rpIII-PF/rpIII-PR* en relación con otros fitoplasmas de grupo 16SrIII. El primer cuadro en color amarillo indica el sentido, el segundo y tercer cuadro del mismo color indican la posición de la sonda y del cebador antisentido respectivamente. Los dos cuadros negros que se ubican sobre la posición de la sonda (segundo cuadro amarillo) indica las bases que hacen la sonda específica para el aislamiento CFSD 16Sr III-L.

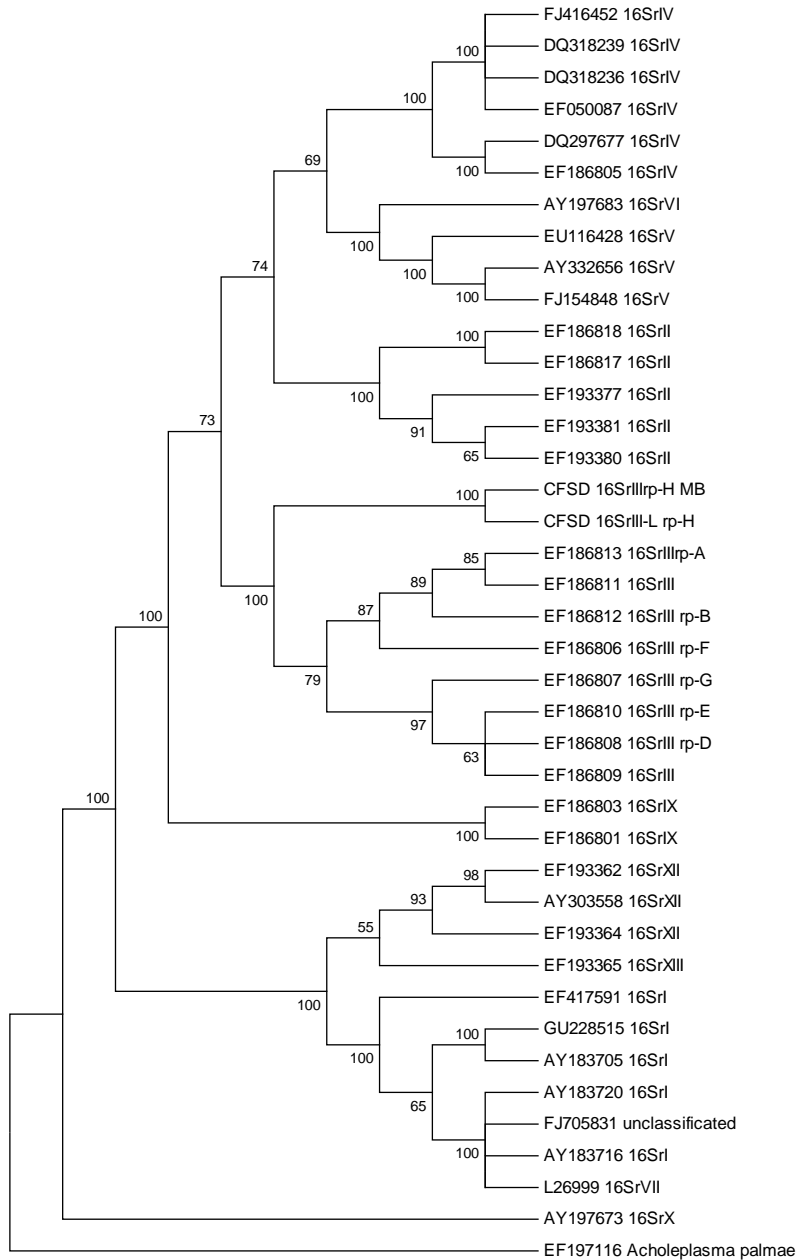


Figura 5. Árbol filogenético construido por el método de máxima parsimonia analizado mediante el algoritmo near-full-length. Las secuencias de fitoplasma de los aislamientos CFSD 16SrIII rp-H MB (aislado de mosca blanca *Bemisia tuberculata*), CFSD 16Sr rp-H (aislado de la variedad SM 909-25); las otras secuencias de fitoplasmas son pertenecientes a los grupos ribosomales 16Sr I,II,III, IV,V, VI, VII, IX, X, XII y XIII reportadas en el GenBank y utilizados como referencia dentro del género '*Candidatus phytoplasma*'.

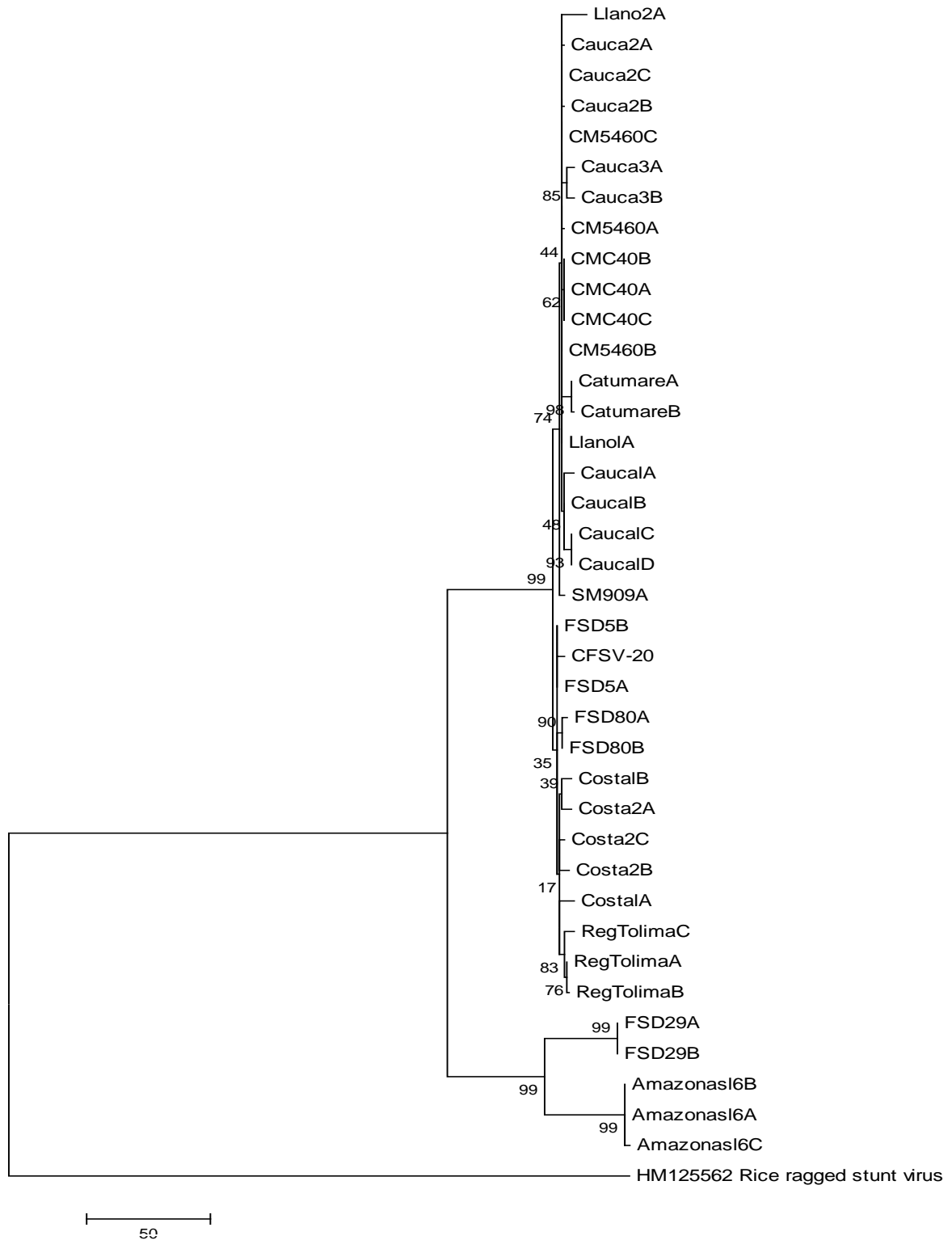


Figura 7. Árbol filogenético construido por el método de máxima parsimonia analizado mediante algoritmo near-full-length. Las secuencias de virus utilizadas son las reportadas por Cuervo (2006) a excepción del aislamiento CFSV-20 aislado de la variedad de yuca MBRA 383, como grupo externo se utilizó un aislamiento de *Rice ragged stunt virus* obtenido del GenBank.

Tabla 3. Homología encontrada entre secuencias de ADN de fitoplasma asociado con el cuero de sapo de la yuca obtenidas por PCR anidado y secuencias del fitoplasma reportadas en GenBank.

Apareamiento con GeneBank	Código GenBank	Bases homologadas	Homología (%)
Peach X-disease phytoplasma strain CX ribosomal protein L22 (rpl22) gene, complete cds; and ribosomal protein S3-like (rps3) gene, complete sequence Length=1380	EF186813	85/87	98
Walnut witches'-broom phytoplasma strain WWB ribosomal protein L22 (rpl22) gene, complete cds; and ribosomal protein S3-like (rps3) gene, complete sequence Length=1394	EF186812	85/87	98
Poinsettia branch-inducing phytoplasma strain JR ribosomal protein L22 (rpl22) gene, complete cds; and ribosomal protein S3-like (rps3) gene, complete sequence Length=1384	EF186811	85/87	98
Canadian peach X mycoplasma-like organism ribosomal protein S19 and L22 genes, 3' and 5' ends respectively Length=340	L27016	85/87	98
Dandelion virescence phytoplasma strain DanVir2 ribosomal protein L22 (rpl22) gene, partial cds Length=258	HM138660	84/87	97
Goldenrod yellows phytoplasma strain GRI ribosomal protein L22 (rpl22) gene, complete cds; and ribosomal protein S3-like (rps3) gene, complete sequence Length=1385	EF186810	84/87	97
Vaccinium witches'-broom phytoplasma strain VAC ribosomal protein L22 (rpl22) and ribosomal protein S3 (rps3) genes, complete Cds Length=1389	EF186809	84/87	97
Milkweed yellows phytoplasma strain MWI ribosomal protein L22 (rpl22) gene, complete cds; and ribosomal protein S3-like (rps3) gene, complete sequence Length=1339	EF186808	84/87	97
Pecan bunch phytoplasma strain PBT ribosomal protein L22 (rpl22) gene, complete cds; and ribosomal protein S3-like (rps3) gene, complete sequence Length=1386	EF186807	84/87	97

Western X mycoplasma-like organism ribosomal protein S19 and L22 genes, 3' and 5' ends respectively Length=340	L27047	84/87	97
Clover yellow edge mycoplasma-like organism ribosomal protein S19 and L22 genes, 3' end 5' ends respectively Length=335	L27019	84/87	97

Tabla 4. Homología encontrada entre la secuencia del aislamiento CFSV-20 del reovirus asociado al cuero de sapo de la yuca obtenida de la variedad MBRA 383 por RT-PCR y secuencias del GenBank..

Apareamiento con GeneBank	Código GenBank	Bases Homologadas	Homologia (%)
Cassava frogskin virus segment 4 putative RNA dependent RNA polymerase gene, partial cds Length=1080	DQ139870	83/83	100%

Tabla 5. Características de las sondas y los cebadores diseñados para la detección del fitoplasma 16Sr III-L y el reovirus.

	Agente asociado	
	Reovirus (CFSV)	Fitoplasma 16SrIII-L
Longitud de fragmento (pb)	339	1308
Valoración	59.2	61.5
Secuencia de sonda	5'-ACCTACCGCCCAAGAGATCCCTCA-3'	5'-ACCCCAAAGCAGCTTCTCCAATCG-3'
Posición	143	138
Longitud (pb)	25	25
Tm	67.6	64.9
GC%	60	52
Hairpin Bond (Internal)	3	3
Self Dimer dG (Internal) Kcal/mol	-2	-3.1
Self Dimer Bond (Internal) (pb)	4	4
Valoración de cebadores	85.5	71.6
Longitud de amplicon (pb)	83	87
Tm °C de producto	71	69.1
Temperatura °C óptima de apareamiento	52.4	50.4
Cross-Dimer dG (Internal) Kcal/mol	-2.5	-0.8
Cross-Dimer Bond (Internal) (pb)	4	3
Cebador sentido	5'-ATCCGATCATGGTTACGAGAAGG-3'	5'-GAGAAGCACAAGCAATTTTGATG-3'
Valoración	87.4	71.4
Posición	112	112
Longitud (pb)	23	23
Tm °C	58.7	56.3
GC%	47.8	39.1
GC Clamp (pb)	2	1
3' End dG Kcal/mol	-4.1	-3.5
Self Dimer dG (Internal) Kcal/mol	-2.3	-1.2
Hairpin dG (Internal) Kcal/mol	0	-0.8
Run/Repeat Length (pb)	2	4
Cebador anti-sentido	5'-CCATTCAACATCCGTCTATACTCC-3'	5'-CAGCGTTGGCAACAGCAC-3'
Valoración	86.1	72.9
Posición	194	198
Longitud (pb)	25	18
Tm °C	58.4	57.8
GC%	44	61.1
GC Clamp (pb)	2	1
3' End dG Kcal/mol	-4.4	-5
Self Dimer dG (Internal) Kcal/mol	-0.3	-2.5
Hairpin dG (Internal) Kcal/mol	0	-0.7
Run/Repeat Length (pb)	2	2
Amplicon	5'- ATCCGATCATGGTTACGAGAAGGATTATCA AACCTACCGCCCAAGAGATCCCTCACTGG AGTATAGACGGAATGTTGAATGG-3'	5'- GAGAAGCACAAGCAATTTTGATGTTTACCC CAAAAGCAGCTTCTCCAATCGTTTCAAAGC TTTTAAAAAGTGCTGTTGCCAACGCTG-3'

En la Tabla 5 se observan las características de las sondas y los cebadores diseñados para la detección de fitoplasma y virus. Los datos presentados en la Tabla 5 permiten analizar la posibilidad de formación de dímeros de los cebadores y las sondas (la estabilidad de un dímero se mide en forma de energía libre de Gibbs (Kcal/mol) entre más negativo sea este valor significa que la unión del dímero es más estable). Las temperaturas de disociación que dependen de los porcentajes de GC las cuales van a condicionar las temperaturas de apareamiento indispensables para la especificidad (Primer Biosoft., 2010).

El programa Beacon Designer 7.9 valora cada oligo diseñado con un valor, calculado con base a la temperatura de fusión, la estabilidad de las posibles estructuras secundarias que se puedan formar y la ubicación de los oligos diseñados dentro del amplicón (distancia entre cebador sentido y sonda); el programa utiliza un algoritmo en el que considera el valor óptimo de cada una de las características, el valor de éstos y los rangos de tolerancia. Los valores asignados por programa van de 0 a 100 y dentro de este rango establece tres categorías: 0-50 malo, 50-75 bueno y 75-100 excelente.

El cebador sentido para el virus y el fitoplasma tuvo una valoración de 87.4 y de 71.4 respectivamente. El cebador del virus tuvo una calificación excelente por tener un mayor porcentaje de GC lo que confiere una temperatura de fusión 58.7°C. Para ninguno de los dos cebadores se observó la formación de estructuras secundarias estables según lo sugerido por el programa Beacon Designer 7.9.

El cebador antisentido tuvo una valoración de 86.1 y 72.9 para el virus y el fitoplasma respectivamente, presentando para el virus una mayor temperatura de melting (58.4°C) en comparación con la del fitoplasma (57.8°C) y en ninguno de los dos casos se presenta la formación de estructuras secundarias estables.

La temperatura de disociación de los cebadores debe ser 10°C inferior a la de la sonda con una tolerancia de +/- 5°C para el reovirus la diferencia es de 8 °C y para el fitoplasma es de 7.89 °C, encontrándose las dos dentro de lo recomendado por el programa Beacon Designer 7.9.

Los cebadores deben tener una temperatura de fusión con una diferencia máxima de 3°C condición que se cumplió para las dos parejas de cebadores diseñadas.

El tamaño de amplicón que recomienda el programa debe estar entre 70 y 200 bp; sin embargo entre más pequeño sea éste, los ciclos de amplificación serán menores y de mayor especificidad; el menor tiempo se debe a que con amplicones pequeños (Figura 8) como los diseñados (83 y 87pb) y que se muestran en las figuras 4 y 6; cuando los dos cebadores y la sonda hacen el apareamiento cubre la totalidad del amplicón quedando solo unas pocas bases sin apareamiento causando que ese tiempo de apareamiento sea corto al igual que la denaturación (porque se necesita menos tiempo para denaturar un amplicon pequeño) y se evita el tiempo de extensión en cada ciclo (Stratagene. 2007). Por otro lado la especificidad de un amplicón pequeño también depende de la distancia en bases entre el cebador sentido y la sonda debido a que distancias mayores de 10 bases pueden llevar a amplificaciones inespecíficas por errores de la polimerasa (Primer Biosoft., 2010).

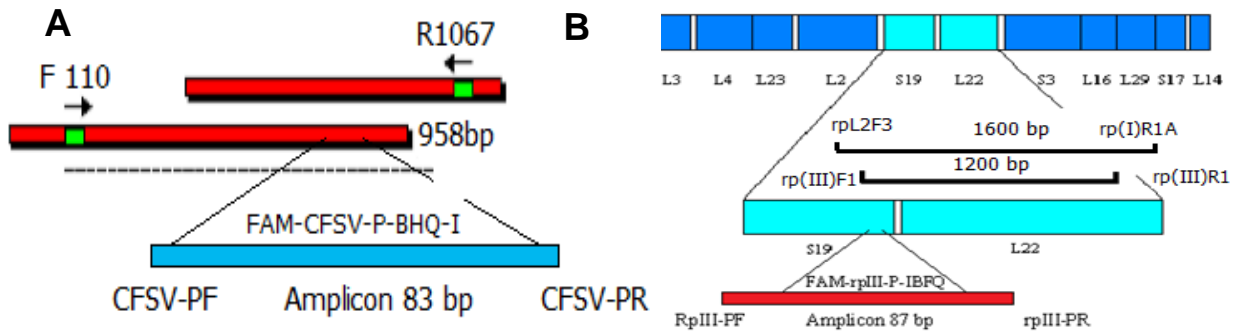


Figura 8. Representación gráfica del diseño de las sondas: A. diseño de sonda a partir de un fragmento de 958 bp amplificado mediante RT-PCR con los cebadores F110/R1067; a partir del cual se obtuvo un amplicón de 83 bp (azul claro) que amplifica con los cebadores CFSV-PF/CFSV-PR y con la sonda FAM CFSV-P-BHQ-I; B. Diseño de la sonda y los cebadores a partir de un fragmento de 1600 bp ubicado en el gen *rp*, genes que codifican para la proteína S19-L22 que amplifican mediante PCR anidado con los cebadores rpL2F3/rp(I)R1A y el segundo PCR con los cebadores rp(III)F1/rp(III)R1 originando un amplicón de 1200 bp, dentro de este fragmento esta el amplicón (rojo) de 87 que amplifica con los cebadores RpIII-PF/rpIII-PR y la sonda FAM-rpIII-P-IBFQ.

7.1.6 Optimización de la concentración de los cebadores y de la sonda TaqMan® y determinación de la especificidad.

Optimización de los cebadores fitoplasma 16SrIII-L

La concentración de cebadores para el fitoplasma 16SrIII-L con la mejor reproducibilidad, menor valor de Ct y mejor fluorescencia (Figura 9) fue la correspondiente a la combinación 200/600.

Entre las concentraciones de cebadores evaluadas no se observaron diferencias significativas en la temperatura de fusión, además no presentaron amplificaciones inespecíficas o formaciones de dímeros. En la Tabla 6 se presentan combinaciones de cebadores con valores de Ct menores del que presenta la combinación 200/600; sin embargo esta combinación fue la que permitió obtener la mayor fluorescencia y mayor reproducibilidad de los resultados.

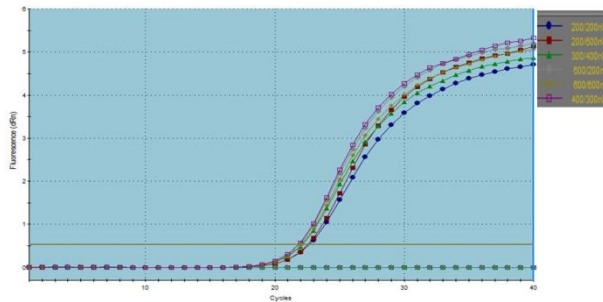


Figura 9. Optimización de los cebadores para la detección del fitoplasma 16SrIII-L. La gráfica muestra la evaluación de seis diferentes combinaciones de cebadores.

Tabla 6. Evaluación de seis combinaciones de cebadores, mostrando el promedio de Ct de cada combinación y la desviación estándar.

F/R nM	Ct Avg. Treated Ind. (dRn)	Ct SD Treated Ind. (dRn)
200/200	22.74	0.28
200/600	22.61	0.01
300/400	22.22	0.07
600/200	21.96	0.06
600/600	22.12	0.02
400/300	21.89	0.03

Optimización de los cebadores del virus (CFSV)

La mejor concentración de cebadores determinada para el reovirus (CFSV) correspondió a la combinación 400/300 con la que se obtuvo la más alta reproducibilidad de los resultados, reflejado en una desviación estándar baja (Tabla 7). En la Figura 10 se observa que las concentraciones bajas del cebador sentido (200/600 y 200/200) disminuyen la fluorescencia en comparación a combinaciones con altas concentraciones de este mismo cebador.

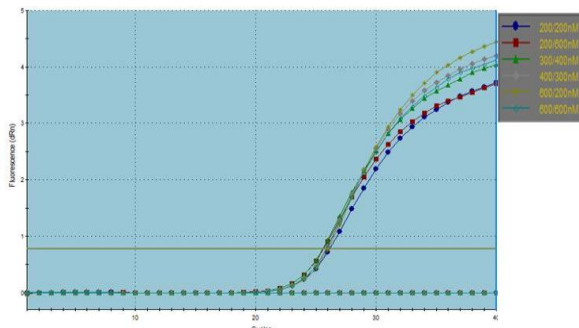


Figura 10. Curva de Optimización de los cebadores para la detección del reovirus (CFSV). La gráfica muestra los resultados de la evaluación de seis combinaciones diferentes de cebadores.

Tabla 7. Evaluación de seis combinaciones de cebadores, mostrando el promedio de Ct de cada combinación y la desviación estándar.

F/R nM	Ct Avg. Treated Ind. (dRn)	Ct SD Treated Ind. (dRn)
200/200	26.19	0.22
200/600	25.66	0.49
300/400	25.64	0.54
400/300	25.89	0.04
600/200	26.04	0.3
600/600	25.94	0.42

Optimización de la concentración de la sonda TaqMan® para el fitoplasma 16SrIII-L

La concentración de la sonda TaqMan® correspondiente a 200nM fue la más adecuada para obtener mayor reproducibilidad de los resultados (Tabla 8), el menor valor de Ct y la mayor fluorescencia (Figura 11A). El empleo de concentraciones bajas (50nM) y altas (400 nM) de los cebadores diseñados para el fitoplasma y el virus mostraron una disminución en el Ct y la fluorescencia (Figura 11A, 11B, 12A y 12B), lo cual indica que el empleo de concentraciones altas o bajas de la sonda contribuyen a disminuir la sensibilidad de la técnica y por consiguiente hacen que esta no sea adecuada para la detección del patógeno en muestras con baja concentración del mismo.

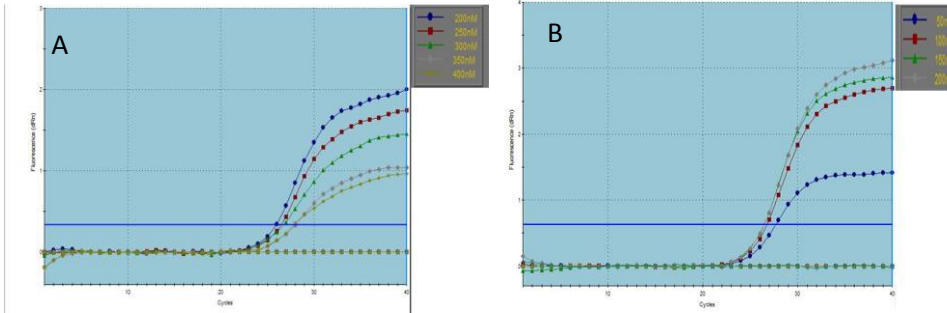


Figura 11. Optimización de la concentración de la sonda TaqMan® para el fitoplasma 16SrIII-L. La figura A. Presenta concentraciones entre 200nM y 400nM. La figura B. Presenta concentraciones entre 50nM y 200nM.

Tabla 8. Ct y desviación estándar de concentraciones de sonda entre 50nM y 400nM.

nM	Ct Avg.	Ct SD.
50	27.77	0.05
100	26.8	0.16
150	26.52	0.16
200	25.99	0.06
250	26.52	0.05
300	26.82	0.09
350	28.23	1.41
400	27.85	0.48

Optimización de concentración TaqMan® para el reovirus (CFSV)

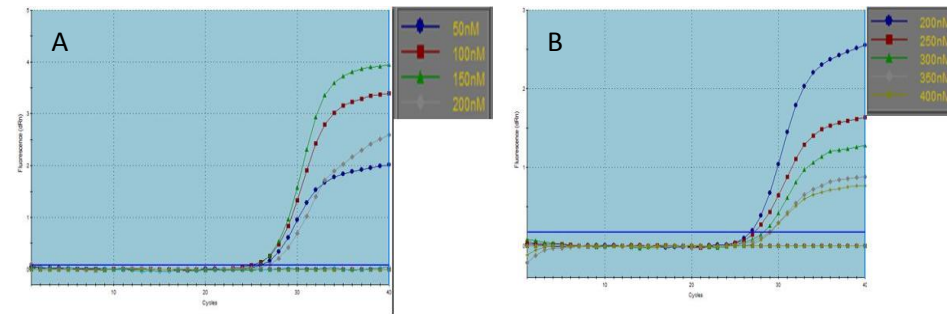


Figura 12. Gráficas de optimización de la concentración de la sonda TaqMan® para reovirus (CFSV). La gráfica A muestra concentraciones entre 50nM y 200nM. La gráfica B presenta concentraciones entre 200nM y 400nM.

Tabla 9. Ct y desviación estándar de concentraciones de sonda entre 50nM y 400nM para el virus

nM	Ct Avg. Treated Ind. (dRn)	Ct SD Treated Ind. (dRn)
50	26	0.4
100	25.07	0.55
150	25.61	0.07
200	26.84	0.19
250	27.29	0.32
300	28.35	0.21
350	28.96	0.01
400	29.18	0.89

La concentración de la sonda adecuada para el reovirus (CFSV) es 150nM mostrando una baja desviación estándar (tabla 9), bajo Ct y alta fluorescencia figura 12B. La baja desviación estándar de las amplificaciones con esta concentración de sonda va a permitir que al momento de generar la curva estándar y comenzar a cuantificar las muestras de campo, los resultados sean muy reproducibles (Mumford *et al.*, 2000).

7.1.7 Especificidad de la sonda para la detección del fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus (CFSV)

Tabla 10. Resultados de la prueba de especificidad de la sonda TaqMan® para la detección del fitoplasma 16SrIII-L, evaluada en un grupo de microorganismos fitopatógenos y tejidos de yuca.

Muestra	Ct	Muestra	Ct
NTC	No Ct	<i>Elm yellos</i> 16Sr V-A	No Ct
<i>Agrobacterium spp</i>	No Ct	<i>Elm yellos</i> 16Sr V-C	No ct
<i>Agrobacterium spp</i>	No Ct	<i>Periwinkle virescence</i> 16Sr VI	No Ct
<i>Empoasca spp</i>	No Ct	<i>Periwinkle virescence</i> 16Sr VI	No Ct
Mosca blanca	No Ct	CFSD1 16SrIII-L	21.16
Planta de yuca <i>invitro</i>	No Ct	CFSD2 16SrIII-L	25.13
<i>Colletotrichum spp</i>	No Ct	<i>Solanum marginatum</i> big bug 16SrIII	21.88
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i>	No Ct	<i>Vaccinium witches' broom</i> 16Sr III-F	18.59
<i>Phytophthora spp</i>	No Ct	<i>poinsettia branch-inducing</i> 16SrIII-H	21.20
<i>Phytophthora spp</i>	No Ct	phytoplasma from <i>Euscelidius variegatus</i> from Italy 16SrIII-B	22.60
Raiz de yuca sana	No ct	<i>peach yellow leaf roll</i> 16Sr-III-A	19.02
<i>Ralstonia</i>	No Ct	<i>Green Valley X disease</i> 16SrIII-A	21.37
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i>	No Ct	<i>peach X-disease</i> 16SrIII-A	19.89
<i>Colletotrichum spp</i>	No Ct	<i>Clover yellows edye</i> 16SrIII-B	18.00
<i>Aster yellow</i> 16Srl	No Ct	<i>Golden rod yellows</i> 16SrIII-D	No Ct
<i>Aster yellow</i> 16Srl-A	No ct	<i>Spiraea stunt</i> 16SrIII-E	21.95
<i>Aster yellow</i> 16Srl-B	No Ct	Fitoplasma de uchuva 16Sr III	19.99
<i>Peatunt</i> WB 16SrlI	No ct	<i>Milkweed yellows</i> 16SrIII-F	20.73
<i>Lethal yellow</i> 16Sr IV	No Ct	<i>Clover yellows edye</i> 16SrIII-B	25.57

La sonda mostró ser específica para fitoplasmas del grupo 16SrIII (Tabla 10) más no para el subgrupo L al cual pertenece el fitoplasma asociado con el cuero de sapo de la yuca. La sonda no produjo ampliaciones inespecíficas a partir de ADN genómico de yuca, ni de insectos hemípteros que puedan ser vectores de la enfermedad.

Tabla 9. Amplificaciones de yuca con síntomas de 'escoba de bruja', las muestras presentan una infección mixta de fitoplasma del grupo 16Sr-VI y 16Sr-XV.

Identificación de muestra	Ct (dRn)	Descripción
Positivo	19.32	ADN de genotipo SM 909 con CS
NTC	No Ct	Control negativo
6_23.1.2010	No Ct	Planta sana
1_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
9_22.1.2010	No Ct	Planta sana
3_23.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
11_23.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
5_25.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
4_29.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
2_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
10_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
4_23.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
12_23.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
6_25.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
5_29.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
3_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
11_22.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
5_23.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
13_23.1.2010	No Ct	Planta sana dentro de foco
7_25.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
6_29.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
4_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
12_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
14_23.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
8_25.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
7_29.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
5_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom
13_22.1.2010	No Ct	Cogollo con síntoma de witches' broom

En la Tabla 11 se presentan los resultados de la prueba de especificidad de la sonda diseñada para el fitoplasma evaluada con ADN obtenido de plantas de yuca con síntoma de witches' broom, en las cuales se detectaron fitoplasmas de los grupos 16Sr-VI y 16Sr-XV (comunicación personal Laboratorio de Patología de Yuca-CIAT). El resultado para todas las muestras evaluadas fue negativo lo que indica la especificidad de la sonda y su capacidad de discriminación de otros fitoplasmas, aun que estén presentes en el mismo hospedero, esto confirma que la sonda puede discriminar otros fitoplasmas que se puedan encontrar afectando yuca en muestras de campo.

La sonda fue específica en la detección del Reovirus (CFSV) y los separa de otros virus analizados (Tabla 12), además no existe riesgo de amplificaciones cruzadas con el ADN del fitoplasma 16SrIII-L que podrían originar falsos positivos.

Tabla 10. Especificidad de la sonda TaqMan® para la detección del reovirus (CFSV) segmento RNA 4 donde está ubicado el gen de la polimerasa.

Virus	Ct (dRn)
Carmovirus FNSV	No Ct
Potyvirus PRSV	No Ct
Comoviridae PatMMV	No Ct
Potyvirus	No Ct
Potexvirus PepMV	No Ct
Foveavirus	No Ct
Cuero de sapo yuca 16SrIII-L	No Ct
Reovirus CFSV	26.09
Reovirus CFSV	21.83
Planta sana	No Ct
NTC	No Ct

Al observar el alineamiento de la Figura 6 se aprecian diferencias entre la secuencia del *Rice ragged stunt virus* en la sección del amplicón frente a los alineamientos de los diferentes aislamientos del virus asociado con CS a pesar de pertenecer a la misma familia, de igual forma los aislamientos denominados como Amazonas y FSD29 muestran una diferencia del 11% frente al resto de aislamientos Cuervo (2006). Estas diferencias entre diferentes aislamientos del mismo virus y de otros virus dentro de la misma familia se explica por las altas tasas de mutación que ocurren durante la síntesis de RNA debido a que la enzima RNA polimerasa no tiene acción exonucleasa y por tal motivo no puede corregir errores (Drake & Holland, 1999).

7.1.8 Determinación de la sensibilidad, la eficiencia y curva de calibración utilizando estándares externos para la detección del fitoplasma 16SrIII-L

La curva de calibración presentó un R^2 de 99.6% (Figura 14) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN del microorganismo presente en una muestra. La eficiencia de la técnica fue del 97% encontrándose dentro de los límites recomendados 90% y 110% (Methods and Applications, Stratagene 2007). Las desviaciones estándar entre repeticiones de un mismo punto en la curva muestran resultados (Tabla 13) aceptables según lo reportado por Kokkinos & Clark (2006).

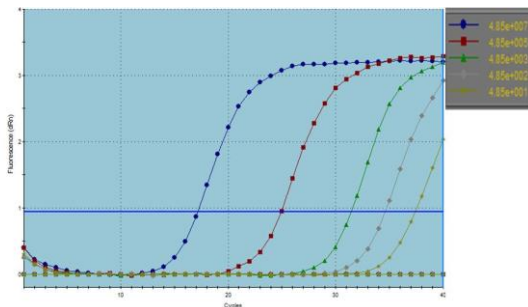


Figura 13. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasma 16SrIII-L utilizando diluciones seriadas de los estándares con concentraciones de 4.85×10^7 , 4.85×10^5 , 4.85×10^3 , 4.85×10^2 y 4.85×10^1 copias.

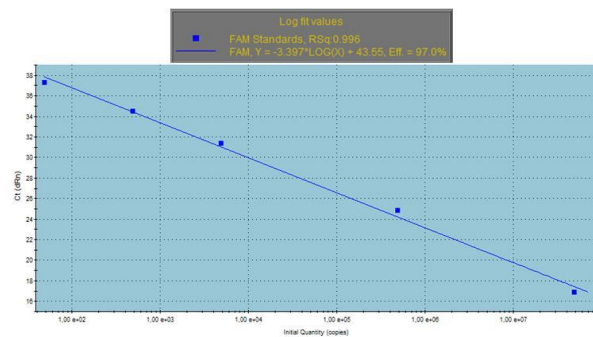


Figura 14. Curva de calibración utilizada en la cuantificación relativa del fitoplasma 16SrIII-L. Se observa una alta correlación y una eficiencia del 97%.

Tabla 13. Ct y desviaciones estándar de las amplificaciones de la curva patrón que contienen la ligación de un fragmento del gen *rp*.

Quantity (copies)	Ct Avg. Treated Ind. (dRn)	Ct SD Treated Ind. (dRn)
4.85E+07	16.9	0.32
4.85E+05	24.9	0.63
4.85E+03	31.38	0.09
4.85E+02	34.53	0.09
4.85E+01	37.32	0.56

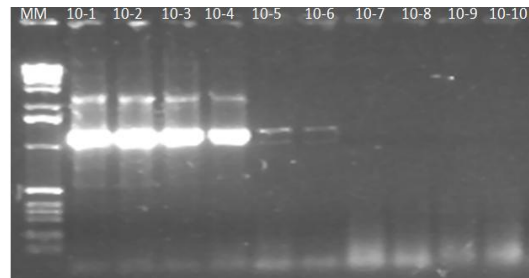


Figura 15. Sensibilidad de qPCR con los estándares utilizados para la curva de calibración. Las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} corresponden a los estándares de 4.85×10^6 , 4.85×10^5 , 4.85×10^4 , 4.85×10^3 , 4.85×10^2 , 4.85×10^1 de la figura 13.

La sensibilidad de la técnica de qPCR frente a la PCR anidada fue de 1000-10000 veces más sensible, y permitió detectar con el estándar construido hasta 4.85×10^1 (Figura 13) copias del fitoplasma. Con la PCR anidada solo se detectó hasta la dilución 10^{-6} (Figura 15) que corresponde al estándar 4.85×10^5 .

7.1.9 Sensibilidad, eficiencia y curva de calibración de la prueba de qPCR utilizando estándares para la detección del reovirus (CFSV)

La curva de calibración presentó un R^2 de 99.9% (Figura 17) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN del microorganismo presente en una muestra. La eficiencia fue del 104.7% encontrándose dentro de los límites recomendados como se dijo anteriormente. La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos los cuales indican una buena reproducibilidad de los primeros cinco puntos de la curva estándar, mientras que en el sexto punto 8.02×10^1 la técnica pierde reproducibilidad.

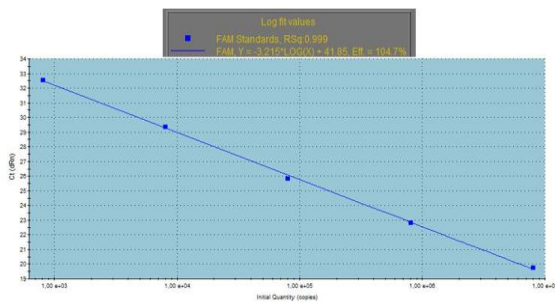


Figura 17. Curva de calibración utilizada para cuantificación relativa del reovirus (CFSV). Se observa una alta correlación y una eficiencia del 104.7%.

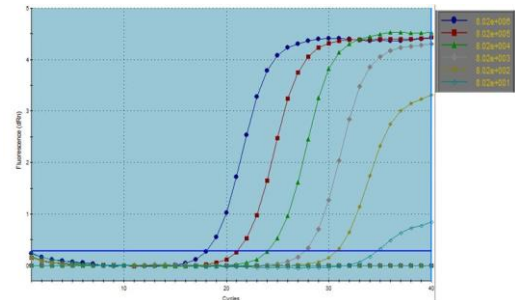


Figura 18. Sensibilidad del PCR en tiempo real para la detección del reovirus (CFSV) utilizando diluciones seriadas de los estándares correspondientes a concentraciones de 8.02×10^6 , 8.02×10^5 , 8.02×10^4 , 8.02×10^3 , 8.02×10^2 y 8.02×10^1 copias.

Tabla 14. Ct de estándares que contienen la ligación de parte del gen que codifica para la polimerasa.

Quantity (copies)	Ct Avg. Treated Ind. (dRn)	Ct SD Treated Ind. (dRn)
8.02E+06	19.76	0.23
8.02E+05	22.86	0.33
8.02E+04	25.86	0.05
8.02E+03	29.39	0.14
8.02E+02	32.56	0.18
8.02E+01	36.12	3.39

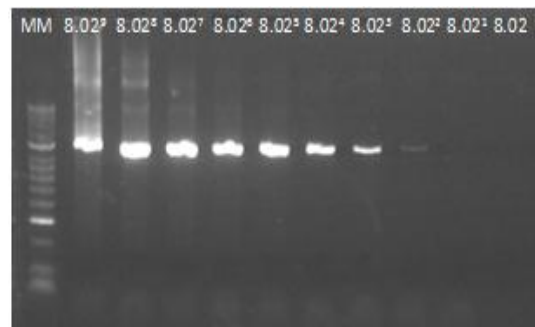


Figura 18. Sensibilidad de la prueba de PCR con los estándares utilizados para la curva de calibración. El carril está identificado por el número de copias del estándar utilizado.

La Figura 17 y 18 indica que la PCR en tiempo real y la RT-PCR tienen la misma sensibilidad cuando para la determinación de ésta se utilizan diluciones seriadas de plásmido, con lo cual se demuestra que se deben usar estos estándares de plásmido para comparar la sensibilidad de las dos técnicas, más no para cuantificar los números de copias del virus, debido a que es un método de cuantificación relativa (Zhang *et al.*, 2008). Para comparar la sensibilidad de las dos técnicas se deben utilizar diluciones de cADN (Ruiz *et al.*, 2009; Munford *et al.*, 2000). Para confirmar lo anterior se solicitó al laboratorio de Sanidad Vegetal del banco de germoplasma del CIAT-Palmira muestras ciegas de cADN en donde se encontraran muestras positivas y negativas (Figura 19), éste ensayo permitió conocer que la sensibilidad de la técnica de real time diseñada era mayor que la RT-PCR tradicional y que efectivamente hacer diluciones seriadas de plásmido era un error. En la Tabla 15 las amplificaciones marcadas con el color amarillo corresponden a resultados positivos por la técnica de RT-PCR al revirus (comunicación personal Ingeniera Maritza Cuevo, laboratorio de Sanidad Vegetal del banco de germoplasma CIAT-Palmira), las muestras con color verde en la Tabla 15 indican las amplificaciones adicionales detectadas por qPCR y no por la técnica convencional.

Tabla 15. Resultado de evaluación de cADN de plantas *invitro* del laboratorio de Sanidad Vegetal del banco de germoplasma CIAT-Palmira. Las amplificaciones de color amarillo son el resultado positivo al revirus por técnica convencional; las muestras de color verde son las detecciones adicionales por qPCR

Muestra	Ct
3	30.77
15	21.84
6	20.78
5	20.7
1	20.3
10	19.85
2	No Ct
4	No Ct
7	No Ct
8	No Ct
9	No Ct
11	No Ct
12	No Ct
13	No Ct
14	No Ct
16	No Ct
21	No Ct
22	No Ct
23	No Ct
24	No Ct
NTC	No Ct

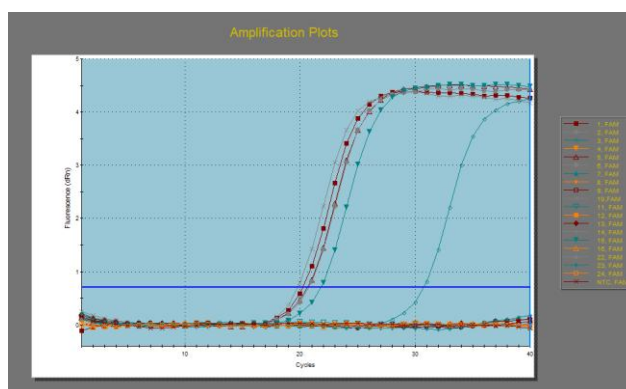


Figura 19. Amplificación por qPCR de evaluación de cADN del laboratorio de Sanidad Vegetal del banco de germoplasma CIAT-Palmira. Las amplificaciones de color amarillo (en la Tabla 15) son el resultado positivo por técnica convencional; las muestras de color verde son las detecciones adicionales obtenidas por qPCR.

En la Figura 20 se presenta la curva de calibración diseñada a partir de diluciones de cADN con un R^2 de 0.999 mostrando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias, muestra también una eficiencia en la amplificación de 101.9% encontrándose dentro de los rangos recomendados, en la Figura 21 se muestran las gráficas de amplificaciones por qPCR de las diferentes diluciones de cADN; al comparar

ésta Figura con la Figura 22 se observa que la sensibilidad de la técnica de qPCR para la detección del reovirus es 100 veces más sensible que la técnica de RT-PCR utilizada rutinariamente.

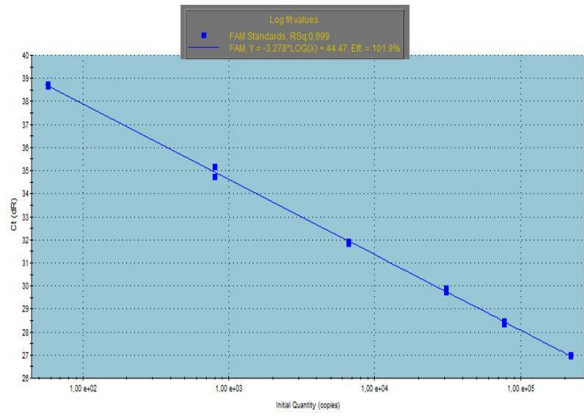


Figura 20. Curva de calibración utilizada para cuantificación relativa de Reovirus (CFSV). Utilizando diluciones de cADN. Se observa una alta correlación y una eficiencia del 101.9%.

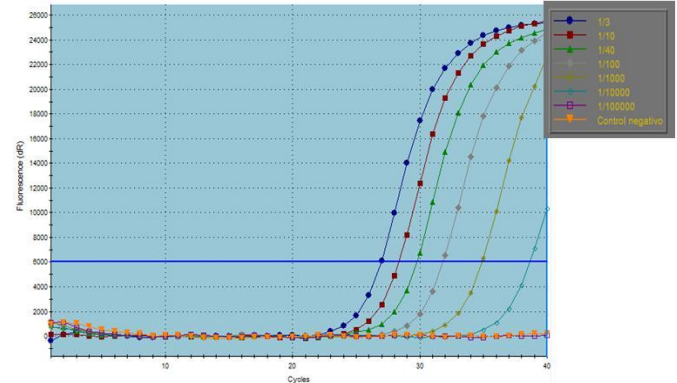


Figura 21. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de Reovirus (CFSV) utilizando diluciones de cADN 1/3, 1/10, 1/40, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000.

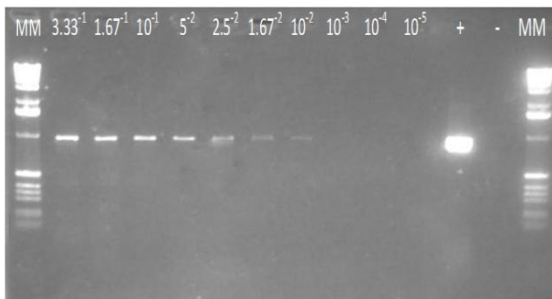


Figura 22. Sensibilidad de la prueba de PCR con los estándares utilizados para la curva de calibración utilizada en la detección del reovirus. El carril corresponde al número de copias del estándar utilizado.

Tabla 16. Sensibilidad de PCR en tiempo real para la detección de Reovirus (CFSV) utilizando diluciones de cADN 1/3, 1/10, 1/40, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000.

Dilución	Quantity (copies)	Ct SD
1/3	2.20e+005	0.03
1/10	7.69e+004	0.07
1/40	3.08e+004	0.09
1/100	6.66e+003	0.06
1/1000	8.06e+002	0.30
1/10000	5.80e+001	0.06
1/100000	No Ct	No Ct

Para la cuantificación rutinaria no se utilizaron las diluciones del cADN (Tabla 16) debido a que la reproducibilidad entre ensayos es menor y requiere de la preparación constante de estos estándares, las diluciones del plásmido son menos sensibles a la degradación y permiten un mayor número de ensayos con la misma dilución y manteniendo la reproducibilidad en los resultados. (Zhang *et al.*, 2008).

7.2 Validación del PCR en tiempo real para la detección del fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus (CFSV)

Las raíces utilizadas en este primer ensayo de correlación tenían un grado de severidad entre 4 y 5. En las raíces con síntomas de cuero de sapo de los 11 genotipos analizados se observaron un promedio de 2.32×10^5 copias del fitoplasma 16SrIII-L, con un porcentaje de detección del 82%. En contraste, para el reovirus (CFSV) se observó un promedio de 3.8×10^4 copias, representando un porcentaje de detección del 45%.

En la Figura 23 y en la Tabla 17 se muestran las concentraciones del fitoplasma y el virus detectados en las raíces, los genotipos CW 429-1 y BIPD 289-14 R1 son los únicos que presentan una concentración entre $5,24 \times 10^5$ - $1,87 \times 10^5$ similar al promedio detectado de fitoplasma en los otros cuatro genotipos. El genotipo CW 429-1 (Figura 22) es un material silvestre perteneciente a una especie diferente de *M. esculenta* y tiene características que lo hacen un buen candidato como fuente de genes de resistencia al deterioro en poscosecha (CIAT, 2005); este material fue utilizado por el programa de genética de yuca como madre de los genotipos BIPD evaluados, y posiblemente tiene alguna característica genética que puede favorecer el incremento del virus asociado con el deterioro en poscosecha.

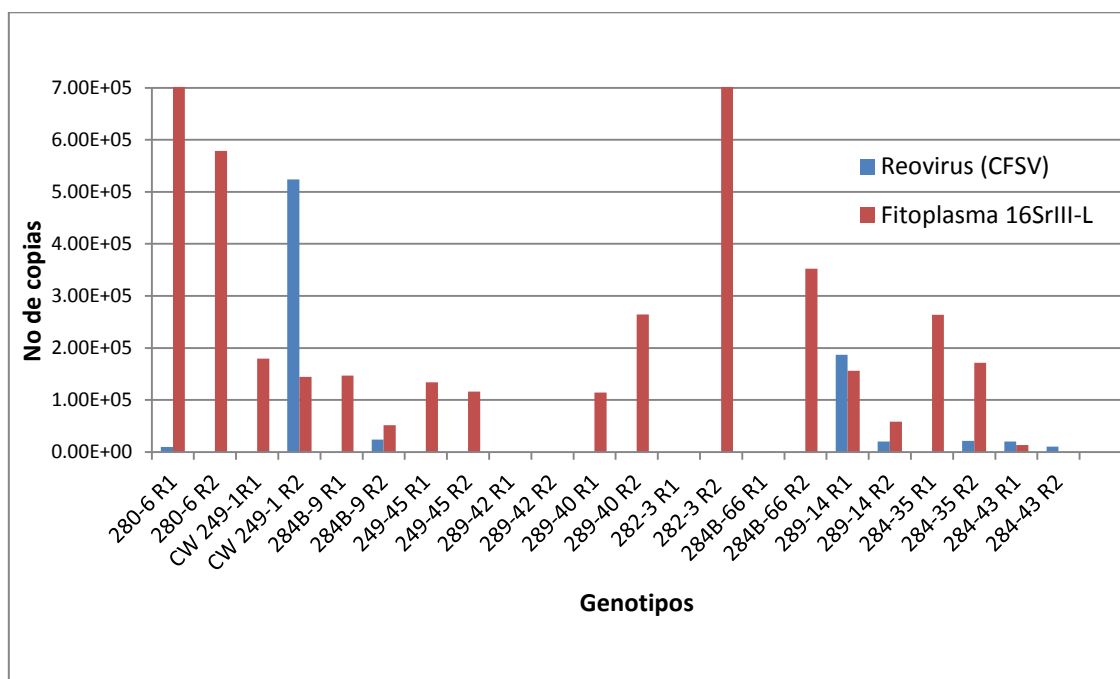


Figura 23. Determinación de la concentración del virus y el fitoplasma en 11 genotipos de yuca con grado de severidad en raíces entre 4 y 5 para cuero de sapo.

Tabla 17. Detección del fitoplasma y el reovirus en genotipos de yuca con síntomas de cuero de sapo mediante las técnicas de PCR en tiempo real, RT-PCR, PCR anidado.

Variedad	Virus			Fitoplasma		
	Ct (dRn)	Quantity (copies)	RT-PCR	Ct (dRn)	Quantity (copies)	PCR anidado
BIPD 280-6	34.49	1,00E+04	-	28.19	7,07E+05	-
BIPD 280-6	No Ct	0	-	29.47	5,79E+05	-
ow 249-1	No Ct	0	-	30.10	1,80E+05	-
ow 249-1	29.04	5,24E+05	-	30.40	1,45E+05	-
BIPD 284B-9	No Ct	0	-	30.38	1,47E+05	-
BIPD 284B-9	33.31	2,36E+04	-	31.83	5,18E+04	-
BIPD 249-45	No Ct	0	-	30.52	1,34E+05	-
BIPD 249-45	No Ct	0,00E+00	-	30.74	1,16E+05	-
BIPD 289-42	No Ct	0	-	No Ct	0,00E+00	-
BIPD 289-42	No Ct	0,00E+00	-	No Ct	0,00E+00	-
BIPD 289-40	No Ct	0	-	30.76	1,14E+05	-
BIPD 289-40	37.41	7,24E+02	-	29.49	2,64E+05	-
BIPD 282-3	No Ct	0	-	No Ct	0,00E+00	-
BIPD 282-3	No Ct	0,00E+00	-	26.71	1,65E+06	-
BIPD 284B-66	No Ct	0	-	38.53	4,22E+02	-
BIPD 284B-66	38.24	3,98E+02	-	29.16	3,52E+05	-
BIPD 289-14	29.72	187000	-	30.29	1,56E+05	-
BIPD 289-14	32.79	2,04E+04	-	31.67	5,83E+04	-
BIPD 284-35	No Ct	0	-	29.56	2,64E+05	-
BIPD 284-35	32.73	2,13E+04	-	30.16	1,72E+05	-
BIPD 284-43	32.81	20000	-	33.71	1,35E+04	-
BIPD 284-43	33.70	1,05E+04	-	No Ct	0,00E+00	-
Catumare <i>in vitro</i>	No Ct	0	-	No Ct	0,00E+00	-
NTC	No Ct	0,00E+00	-	No Ct	0,00E+00	-

En la Tabla 17 se observa que los resultados para el fitoplasma son reproducibles, mostrando en la mayoría de las detecciones valores de Ct similares. Las detecciones del virus son menos reproducibles, y el porcentaje de detección es bajo en raíces en comparación con el fitoplasma.

Para *Chrysanthemum yellows* phytoplasma grupo 16Sr-I que puede ser reportado que puede acumularse en las raíces en concentración diez veces mayor que en las partes jóvenes de la planta (Saracco *et al.*, 2006).

7.2.1 Validación de la técnica de qPCR frente a la prueba de injerto en la planta indicadora Secundina

El injerto en la variedad indicadora secundina es una técnica que se utiliza en CIAT para la detección de la enfermedad desde hace más de 20 años. El método consiste en injertar la variedad indicadora sobre el material que se desea evaluar, luego de 20-25 días se observa en las hojas de secundina un mosaico si la muestra es positiva (Cuervo., 2002).

Tabla 18. Resultado de la segunda fase de la validación de la técnica de qPCR desarrollada. Se evaluó la correlación entre el síntoma en campo al momento de la cosecha inicial (Evaluación en campo 2010), detección por qPCR de virus y fitoplasma.

ID planta	Genotipo	Grado de severidad de evaluación en campo 2010	Evaluación por qPCR Fitoplasma	Evaluación por RT-qPCR virus	Resultado injerto secundina	Grado de severidad de evaluación en campo 2010
1	BIPD 280-245	3	+	+	+	5
						5
2	BIPD 280-219	3	+	+	+	5
3	BIPD 280-79	4	+	+	P/F	4
4	BIPD 280-105	3	-	+	+	5
						4
5	BIPD 280-57	4	-	P/F	+	P/F
6	BIPD 280-142	3	+	+	+	4
7	BIPD 280-161	4	+	P/F	+	4
						4
8	BIPD 280-58	4	+	P/F	P/F	5
9	BIPD 280-8	2	+	+	+	5
10	BIPD 280-115	2	+	+	+	5
						5
						5
11	BIPD 280-3	4	+	P/F	+	4
12	BIPD 280-170	3	+	+	+	P/F
13	BIPD 280-228	4	+	+	+	P/F
14	BIPD 280-173	5	+	+	+	P/F
15	BIPD 280-268	4	+	P/F	+	P/F
16	BIPD 280-111	3	+	-	+	4
17	BIPD 280-22	3	+	-	+	4
18	BIPD 280-122	2	+	+	+	P/F
19	BIPD 280-217	2	+	-	+	5
20	BIPD 280-49	4	+	+	+	4
						5
21	BIPD 280-60	3	+	+	P/F	5

22	BIPD 280-116	4	+	+	-	1
						2
						1
23	BIPD 280-203	4	+	+	+	4
						4
						4
24	CM 7951-5	2	-	P/F	+	P/F
25	BIPD 289-21	5	+	+	+	5
26	BIPD 289-57	4	+	+	+	1
27	BIPD 289-27	5	+	+	+	5
28	BIPD 289-3	4	+	+	+	P/F
29	BIPD 289-44	5	+	+	+	1
30	BIPD 280-173	5	+	+	+	4.5
31	BIPD 284B-16	4	+	+	+	P/F
32	BIPD 284B-65	5	+	-	+	P/F
33	BIPD 284B-27	5	+	-	+	4.5
34	BIPD 284B-26	5	+	-	+	4
						4.5
35	BIPD 284B-9	5	+	+	-	1
						1.5
36	BIPD 284B-31	5	+	+	-	3
						3
						1
37	BIPD 284B-35	5	+	-	+	3.5
						4
38	BIPD 284B-66	5	+	+	+	3.5
						3
39	BIPD 284A-38	5	+	+	+	2
40	BIPD289-10	5	+	-	+	1
						1
41	HMC 2	1	-	-	-	1
42	MCOL 2066	1	-	-	-	P/F
43	MCOL 2215	1	-	-	-	P/F
44	MCOL 2425	1	-	-	-	1
45	MCOL 2621	1	-	P/F	-	P/F

*P/F= Planta Faltante.

En azul= resultados negativos con el injerto de Secundina proveniente de plantas enfermas.

En rojo= plantas con resultado positivo para qPCR para alguno de los dos microorganismos.

Con este ensayo de validación de la técnica también se pretendía evaluar la correlación entre el resultado del injerto y la presencia de moteado en las hojas de secundina.

Para este ensayo, de cada planta proveniente del campo (Grado de severidad de evaluación en campo 2010, Tabla 18) se tomaron tres estacas (semilla vegetativa) para la evaluación a través de qPCR de los dos microorganismos, el resultado que se presenta (+ ó -) en la Tabla 18. En la evaluación en campo en 2011 (Tabla 18) se presentan datos de severidad de las plantas de yuca al momento de la cosecha.

La tendencia para la mayoría de los genotipos es a incrementar o mantener la severidad entre las evaluaciones del año 2010 y 2011, esto coincide con lo reportado por Álvarez *et al.*, (2005). Este comportamiento de las raíces de yuca a incrementar la severidad sucede debido a que la yuca es un cultivo que se puede comportar como un perenne y las enfermedades asociadas a fitoplasmas como Bois noir en uva (Foissac, X y Wilson, M.R. 2010) y algunas virales (Agrios., 2005) son enfermedades monocíclicas, en las cuales el inóculo primario es el único inóculo, incrementándose entre un año y otro su concentración (Agrios., 2005), aumentando la severidad entre un año y otro (Teixeira *et al.*, 2008).

En la Tabla 18 en color azul se presentaron resultados negativos del injerto en evaluaciones de semilla proveniente de plantas enfermas con cuero de sapo, razón por la cual en la evaluación en campo del 2011 se observa por lo menos una planta sana.

En la Tabla 18 se identificaron plantas con resultado positivo para la técnica de qPCR e injerto que en la evaluación en campo del 2011 no mostraron síntomas de cuero de sapo en las raíces. Este resultado se explica por la sensibilidad de las dos técnicas (qPCR e injerto) para detectar en plantas asintomáticas.

El porcentaje de detección de la técnica de qPCR para el fitoplasma y para el injerto fue de 92.5% y el porcentaje de detección del virus por la técnica de qPCR fue de 76.47%. La detección de fitoplasma a través de qPCR presenta una buena correlación con la presencia de síntomas en raíces enfermas y con la técnica del injerto, lo cual significa que la técnica de qPCR podría llegar a sustituir el injerto en Secundina al tener el mismo porcentaje de detección en un menor tiempo de evaluación.

Este resultado sugiere que para hacer las detecciones mediante la técnica de qPCR se necesita conocer mejor la distribución del patógeno en la planta para saber con exactitud que tejido tomar y de qué parte de la planta, con el fin de evitar tomar varias muestras de una misma planta. No significa que la detección en Secundina sea sensible, lo que ocurre es un incremento de inóculo por el injerto expresando síntomas foliares en las plantas.

7.3 Distribución de Fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV)

7.3.1 Determinación de mejor tejido para detección

Para determinar la correlación de los síntomas en raíces comerciales con la presencia de cada uno de los dos microorganismos se hizo un ensayo para indentificar el mejor tejido de la planta para hacer las detecciones, en el ensayo se tuvo en cuenta el porcentaje de detección en cada uno de los tejidos y la concentración de los dos microorganismos en los dos genotipos analizados (Figura 24 y Figura 25). Los dos genotipos analizados son igualmente susceptibles en cuanto a los síntomas en raíces, sin embargo el genotipo BIPD 289-25 presenta cierto moteado en hojas asociados con la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2009). Los parentales de este genotipo son CW 429-1 x SM909-25, este último presenta moteados característicos de la enfermedad y una muy buena concentración de los dos microorganismos. La evaluación de estos genotipos se hizo porque se cree que la presencia de moteado se debe posiblemente a un mayor grado de susceptibilidad a los dos microorganismos, que permite a los dos agentes asociados con la enfermedad moverse libremente por la planta y acumularse en los diferentes tejidos (Saracco *et al.*, 2006).

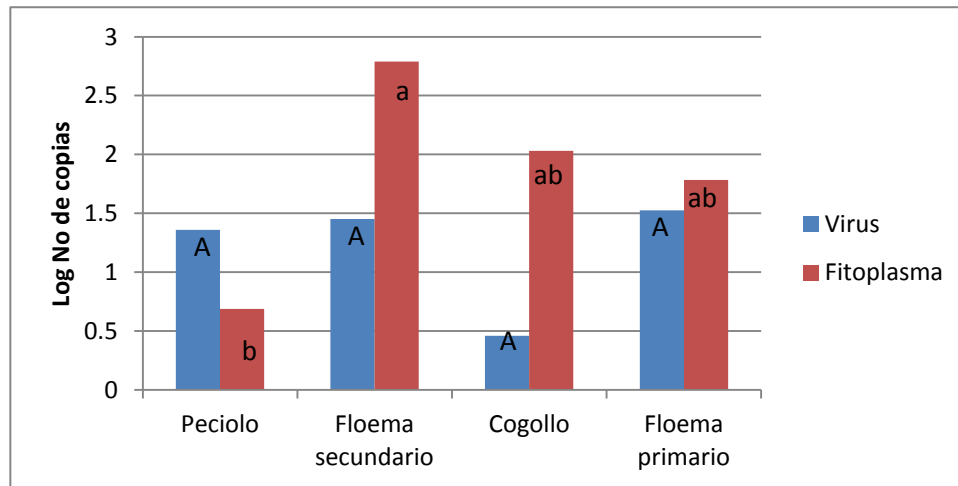


Figura 24. Concentración de los dos microorganismos asociados a la enfermedad del cuero de sapo en cuatro tejidos diferentes en el genotipo 249-45. El floema primario y secundario del tallo.

Para el genotipo 249-45 se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tejidos ($P < 0.05$), la prueba de diferencia de medias (DUNCAN) dio como resultado que el mejor tejido para la detección en cuanto a concentración de virus y fitoplasma es el floema secundario. El cogollo (Figura 24) a pesar de no tener diferencias significativas con los otros tejidos para el virus tiene un porcentaje de detección de 16% (tabla 19), lo cual sugiere que este tejido no es el indicado para la detección del virus en plantas que no expresan síntomas en hojas; posiblemente porque el cogollo o meristemo apical no tiene conexión con haces vasculares lo que impide que los dos microorganismos lleguen hasta este tejido (Carlsbecker & Helariutta., 2005) los porcentajes detectados es posible que se deban a contaminación al momento de la toma de la muestra con haces vasculares.

El floema secundario extraído a partir de tallo se escogió como el mejor tejido porque se encuentran los dos microorganismos en buena concentración (grafica 24) y porcentajes de detección de 83 y 100 para virus y fitoplasma respectivamente. (tabla19).

En la Figura 26B se observa un corte longitudinal del tallo, los círculos amarillos señalan los lugares en el tallo donde se encuentra el floema secundario, el cual está conectado por tubos laticíferos, secretores de látex como se observan en la figura 26B. En ésta misma figura se observa agrupamientos de haces vasculares donde se encuentra el floema secundario (Zhang *et al.*, 2003).

En la Figura 26A se observa el floema secundario en raíces de almacenamiento en donde se obtienen buenas amplificaciones de fitoplasma en raíz. El floema secundario en yuca se encuentra ubicado hacia la parte externa de la raíz entre el cambium y el parénquima, sin embargo Zhang *et al.*, (2003) reporta que no solamente el floema secundario se encuentra en esta región sino que además está distribuido en pequeños agrupamientos en la pulpa concentrándose en la parte interna de la raíz.

Tabla 19. Porcentajes de detección en peciolo, floema secundario, cogollo y floema primario, en el genotipo BIPD 249-45. Los floemas primario y secundario se refiere a los floemas presentes en el tallo.

	Peciolo	Floema secundario	Cogollo	Floema primario
Virus	83%	83%	16%	100%
Fitoplasma	50%	100%	66%	66%

El floema secundario, es el tejido conductor de fotoasimilados. Está constituido por tubos cribosos, células acompañantes, células parenquimáticas y tubo laticíferos, los cuales contienen látex, sustancia rica en azúcares, almidón, sales, terpenos y enzimas entre otros (Castilloa *et al.*, 1996). Los fitoplasmas están limitados al floema de las plantas más exactamente a los tubos cribosos, en estos tubos cribosos se encuentra glucosa, sacarosa y fructosa para ser utilizados como fuente de energía. Por otro lado los fitoplasmas no pueden metabolizar aminoácidos razón por lo cual tienen que utilizar los de la célula huésped. Los tubos cribosos del floema son células enucleadas que facilitan el movimiento de los fitoplasmas, estos tubos contienen células acompañantes con una alta tasa metabólica, existe evidencia que demuestra que los fitoplasmas dependen de estas células acompañantes, incrementando incluso la cantidad de nutrientes que pasan por los plasmodesmos hacia los tubos cribosos (Christensen *et al.*, 2005)

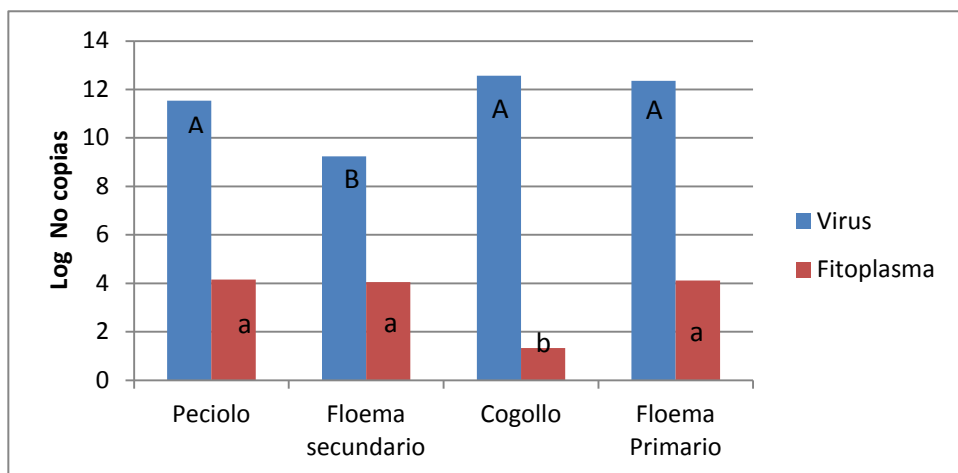


Figura 25. Concentración de virus y fitoplasma en cuatro tejidos diferentes en el genotipo 289-25. El floema secundario y primario del tallo.

En la Figura 25 se observa que el genotipo 289-25 a diferencia del 249-45 (Figura 24) presenta una mayor concentración de virus en comparación con el fitoplasma. Se observó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la concentración del virus en los tejidos de floema primario, cogollo, y pecíolo frente al tejido de floema secundario, encontrándose en este último la menor concentración de virus.

La concentración de fitoplasma Figura 25 para el genotipo 289-25 presenta diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en el cogollo frente a los tres tejidos restantes, por otro lado tuvo un porcentaje de detección de 40% (Tabla 20) siendo el más bajo de los cuatro tejidos. Este resultado demuestra al igual que con el genotipo 249-45 que el cogollo no es el tejido óptimo para utilizarlo en la detección de fitoplasma.

Para el genotipo BIPD 289-25 se concluye que cualquiera de los cuatro tejidos analizados a excepción del cogollo (para detección de fitoplasma) es óptimo para la detección de virus y fitoplasma.

Tabla 20. Porcentajes de detección de fitoplasma y virus en pecíolo, floema secundario, cogollo y floema primario, en el genotipo BIPD 289-25.

	Pecíolo	Floema secundario	Cogollo	Floema primario
Virus	100%	100%	100%	100%
Fitoplasma	100%	100%	40%	100%

La Tabla 20 muestra porcentajes de detección para el genotipo BIPD 289-25 para el virus y fitoplasma, en donde el único tejido en el que no se encontró un porcentaje de detección del 100% fue el cogollo en la detección que corresponde al fitoplasma.

Los genotipos BIPD 289-25 y BIPD 249-45 presentan diferencias notables en cuanto a: concentración de virus y fitoplasma, porcentajes de detección y distribución de virus y

fitoplasma en los cuatro tejidos analizados. Las diferencias observadas se son debidas a diferencias en susceptibilidad en los tejidos de la planta. Ambos genotipos son susceptibles en raíz, pero muestran diferencias en la parte aérea de la planta, en la cual el genotipo BIPD 249-45 no presenta ningún tipo de síntoma en hojas. Los altos porcentajes de detección de la tabla 20 para el genotipo BIPD 289-25 y la diferencia en la concentración de virus de los dos genotipos analizados podría sugerir que este síntoma en hojas del genotipo BIPD 289-25 se trata de la ausencia de un mecanismo de resistencia que si está presente en el genotipo BIPD 249-45; posiblemente este mecanismo consista en restringir el movimiento del virus por la planta causando a su vez un disminución en la concentración de éste en la planta (Lin *et al.*, 2007). El bloqueo del movimiento del virus por la planta es solo una de las tres estrategias utilizadas por las plantas como mecanismo de defensa; las otras dos estrategias son mediante el bloqueo del ensamble y replicación del virus (Lin *et al.*, 2007).

En la Figura 25 se observa que la concentración de fitoplasma en el genotipo BIPD 289-25 es menor, esto se explica posiblemente como se ha dicho por la menor susceptibilidad de este genotipo. Se ha reportado que la concentración de fitoplasmas varía de acuerdo a la susceptibilidad de la planta, al tipo de síntoma expresado, el aislamiento de fitoplasma, edad de la planta en la que se inicio la infección y las condiciones climáticas (Saracco *et al.*, 2006; Berges *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en cuanto a las diferencias en concentraciones de los dos microorganismos en los dos genotipos evaluados y su posible correlación con los síntomas foliares del genotipo BIPD 298-25, coincide con lo reportado por Kartte & Seemuller., (1991) quienes encontraron altas concentraciones del fitoplasma Apple proliferation en raíces de los genotipos de manzana *Malus domestica* y *M. silvestris* que presentaban como síntoma característico escoba de bruja, los tubos cribosos de estas plantas estaban poco afectados y las plantas no presentaron marchitamientos; por el contrario los genotipos *M. tschonoskii*, *M. sargentii* y *M. kansuensis* presentan bajas concentraciones del patógeno y como síntoma característico un amarillamiento, los tubos cribosos necrosados y marchitamiento de los árboles.

Un comportamiento similar se reportó en árboles del género *Ulmus* infectados con el fitoplasma Elm yellows. *U. americana* y *U. rubra* tienen una muy baja concentración de fitoplasma, sus síntomas se caracterizan por ser inespecíficos terminando en un marchitamiento de la planta; mientras que *U. minor* y *U. laevis* tienen concentraciones altas expresando escoba de bruja y las plantas son menos propensas al marchitamiento (Berges *et al.*, 2000).

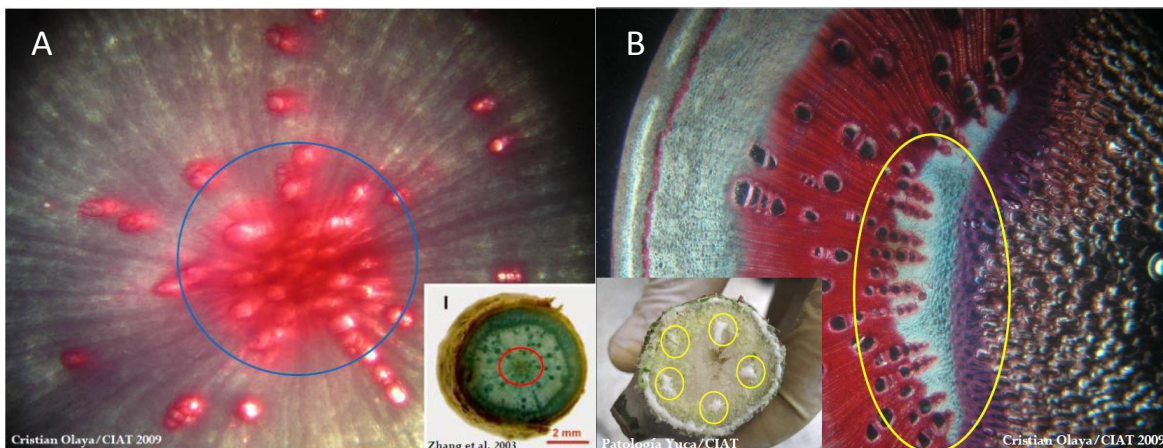


Figura 26. Floema secundario en raíz y tallo. A. Fotografía de raíz. El recuadro grande muestra una raíz de una planta de yuca de 3 meses, en la parte interna (círculo azul) se observa la mayor acumulación de haces vasculares. El recuadro pequeño muestra una raíz de un año, indicando el lugar donde se encuentra el floema secundario (círculo rojo). B. Fotografía de tallo de una planta de invernadero de tres meses, el círculo amarillo muestra un agrupamiento de haces vasculares donde se ubica un floema secundario. El recuadro pequeño en los cinco círculos amarillos muestra vasos laticíferos en donde se encuentra floema secundario.

7.3.2 Determinación de la distribución de Fitoplasma 16SrIII-L y/o reovirus (CFSV) en tercio bajo, medio y superior de la planta de yuca

La semilla asexual se colocó a germinar en potes de 2 Kg de mezcla de suelo y arena, luego de 20 días, se hicieron las detecciones de virus y fitoplasma. Posteriormente las plantas se sembraron en campo para el ensayo de correlación entre síntomas expresados en raíces y detección de los dos microorganismos.

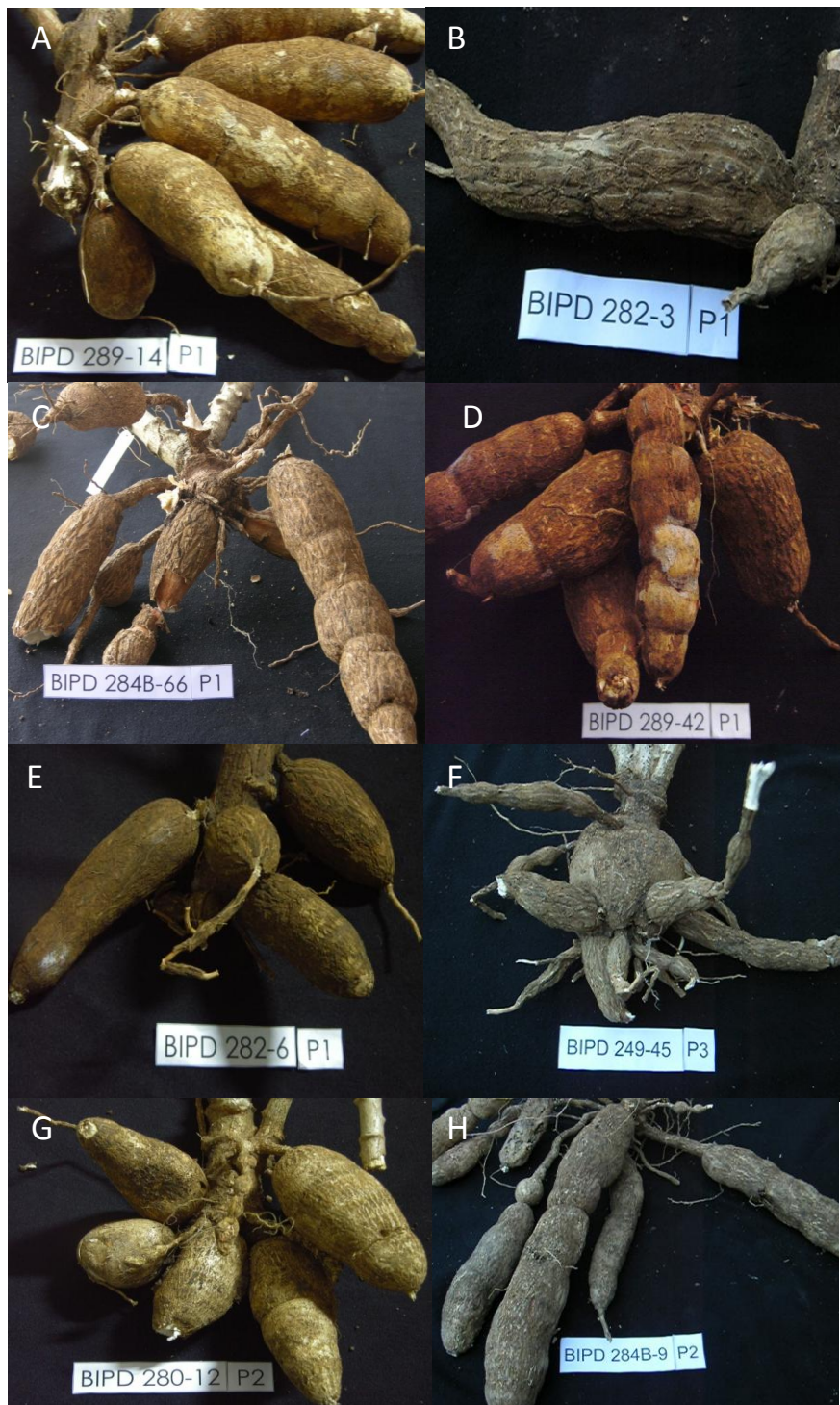


Figura 27. Raíces de Genotipos de yuca mostrando síntomas de cuero de sapo con un nivel de severidad de 4, utilizadas en las pruebas de validación y correlación de síntomas. P1 y P2 indican el número de la planta de la cual fueron cosechadas. A. Genotipo BIPD 289-14; B. BIPD 282-3 P1; C. BIPD 284B-66 P1; D. BIPD 289-42 P1; E. BIPD 282-6 P1; F. BIPD 249-45 P3; G. BIPD 280-12; I. BIPD 284-9 P2.

En esta primera fase se tomaron plantas de seis genotipos provenientes de campo y un control negativo. Las estacas se sembraron en bolsas plásticas y una vez germinadas se tomó tejido para hacer la detección.



Figura 28. Crecimiento de plantas de yuca en jaulas establecidas para evaluar la correlación de la presencia de síntomas de cuero de sapo y los niveles de detección de los microorganismos asociados. A. Jaulas de malla con las plantas distribuidas según el diseño experimental anterior. B. En cada jaula se ubicaron 6 plantas del mismo tercio del tallo y mismo genotipo. C. las Jaulas estaban totalmente cerradas y solo se podían abrir mediante un velcro, D. Para las detecciones se tomaron tallos.

Se observó una mayor concentración de fitoplasma en comparación con la concentración de virus, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de los patógenos en los tres tercios analizados debido al elevado coeficiente de variación (Tabla 21) y a la alta desviación estándar que presentaron las detecciones (Figura 29) esto demuestra que en ninguno de los tres tercios evaluados los dos microorganismos se concentran de forma definida en un tejido determinado de la planta. Esta detección se realizó en 180 plantas de los genotipos BIPD 284-35, BIPD 289-42, BIPD 284-43, BIPD 249-45, BIPD 284B-66, y secundina como se describe en el Anexo F. En la Figura 33 se ilustra de manera gráfica la distribución de los dos agentes patógenos en la planta de yuca, en donde los cuadros rojos son detecciones negativas y los verdes son positivas. No se observa ninguna tendencia en la distribución del patógeno.

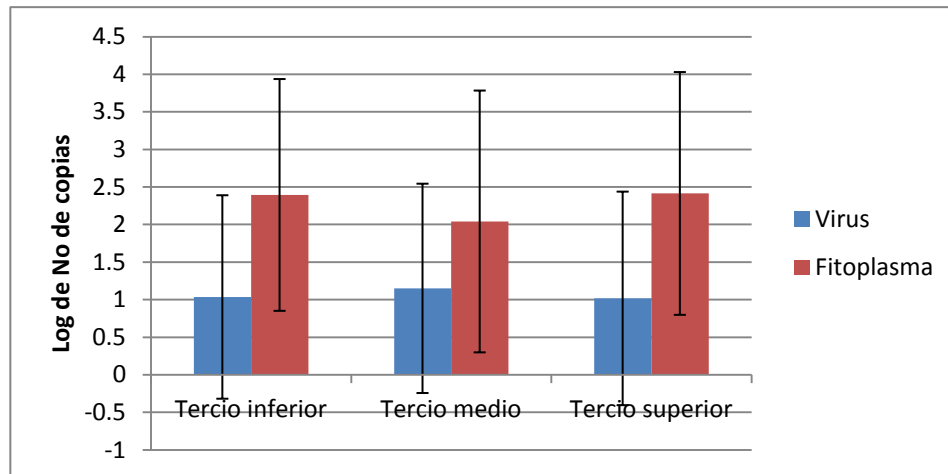


Figura 29. Distribución de los dos patógenos asociados con el cuero de sapo en los tres tercios de la planta de yuca para virus y fitoplasma.

Resultados similares fueron obtenidos por Baric *et al.*, (2010) quienes trabajaron con el fitoplasma *Ca. P.mali* en árboles de manzana y encontraron una distribución irregular de árboles muestreados en la parte aérea a 1 metro, 1.5 metros y 2 metros del nivel del suelo, encontrando un nivel de detección del 81% y un patrón de distribución irregular. Igualmente esto ha sido demostrado en la enfermedad del Huanglombinh (HLB) en la cual un árbol infectado por el patógeno no se detecta en todas las hojas y no todas las ramas de la planta presenta la enfermedad confirmando la distribución irregular del patógeno en la planta (Teixeira *et al.*, 2008). En la planta *Euphorbia pulcherrima* se demostró la distribución irregular del fitoplasmas utilizando una sonda universal para evaluar hojas, raíces y peciolos de diferentes partes de la planta (Christensen *et al.*, 2004).

Tabla 21. Coeficientes de variación de No. de copias para evaluaciones de distribución de los dos microorganismos en los diferentes tercios. Este valor es sin transformar datos e incluye detecciones negativas

	Coeficiente de variación para No. de copias
Fitoplasma	258.1
Reovirus	325.2

Los elevados valores de coeficientes de variación obtenidos en las pruebas de detección de los microorganismos dan un indicio de la distribución irregular de éstos, que se puede explicar de dos maneras: La primera de ellas debido a el método utilizado para la determinación del número de copias, no utiliza un gen normalizador que amplifique material genético de la planta (Christensen *et al.*, 2004).; la segunda es que por evaluarse los tercios de cinco genotipos, éstas pueden tener un comportamiento diferente a la presencia de los dos microorganismos, contribuyendo a incrementar los índices de variación.

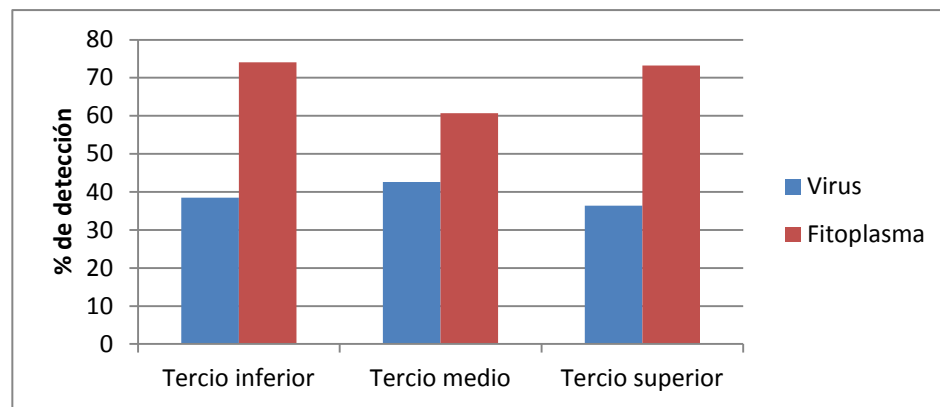


Figura 30. Comparación de los porcentajes de detección para los dos microorganismos en tercio inferior, tercio medio, tercio superior de la planta.

En la figura 30 se observa que el porcentaje de detección para fitoplasma es mayor que para el virus, lo cual coincide con la figura 29, concluyendo que no solamente la concentración de fitoplasma es mayor sino que además tiene el mayor porcentaje de detección.

Dentro de los tercios evaluados, para el virus se encontró un porcentaje de detección entre 38% y 42%; para el fitoplasma se encontró un porcentaje de detección entre el 60 % y 74% (figura 30). Este porcentaje de detección para el fitoplasma coincide con lo reportado por Baric *et al.*, (2010) quienes en evaluaciones de cogollos a diferentes alturas de la planta de manzana encontraron un porcentaje de detección de 81%, encontrando un 19% de muestras sanas a pesar de venir de plantas con síntomas característicos de Apple proliferation (AP).

Los porcentajes de detección de los microorganismos asociados a la enfermedad del cuero de sapo pueden ser afectados por variaciones en factores abióticos microgeográficos tales como temperatura, luminosidad, propiedades del suelo o disponibilidad de agua, que pueden modificar las condiciones fisiológicas de la planta y así facilitar o dificultar la movilidad de los dos organismos. (Abdel-Farid *et al.*, 2009).

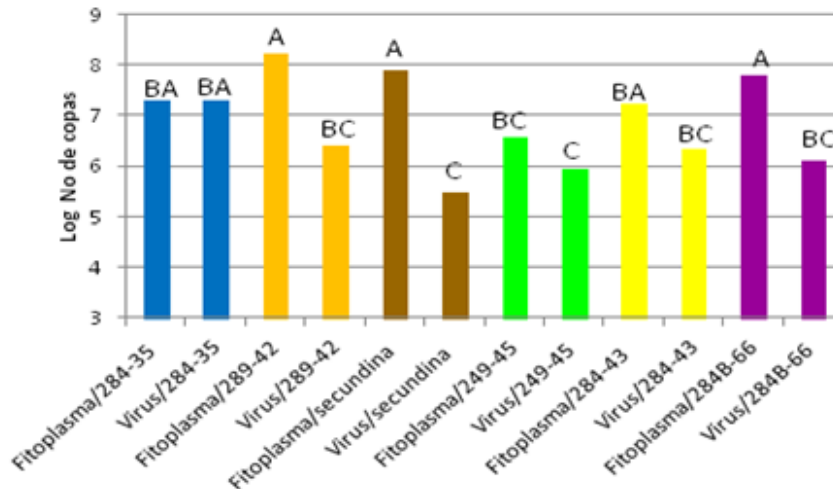


Figura 31. Comparación entre la concentración de cada uno de los agentes asociados en las seis variedades evaluadas. Este análisis se hizo transformando el número de copias a Log de número de copias.

Los resultados del análisis estadístico mostrado en la Figura 29 indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución en cuanto a los dos microorganismos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos cuando se analiza para cada microorganismo por separado. Se planteo un análisis en donde la combinación microorganismo variedad es tomado como tratamiento analizando de esta manera los dos patógenos dentro del mismo análisis y realizando una transformación de datos de número de copias a Log de número de copias. Con este análisis se encontraron diferencias estadísticamente significativas $P > 0.01$ en la concentración de los dos microorganismos en las plantas y entre tratamientos (variedad-microorganismo) $P > 0.03$.

En la figura 31 se observa el comportamiento de cada uno de los patógenos en las diferentes variedades evaluadas, encontrándose que en las variedades BIPD 284-35, BIPD 249-45 y BIPD 284-43 no se observó diferencias significativas entre la concentración del virus y fitoplasma; a diferencia de las variedades BIPD 289-42, Secundina, y BIPD 284B-66 en donde las concentraciones de dos patógenos son significativamente diferentes.

La tendencia general de los resultados obtenidos, fue mayor concentración de fitoplasma en comparación con el virus (Figura 31). El único genotipo que presento igual cantidad de virus y fitoplasma fue el genotipo 284-35. Sin embargo en los porcentajes de detección siempre se observa un mayor porcentaje de detección para el fitoplasma (Figura 32). Los

genotipos 284-35 y 249-45 presentan los porcentajes de detección más bajos para fitoplasma entre 42% y 55% y los genotipos restantes presentan un porcentaje de detección entre 75% y 82%, lo cual coincide con los porcentajes encontrado por Baric *et al.*, (2010) en arboles de manzana infectados con la enfermedad Apple proliferation.

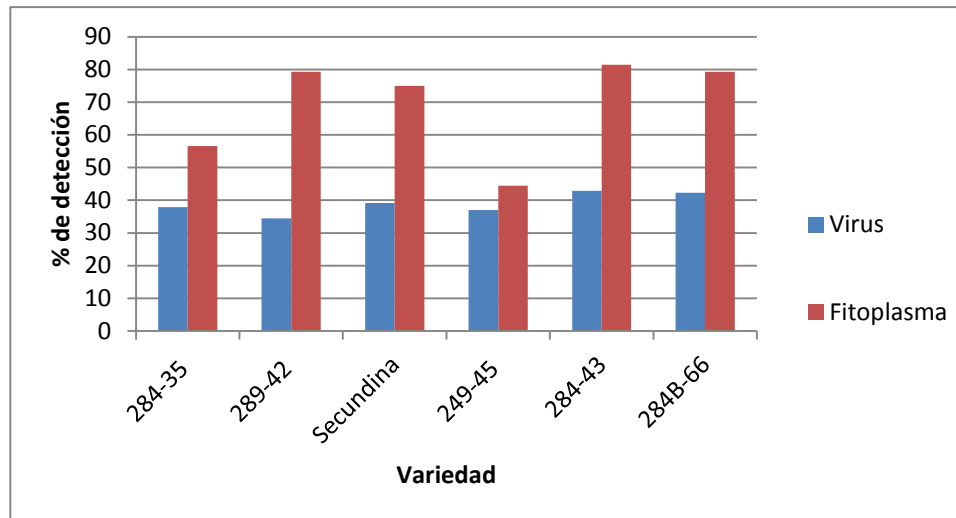


Figura 32. Porcentaje de detección para las seis variedades evaluadas.

Los porcentajes de detección del virus se mantienen entre el 33% y 42%. Las diferencias en los porcentajes de detección entre genotipos implica un verdadero obstáculo para certificación de semilla a partir de semilla asexual proveniente de campo; como se observa en la Figura 32 no todos los porcentajes de detección son iguales a pesar de ser plantas enfermas en el mismo grado de severidad.

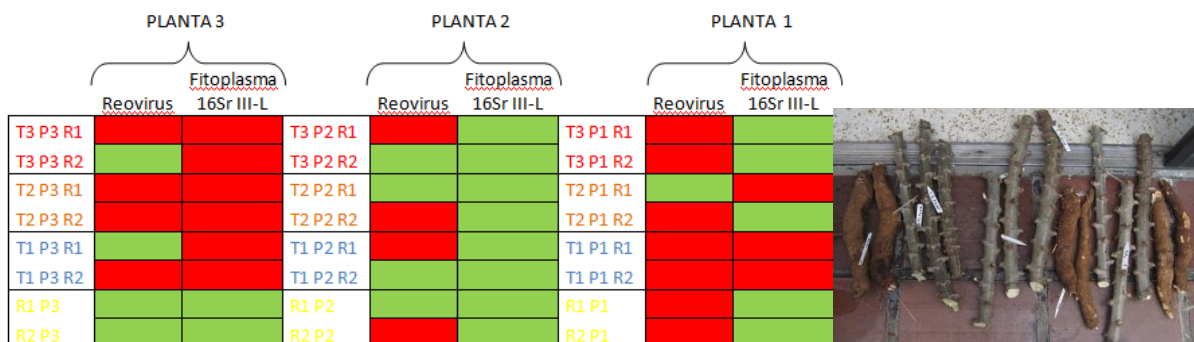


Figura 33. Los cuadros rojos y verdes corresponden a detecciones negativas y positivas respectivamente para cada uno de los dos agentes asociados a la enfermedad del cuero de sapo en tres plantas diferentes. R; indica que el tejido analizado proviene de raíz. T1; estacas de tercio bajo. T2; estacas de tercio medio. T3; estacas de tercio superior.

Las pruebas de distribución de los dos microorganismos se hicieron en 158 estacas de yuca encontrando cada uno de los antes asociados en la proporción que se muestra en la Figura 34. Es de resaltar que la probabilidad de encontrar el fitoplasma únicamente es 41.77%, virus 13.29% y los dos juntos en la misma estaca es de 22.52%. Es decir que la

probabilidad de encontrar el fitoplasma es de 64.9% contra la probabilidad de encontrar el virus 35.81%.

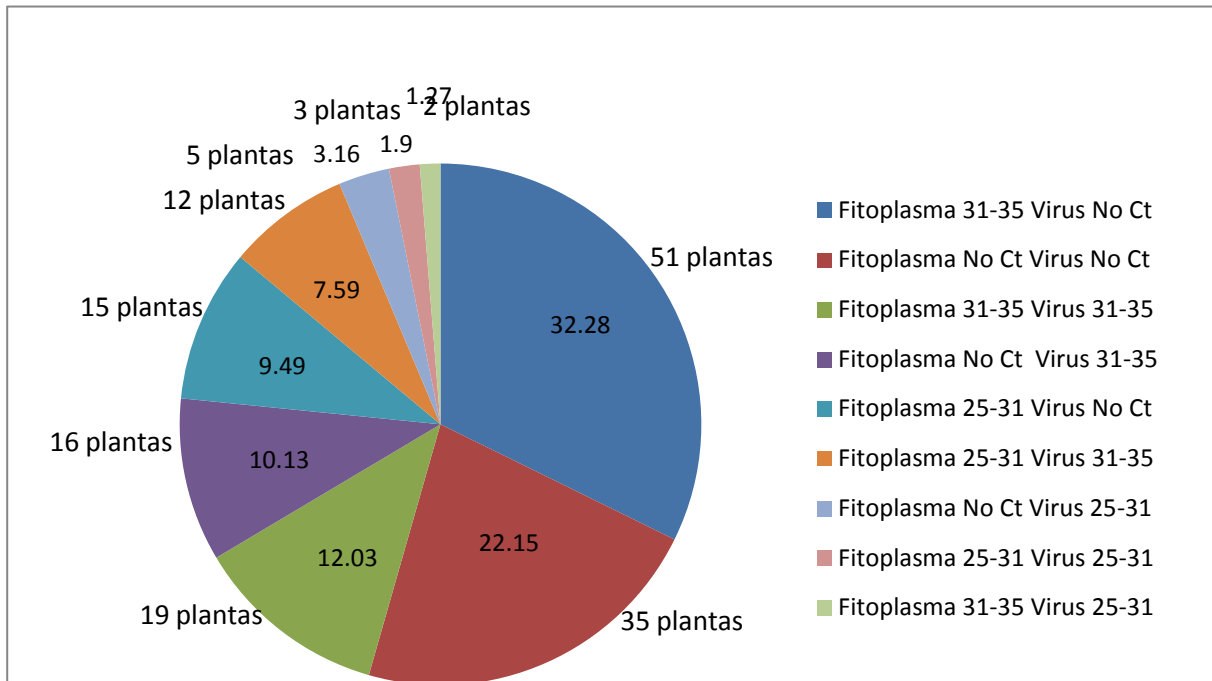


Figura 34. Porcentaje de detección en semilla asexual de yuca. Se describe el porcentaje encontrado de las diferentes combinaciones de los dos microorganismos asociados con la enfermedad del cuero de sapo de la yuca.

Los virus establecen sinergismos causando síntomas más severos y potencializa la multiplicación de los microorganismos en la coinfección. (Wege & Siegmund, 2007). En algunos casos la concentración de uno de los virus asociados es muy baja y no causa síntomas si se encuentra solo, éste es el caso del sinergismo entre *Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV, género Potyvirus)* y *Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV, género Crinivirus)* en el cual cuando el virus SPFMV se encuentra solo, éste no causa síntomas severos y su concentración es muy baja (Karyeija *et al.*,2000). Otro ejemplo de virus que se asocian restringidos a floema es Lettuce infectious yellows virus (LIYV) género Crinivirus familia Closteroviridae y Turnip mosaic virus (TuMV), el virus LIYV se encuentra en muy bajo título viral dificultando su estudio, cuando se inocula este en plantas de *Nicotiana benthamiana* los dos virus por separado causan síntomas sin embargo cuando se inoculan los dos virus juntos, los síntomas son mucho más fuertes presentándose el fenómeno de sinergismo (Wang *et al.*,2009).

Un último ejemplo de asociaciones de virus es el Abutilon mosaic virus (AbMV familia Geminiviridae) con el Cucumber mosaic virus (CMV familia Bromoviridae) en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Este es el primer sinergismo comprobado entre un virus ssADN y un virus RNA en el que la proteína CMV 2b cumple la función de suprimir la respuesta de silenciamiento de la planta huésped hacia el virus, esta respuesta causa que el Cucumber mosaic virus incremente la concentración del Abutilon mosaic virus y la severidad de los síntomas, modificándose el tropismo del virus AbMV en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Wege & Siegmund, 2007).

Las asociaciones no solo se dan entre virus, éstas pueden darse también entre virus y fitoplasmas el más conocido de estas asociaciones ocurre en la enfermedad del enanismo del maíz en la que intervienen: *Maize rayado fino virus* (MRFV familia *Tymoviridae*) y *Maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP) se encuentran junto con *Spiroplasma kunkelii*. La expresión de los síntomas varía cuando se presentan cualquiera de estos agentes asociados por separado (Chicas *et al.*, 2007). Otro ejemplo de enfermedad causada por virus y fitoplasma ocurre en el cultivo de la caña en la enfermedad del mosaico estriado en donde se han encontrado asociados a la sintomatología un virus de dsRNA y un fitoplasma del grupo 16SrIII. Aljanabi *et al.*, (2001) realizó un experimento en el que realizaron detecciones tanto de virus como de fitoplasmas a 134 muestras, de las cuales 76 tenían los síntomas típicos de la enfermedad detectándose el fitoplasma en un 61.48%; 58 plantas eran asintomáticas detectándose el fitoplasma en un 27.5%. En 53.9% de las plantas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad detectaron los dos microorganismos, encontrándose el virus solo en el 23.6% de las plantas analizadas. Este resultado coincide con lo reportado para yuca en la Figura 34 en donde se detecta el virus en un 13.29% de las plantas analizadas.

7.4 Determinación de correlación de síntomas observados en raíces comerciales con la presencia del fitoplasma 16SrIII-L y reovirus.

Con las plantas utilizadas en el ensayo de distribución se realizó una selección de acuerdo a los valores de Ct y se utilizaron como controles negativos plantas *in vitro* de la variedad Secundina.

Para el establecimiento en campo del experimento de correlación de síntomas observados en raíces con la presencia de cada uno de los microorganismos, no se tuvo en cuenta la variedad, solo la presencia de los dos microorganismos asociados con la enfermedad debido a que por un lado se quería validar la técnica con datos de campo y por otro lado correlacionar la presencia de los dos microorganismos asociados con los síntomas en raíces al momento de la cosecha.

Para evaluar el efecto de cada uno de los microorganismos asociados sobre los síntomas se tuvieron en cuenta las siguientes variables: Grado de severidad según escala de evaluación de la Universidad de Córdoba, peso de raíces en el aire, número de raíces totales, número de raíces afectadas, grosor de raíces enfermas, grosor de raíces sanas, grosor de tocón, longitud de raíces sanas, longitud de raíces enfermas y escala de severidad de 1-5 evaluando raíz por raíz y porcentaje de severidad. Las evaluaciones nombradas se realizaron para cada planta ubicada dentro de las parcelas.

La cosecha se realizó a los 8 meses después de la siembra momento en el cual ya se observaban síntomas característicos de la enfermedad y para evitar pérdidas de raíces causa de la alta humedad del suelo.

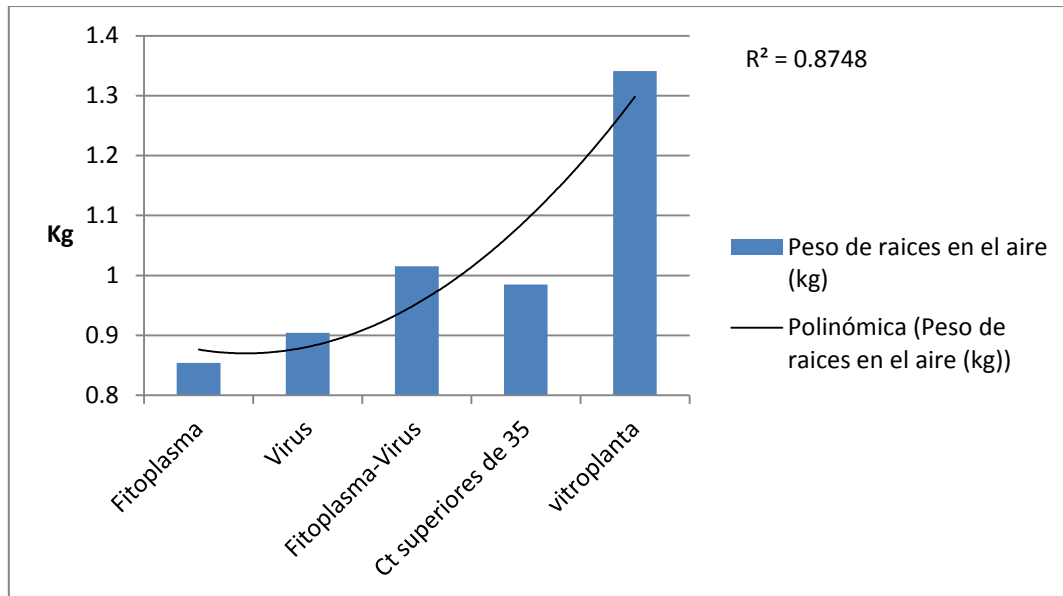


Figura 35. Peso de raíces en el aire (Kg) de los diferentes tratamientos Fitoplasma, Virus, Fitoplasma-Virus, Ct superiores de 35 (plantas a las que se les detectó ct superiores de 35 que son tomados como amplificaciones no reproducibles).

La variable peso de las raíces en el aire (Figura 35) mostró rendimiento en raíces de plantas con solo presencia de fitoplasma correspondiente a 0.85 kg de raíces por planta, con el tratamiento de virus 0.90 kg de raíces por planta, virus-fitoplasma 1.015 kg de raíces por planta, plantas con Ct mayores de 35 se obtuvo 0.98 kg raíces/planta y con las plantas invitro de la variedad secundina 1.34 kg de raíces/planta. Este resultado sugiere que cuando el fitoplasma se encuentran (en concentraciones entre Ct de 25 y 35) por separado infectado plantas causan una mayor disminución del rendimiento en comparación a la coinfección. La explicación a este incremento en el rendimiento podría ser un posible fenómeno de hipovirulencia. Existen varios ejemplos en los que virus de dobles cadenas causan hipovirulencia en hongos como *Botrytis cinerea* (Wu *et al.*, 2007), *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhang *et al.*, 2009), *Cryphonectria parasitica* (Prospero *et al.*, 2006), *Rosellinia necatrix* (Kanematsu *et al.*, 2004), *Helicobasidium mompa* (Osaki *et al.*, 2004), *Alternaria alternata* (Aoki *et al.*, 2009).

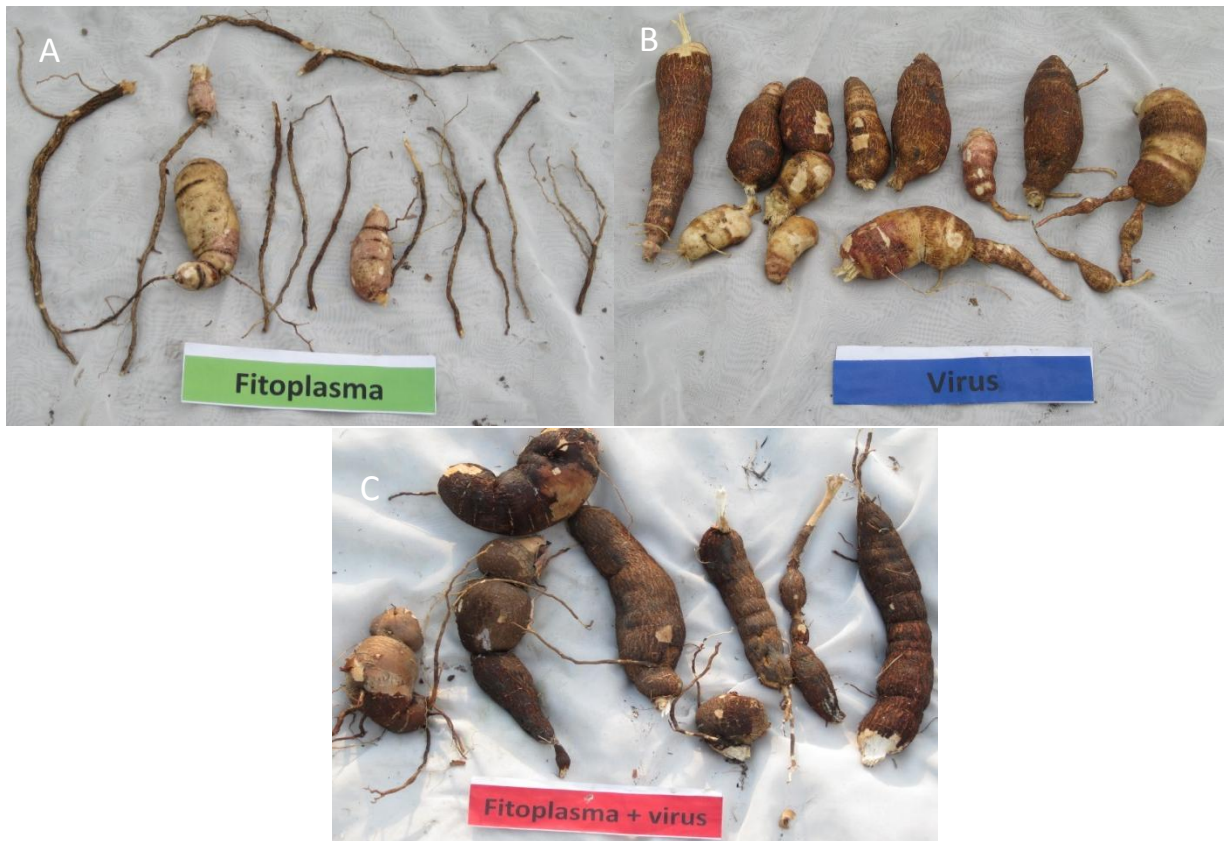


Figura 36. Representación de síntomas encontrados en los tratamientos. A. las raíces del tratamiento fitoplasma presentaron escaso llenado, labios profundos y escaso peso en el aire; B. el tratamiento de virus presentó labios profundos llenado intermedio de raíces; C. el tratamiento de fitoplasma-virus presentó un mejor llenado de raíces, presencia de labios en todas las raíces.

El fenómeno de **hipóvirulencia** se caracteriza por la disminución o ausencia de patogenicidad en patógenos infectados con virus dsRNA, alteración de la morfología, tasa de crecimiento del microorganismo y cambios en la coloración del organismo parasitado. (Aoki *et al.*, 2009).

Sin embargo en investigaciones con fitoplasmas no se ha reportado el fenómeno de hipovirulencia con virus de dsRNA. Se han reportado variaciones en los síntomas causados en la enfermedad del enanismo del maíz, en la cual cuando se presenta el virus *Maize rayado fino virus* (MRFV) y *Maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP) y *Spiroplasma kunkelii* la expresión de los síntomas es diferente a cuando se presenta cada uno de éstos microorganismos por separado (Chicas *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior la asociación entre virus y fitoplasma en la enfermedad del cuero de sapo de la yuca es un caso en donde la presencia de los dos microorganismos (virus y fitoplasma) produce una variación en los síntomas, observándose un mayor rendimiento en comparación a cuando se detecta únicamente el fitoplasma (Figura 36).

Tabla 22. Prueba LSMEANS para peso de raíces en el aire para los diferentes tratamientos Fitoplasma, Virus, Fitoplasma-Virus, Ct superiores de 35 (plantas a las que se les detectó ct superiores de 35 que son tomados como amplificaciones no reproducibles). $P < 0.1$.

	Vitroplanta	Fitoplasma	Virus-Fitoplasma	Virus	Ct superiores de 35
Vitroplanta		<.0001	0.0010	<.0001	0.0003
Fitoplasma	<.0001		0.0662	0.3614	0.0965
Virus-Fitoplasma	0.0010	0.0662		0.3836	0.7988
Virus	<.0001	0.3614	0.3836		0.5058
Ct superiores de 35	0.0003	0.0965	0.7988	0.5058	

Anteriormente se presentó que la correlación o porcentaje de detección en raíces era de 82% para fitoplasma y un 45% para virus y en semilla vegetativa es de 64.9% y 35.8% respectivamente. Lo cual asocia al fitoplasma en una alta proporción con los síntomas observados en raíces, además como se observa en la Figura 36, la presencia únicamente del fitoplasma en las raíces causa un menor rendimiento en comparación con los otros tratamientos. En la Tabla 22 se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento fitoplasma y virus-fitoplasma al igual que con las detecciones con Ct mayores de 35, lo que demuestra que las plantas en las que se detectaba únicamente fitoplasma presentaban mayor severidad.

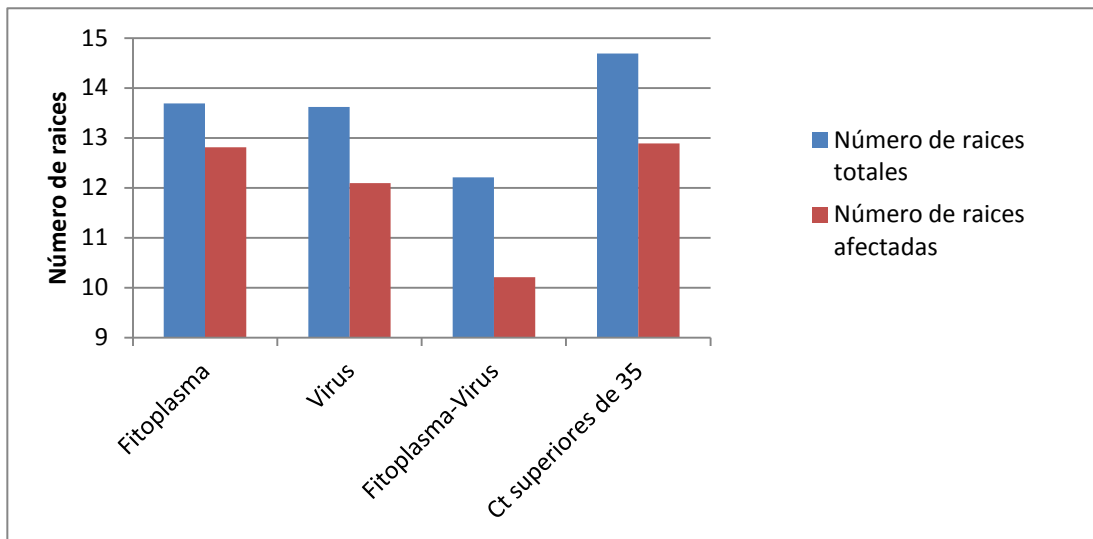


Figura 37. Comparación entre el número de raíces totales y enfermas para cada uno de los tratamientos.

Se han reportado para el *Raspberry latent virus* (RpLV) una identidad de 36% con el *Rice raggent stunt virus* (RRSV) similar al reovirus asociado al cuero de sapo de la yuca con una identidad de 39% y similitud del 55% con la región homóloga de la proteína P1 del RRSV (Cuervo, 2006). El virus RpLV, se encontró en plantas asintomáticas de *Rubus* y que al ser injertadas con la planta indicadora no expresan ningún tipo de sintomatología, además los virus de esta familia normalmente afectan plantas monocotiledonias y *Rubus* es dicotiledónea, sin embargo no se conoce bien el rol de este virus cuando se encuentra en una infección mixta con otros raspberry virus (Quito *et al.*, 2011).

Tabla 23. Prueba LSMEANS para Número de raíces enfermas en los diferentes tratamientos Fitoplasma, Virus, Fitoplasma-Virus, Ct superiores de 35 (plantas a las que se les detecto ct superiores de 35 que son tomados como amplificaciones no reproducibles). Se utilizó un P<0.1, los valores en rojo indican diferencias entre tratamiento.

	Vitroplanta	Fitoplasma	Virus-Fitoplasma	Virus	Ct superiores de 35
Vitroplanta		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Fitoplasma	<.0001		0.0673	0.8277	0.9352
Virus-Fitoplasma	<.0001	0.0673		0.1311	0.0566
Virus	<.0001	0.8277	0.1311		0.7671
Ct superiores de 35	<.0001	0.9352	0.0566	0.7671	

En la figura 37 se observa un menor número de raíces afectadas en el tratamiento de Fitoplasma-Virus en comparación con los demás tratamientos, la Tabla 23 muestra que la diferencia entre el tratamiento Fitoplasma y Virus – Fitoplasma muestra diferencias significativas en cuanto al número de raíces enfermas respaldando aun más el fenómeno de hipovirulencia nombrado anteriormente, evidenciándose este fenómeno no solo en el peso de las raíces sino también en el número de raíces enfermas.

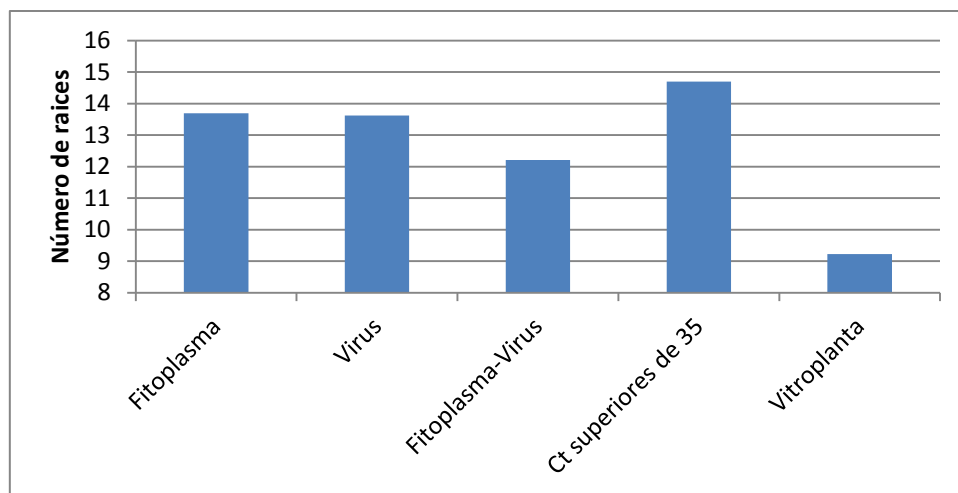


Figura 38. El número de raíces totales incluye tanto raíces enfermas como sanas para cada uno de los tratamientos. La vitroplanta es el control negativo.

En la evaluación de raíces totales se encontró que las plantas con los diferentes tratamientos (Fitoplasma, Virus-Fitoplasma, Virus, Ct superiores de 35) presentan un mayor número de raíces Figura 38 en comparación con los controles negativos de plantas invitro (variedad secundina). Todos los tratamientos presentan diferencias significativas con el control negativo de vitroplanta (Tabla 25) y el tratamiento de Virus-Fitoplasma presenta diferencias con el tratamiento de Ct superiores de 35.

Las diferencias estadísticamente significativas de la planta control (vitroplanta variedad secundina) tiene dos posibles explicaciones: La primera consiste en que por características propias la variedad secundina tenga un menor número de raíces en comparación con los genotipos evaluados (Comunicación personal Ingeniero Fernando Calle); La segunda explicación a este fenómeno es que la presencia del fitoplasma induzca un hiperbrotamiento de raíces como sucede en muchas otras enfermedades

conocidas como escoba de bruja o Witche's broom síntoma característico de las enfermedades causadas por fitoplasmas (Agrios, 2005).

Tabla 25. Prueba LSMEANS para Número de raíces Totales en los diferentes tratamientos Fitoplasma, Virus, Fitoplasma-Virus, Ct superiores de 35 (plantas a las que se les detectò ct superiores de 35 que son tomados como amplificaciones no reproducibles). Se utilizó un $P < 0.1$, los valores en rojo indican diferencias entre tratamientos.

	Vitroplanta	Fitoplasma	Virus-Fitoplasma	Virus	Ct superiores de 35
Vitroplanta		0.0019	0.0384	0.0020	0.0002
Fitoplasma	0.0019		0.2496	0.8716	0.4268
Virus-Fitoplasma	0.0384	0.2496		0.2152	0.0551
Virus	0.0020	0.8716	0.2152		0.5563
Ct superiores de 35	0.0002	0.4268	0.0551	0.5563	

La Figura 39 muestra el porcentaje de raíces afectadas observando un mayor porcentaje en los tratamientos con presencia de Fitoplasma 92.4% y Virus 88.8% a causa del posible fenómeno de hipovirulencia descrito anteriormente. Sin embargo el porcentaje de raíces afectadas con el virus únicamente, es muy similar al los resultados de plantas con Ct superiores de 35, entonces se podría suponer que posiblemente el fenómeno de hipovirulencia este relacionado con la concentración de cada uno de los microorganismos en la planta porque como se menciona anteriormente en cada tratamiento solo se asignaron aquellas planta que tenían detecciones menores de Ct de 35 y se escogieron las plantas que tenían los menos valores de Ct.

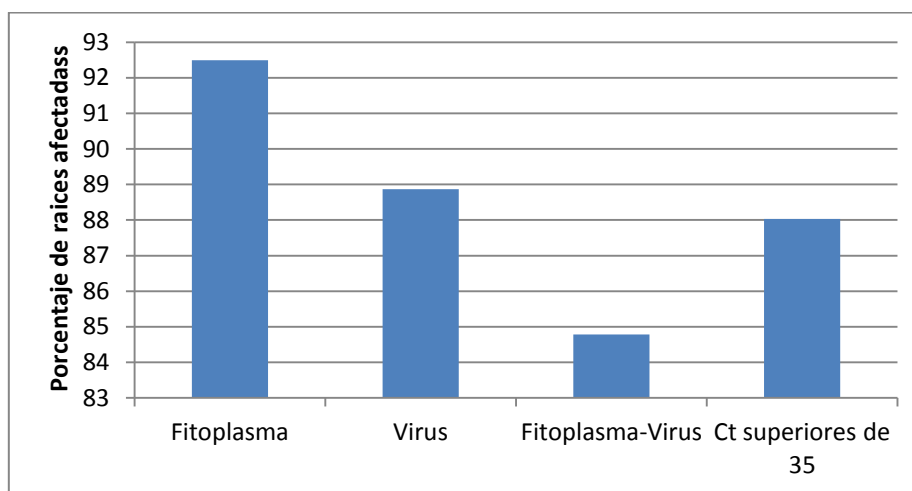


Figura 36 Porcentaje de raíces afectadas en los diferentes tratamientos, Se determinò teniendo en cuenta el número de raíces afectadas y sanas.

La técnica de detección no tiene un porcentaje de detección de 100 % para ninguno de los dos microorganismos, sin embargo los resultados sugieren que a mayor concentración de fitoplasma la severidad de la enfermedad es mayor. La presencia del tratamiento de los Ct mayores de 35 para al menos uno de los dos patógenos se escogió para correlacionar las falencias de la técnica de diagnóstico desarrollada con datos de

severidad de raíces en campo, permitiendo conocer que se necesita incrementar los porcentajes de detección para de esta forma no tener escapes.

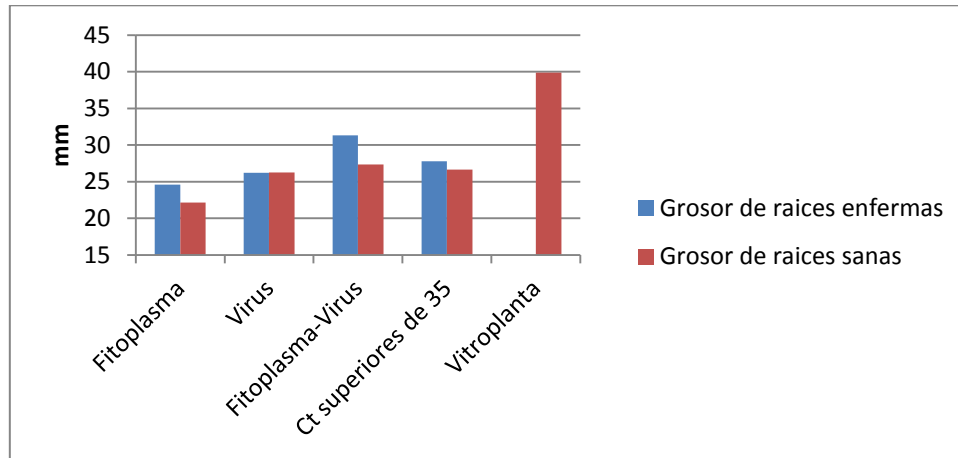


Figura 40. Comparación entre el grosor de raíces enfermas y sanas para cada uno de los tratamientos.

Para la variable de grosor de raíces enfermas y sanas (Figura 40) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos. Esta es una variable que no permite ver diferencias entre los tratamientos por lo que en futuros ensayos de cuero de sapo similares se puede prescindir de la evaluación de esta variable.

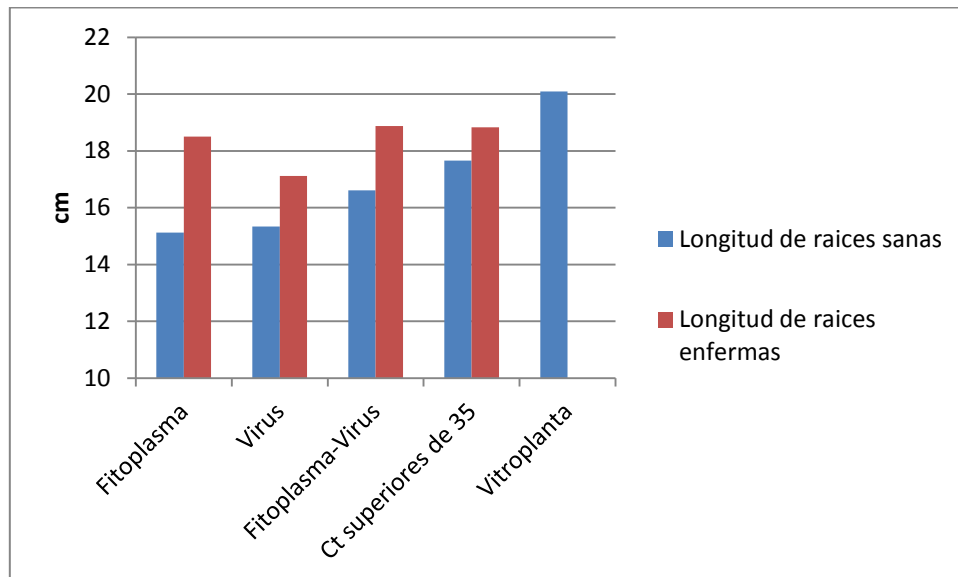


Figura 41. Comparación entre longitudes de raíces sanas y enfermas para cada uno de los tratamientos.

Lo mismo sucede con la variable de longitud de raíces sanas y enfermas (Figura 41) en donde no se observaron diferencias entre los tratamientos. De esta variable es de resaltar

que en todos los tratamientos la longitud de las raíces enfermas es mayor en comparación con las raíces sanas.

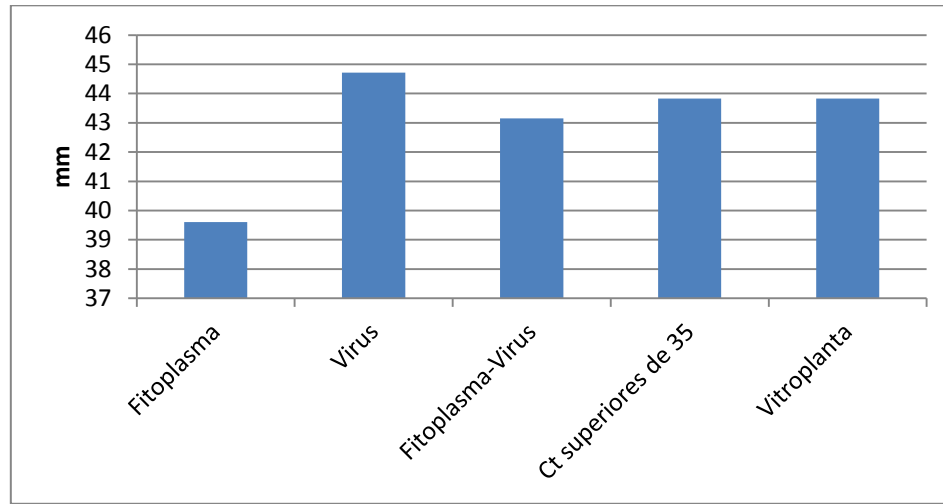


Figura 42. Medición de grosor de tocón o cuello de la raíz para cada uno de los tratamientos.

Durante muchos años se tuvo la idea que los tallos de las plantas con cuero de sapo lucían más gruesos especialmente en la base de la planta, posiblemente por la falta de acumulación de almidón en las raíces (Calvert & Cuervo, 2002) por eso en la presente investigación se quiso demostrar la validez de dicha hipótesis.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grosor del tocón en ninguno de los tratamientos lo cual demuestra que por lo menos para los genotipos evaluados esta hipótesis no se cumple debido a que al menos debieron presentar diferencias con el control negativo.

Tabla 24. Prueba LSMEANS para porcentaje de severidad (plantas a las que se les detectó ct superiores de 35 que son tomados como amplificaciones no reproducibles). Se utilizó un $P < 0.1$, los valores en rojo indican diferencias entre tratamiento.

	Vitroplanta	Fitoplasma	Virus-Fitoplasma	Virus	Ct superiores de 35
Vitroplanta		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Fitoplasma	<.0001		0.0491	0.1361	0.1314
Virus-Fitoplasma	<.0001	0.0491		0.6954	0.6188
Virus	<.0001	0.1361	0.6954		0.9378
Ct superiores de 35	<.0001	0.1314	0.6188	0.9378	

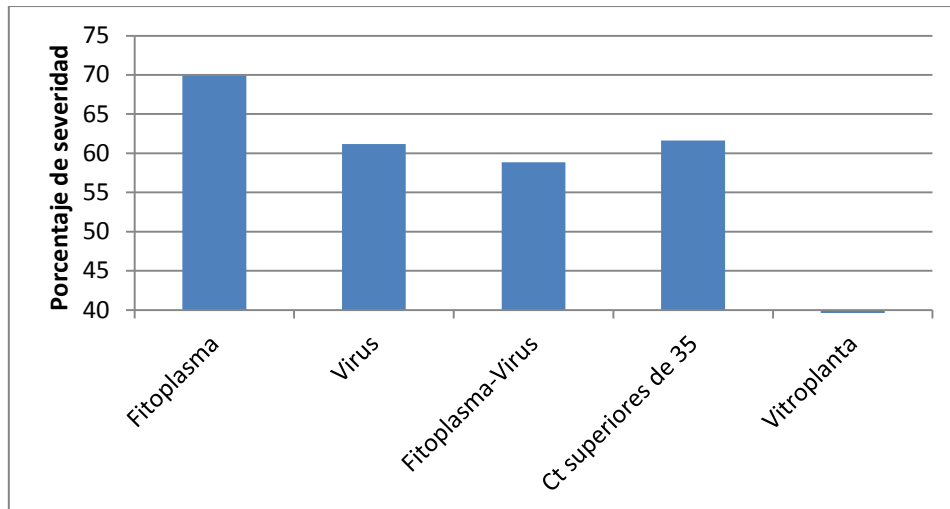


Figura 43. Porcentaje de severidad para cada uno de los tratamientos. Este porcentaje se determinó convirtiendo datos de las evaluaciones de 1-5 de raíz por raíz a porcentaje.

La severidad de la enfermedad fue evaluada realizando un cambio a la escala utilizada tradicionalmente en donde se califica el conjunto de raíces y se asigna un valor de 1-5 dependiendo que tan afectadas estén las raíces y cuantas estén afectadas. Para el presente ensayo se necesitaba una precisión mucho mayor por lo cual se evaluó cada raíz de 1-5 dependiendo de la severidad de los síntomas por cada planta se determinó un promedio de severidad. Sin embargo fue necesario hacer una conversión a porcentaje de severidad para poder analizar los datos y ver si había diferencias entre los tratamientos. La conversión se hizo de la siguiente manera: Al grado 1=0.5, 2=13, 3= 45, 4=78, 5=93.

Se encontraron diferencias significativas en la prueba LSMEANS entre el tratamiento de fitoplasma y fitoplasma-virus (tabla 24), lo cual demuestra una mayor severidad cuando se presenta la detección del fitoplasma únicamente ratificando nuevamente la variable de porcentaje de severidad el posible fenómeno de hipovirulencia. En la figura 43 se observa que la menor severidad en los tratamientos infectados con alguno de los dos agentes asociados se encontró en el tratamiento de Fitoplasma-Virus.

Tabla 25. Prueba de correlación de Pearson. Las variables analizadas son Peso de raíces en el aire (Pra), número de raíces totales (nrt), número de raíces afectadas (nra), número de raíces sanas (nrs), porcentaje de raíces afectadas (pora), grosor de raíces enfermas (gre), grosor de raíces sanas (grs), longitud de raíces (lrs), longitud de raíces enfermas (lre), Escala de severidad Universidad de Córdoba (sucor), Porcentaje de severidad (psev).

	pra	nrt	nra	nrs	pora	gre
nra	-0.11646 0.2152 115	0.83225 <.0001 115	1.00000 115	-0.63676 <.0001 115	0.74009 <.0001 115	-0.29630 0.0028 100
nrs	0.38874 <.0001 115	-0.10246 0.2759 115	-0.63676 <.0001 115	1.00000 115	-0.92313 <.0001 115	0.16193 0.1075 100
pora	-0.39180 <.0001 115	0.29103 0.0016 115	0.74009 <.0001 115	-0.92313 <.0001 115	1.00000 115	-0.22425 0.0249 100
gre	0.65642 <.0001 100	-0.23402 0.0191 100	-0.29630 0.0028 100	0.16193 0.1075 100	-0.22425 0.0249 100	1.00000 100
grs	0.53885 <.0001 68	-0.24703 0.0423 68	-0.25428 0.0364 68	0.12426 0.3127 68	-0.25425 0.0364 68	0.49252 0.0002 53
grt	0.35264 0.0001 113	0.32875 0.0004 113	0.32239 0.0005 113	-0.12542 0.1856 113	0.17887 0.0580 113	0.16063 0.1141 98
lrs	0.25047 0.0409 67	-0.08438 0.4972 67	-0.20752 0.0920 67	0.24184 0.0487 67	-0.28181 0.0209 67	-0.09265 0.5136 52
lre	0.20644 0.0425 97	0.01347 0.8958 97	0.17972 0.0782 97	-0.33701 0.0007 97	0.30609 0.0023 97	0.04803 0.6404 97
secor	-0.41039 <.0001 115	0.31300 0.0007 115	0.70672 <.0001 115	-0.83270 <.0001 115	0.95106 <.0001 115	-0.30958 0.0017 100
psev	-0.36620 <.0001 115	0.32495 0.0004 115	0.72663 <.0001 115	-0.85183 <.0001 115	0.89918 <.0001 115	-0.35881 0.0002 100

La prueba de correlación de Pearson (tabla 25) se hizo para descartar la evaluación en ensayos futuros de ciertas variables que puedan estar correlacionadas, además las correlaciones van a permitir analizar asociaciones de variables que pueden explicar mejor el posible rol de cada uno de los dos microorganismos con los síntomas de la enfermedad en raíces.

El porcentaje de severidad se encuentra correlacionado con el porcentaje de raíces afectadas de manera significativa en un 89% (Tabla 25) y con el número de raíces afectadas en un 72%, a su vez esta última esta correlacionada de manera significativa en un 83% con el número de raíces totales; esta correlación tal vez tenga explicación en las dos posibles causas descritas anteriormente: Condición varietal de las variedades evaluadas hacia un número alta de raíces o que se trate de hiperbrotamientos de raíces síntoma muy característico de enfermedades asociadas con fitoplasmas.

El peso de raíces en el aire esta correlacionado de manera significativa con el grosor de raíces enfermas en un 65 %, lo cual explica el efecto que tiene la enfermedad sobre el rendimiento causando una disminución en el grosor de las raíces y por lo tanto un menor peso de las raíces, esta característica es típica de raíces con severidades superiores del 78% en donde el llenado de las raíces es deficiente.

Se encontraron correlaciones negativas entre el número de raíces sanas con el porcentaje de severidad. Demostrando que la severidad va a depender del número de que raíces afectadas.

Teniendo en cuenta la prueba de correlación de Pearson se hizò una regresión lineal con las variables que mostraban una mejor correlación: Porcentaje de severidad (psev) con Número de raíces afectadas (nra), porcentaje de severidad (psev) con porcentaje de raíces afectadas (pora), psev con número de raíces (nrs), psev con número de raíces sanas (nrs), número de raíces totales (nrt) con nra, para con grosor de raíces enfermas (gre).

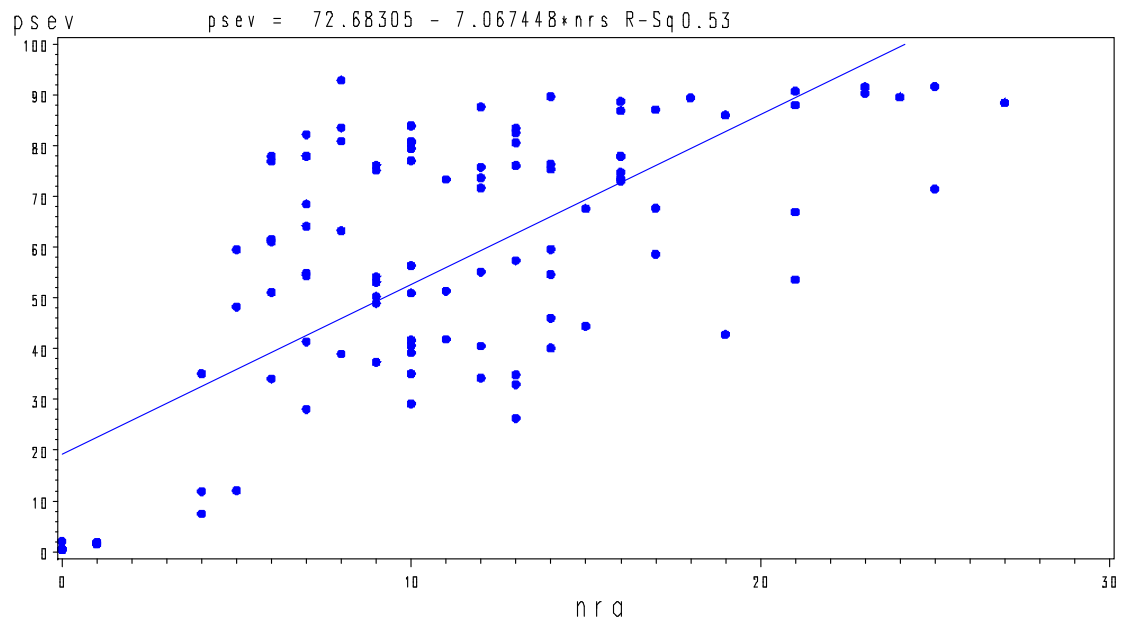


Figura 44. Correlación entre el porcentaje de severidad (psev) y el número de raíces afectadas (nra).

La variable nra explica la variabilidad del porcentaje de severidad (psev) en un 53 % (Figura 44), sin embargo cuando se remplaza nra por porcentaje de raíces afectadas (pora), ésta ultima explica la variabilidad de la severidad en un 81% (Figura 45).

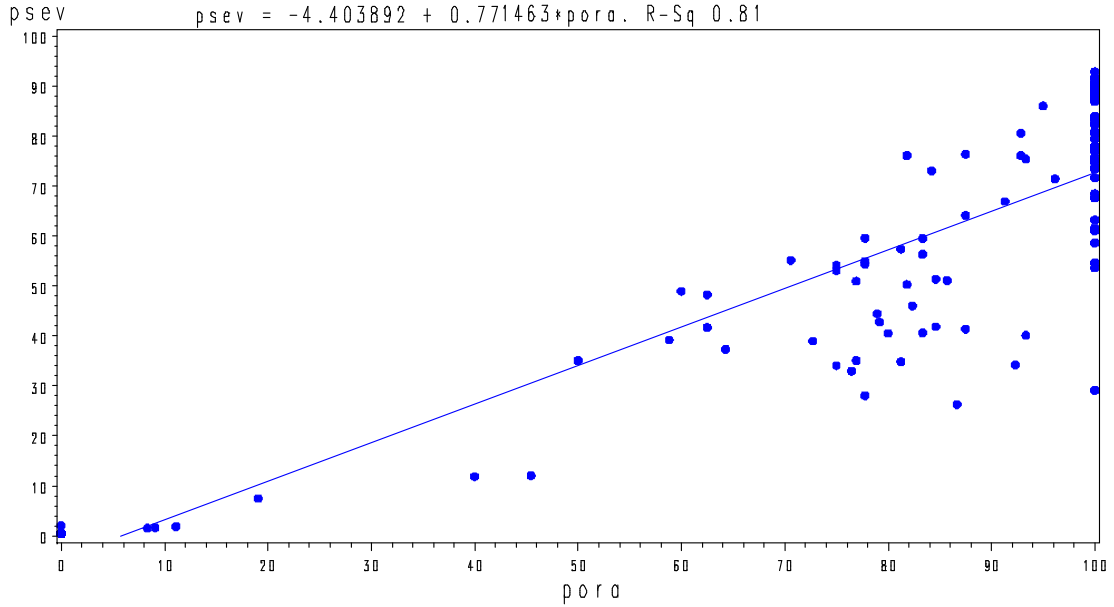


Figura 45. Correlación entre el porcentaje de severidad (psev) y porcentaje de raíces afectadas (pora).

Así como el porcentaje de severidad está correlacionado de manera positiva con las variables porcentaje de raíces afectadas (pora) y número de raíces afectadas (nra), lo está de manera negativa con el número de raíces sanas (nrs) explicando la variabilidad en porcentaje de severidad (psev) en un 73%.

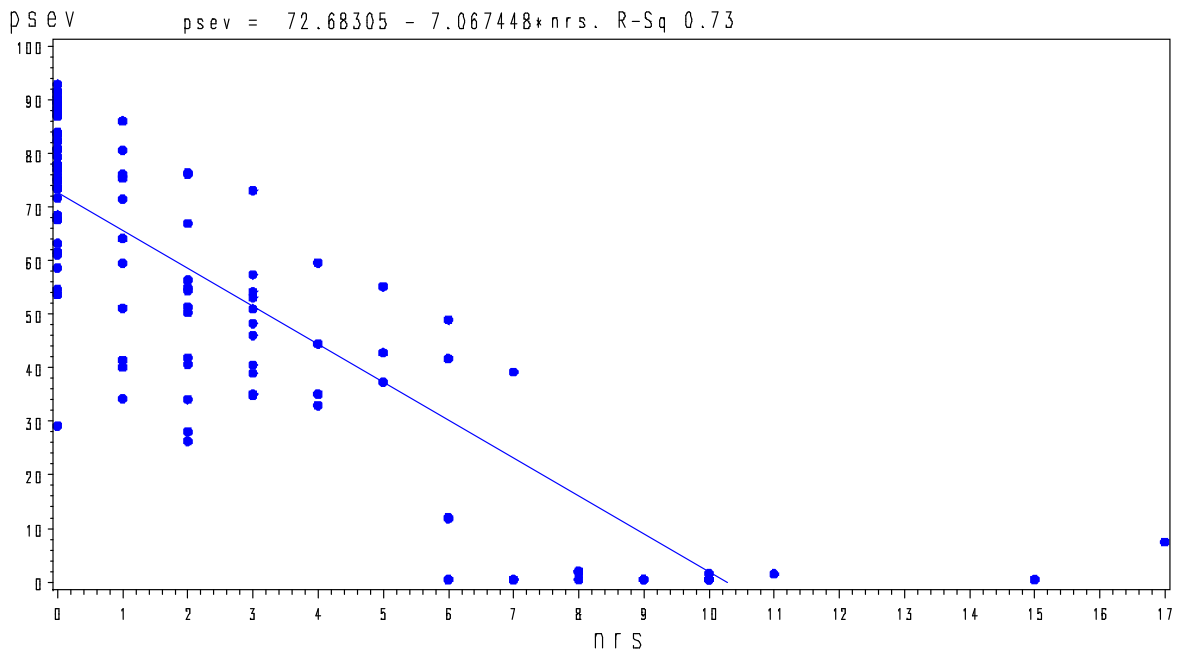


Figura 46. Correlación entre porcentaje de severidad (psev) y número de raíces sanas (nrs).

Teniendo en cuenta las variables que explican la variabilidad en el porcentaje de severidad (psev) se concluye que la severidad está muy influenciada por el número de raíces afectadas en la planta. Se podría pensar que el peso de las raíces debería tener una alta correlación negativa con la severidad sin embargo no es así debido a que la raíz puede tener un buen llenado y sobre toda la superficie de la raíz presentar las redes o panales de labios característicos de la enfermedad.

Anteriormente se discutiò sobre la asociación entre el número de raíces totales y la presencia de los síntomas característicos de la enfermedad asociando este fenómeno a efectos varietales o síntomas típicos de enfermedades causadas por fitoplasma como hiperbrotamientos. El número de raíces afectadas respalda este argumento debido a que explica la variabilidad del número de raíces totales en un 69%, por lo cual podemos afirmar que se trata de un hiperbrotamiento. En suramèrica se han reportado varios fitoplasmas del grupo 16SrIII causando hiperbrotamiento en varios cultivos como yuca (*Manihot esculenta* witches'-broom phytoplasma) (Barros et al.,1998), Chayote (guatilla) (Chayote witches'-broom phytoplasma) (Montano et al., 2000) y café (Coffee crispiness phytoplasma) (Galvis et al., 2007).

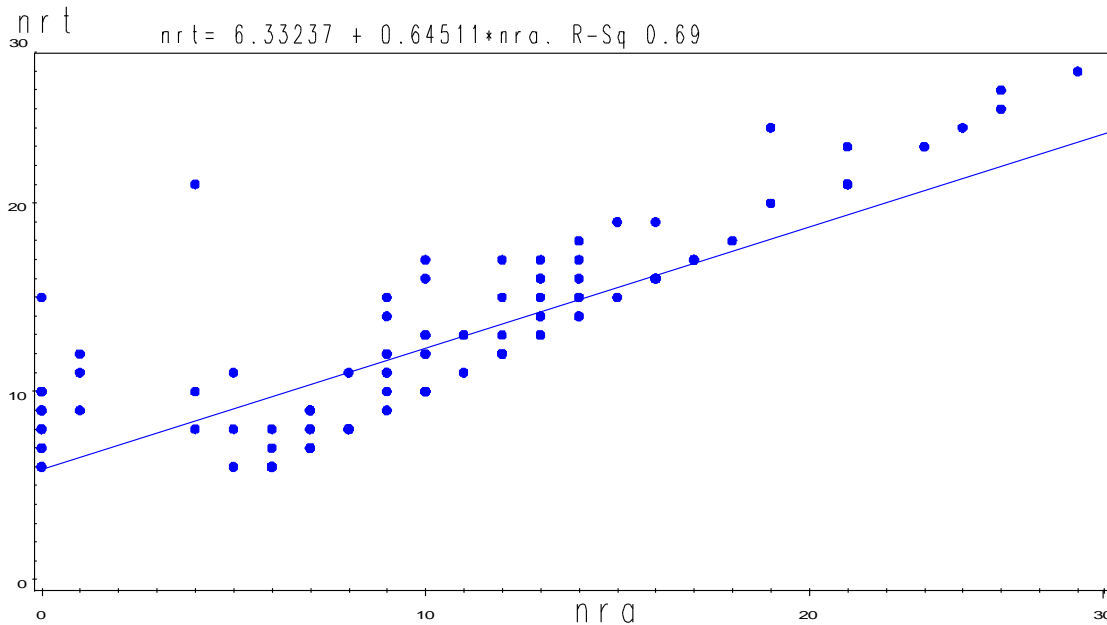


Figura 47. Correlación entre número de raíces (nrt) y número de raíces afectadas (nra).

En la prueba de correlación entre peso de raíces afectadas (pra) y grosor de raíces enfermas (gre), se determinó que esta última explica la variabilidad de pra en un 43 % (Figura 48), es decir que el grosor de las raíces en una planta de yuca está directamente correlacionada con un mayor rendimiento. Cuando la severidad de la enfermedad del cuero de sapo es muy alta el grosor de las raíces disminuye, afectándose el almacenamiento de almidón y el rendimiento (Álvarez et al., 2009).

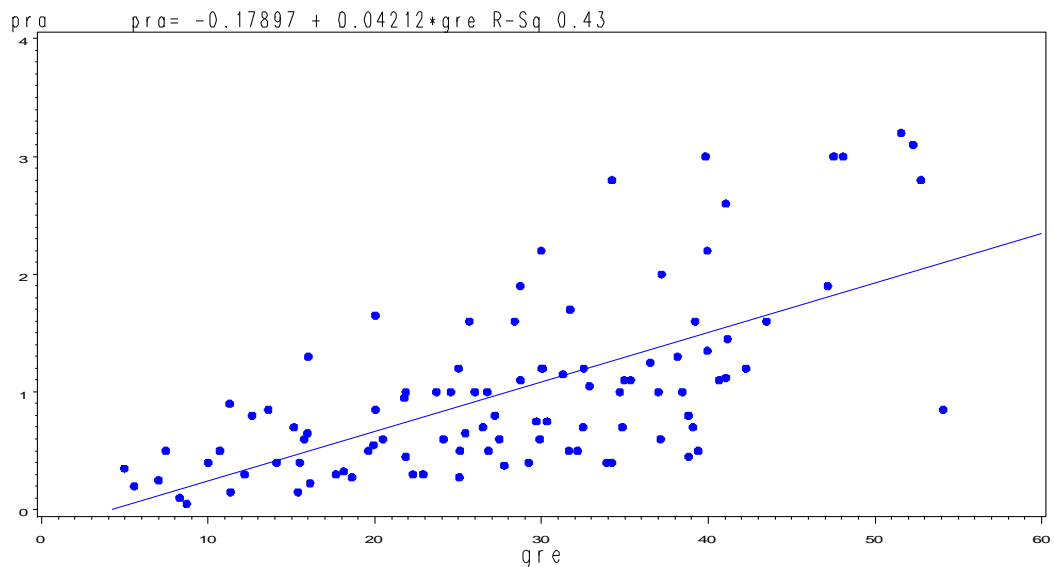


Figura 48. Correlación entre peso de raíces (pra) y grosor de raíces afectadas (gra).

Finalmente se hizo una prueba de componentes principales (Anexo E) incluyendo las variables peso de raíces en el aire, número de raíces totales, número de raíces sanas, porcentaje de raíces afectadas, grosor de raíces enfermas, grosor de raíces sanas, longitud de raíces sanas y longitud de raíces enfermas. El componente principal 1 conformado por las variables porcentaje de raíces afectadas y peso de raíces en el aire, explica la variabilidad del ensayo en un 89%. En la gráfica que genera la prueba de componentes principales (Gráfica 49) se observa en el componente 1 que las plantas con detección positiva de fitoplasma se encuentran alejadas de las plantas con detección positiva de fitoplasma-virus, mostrando de esta forma la influencia de las dos variables descritas en el posible fenómeno de hipovirulencia.

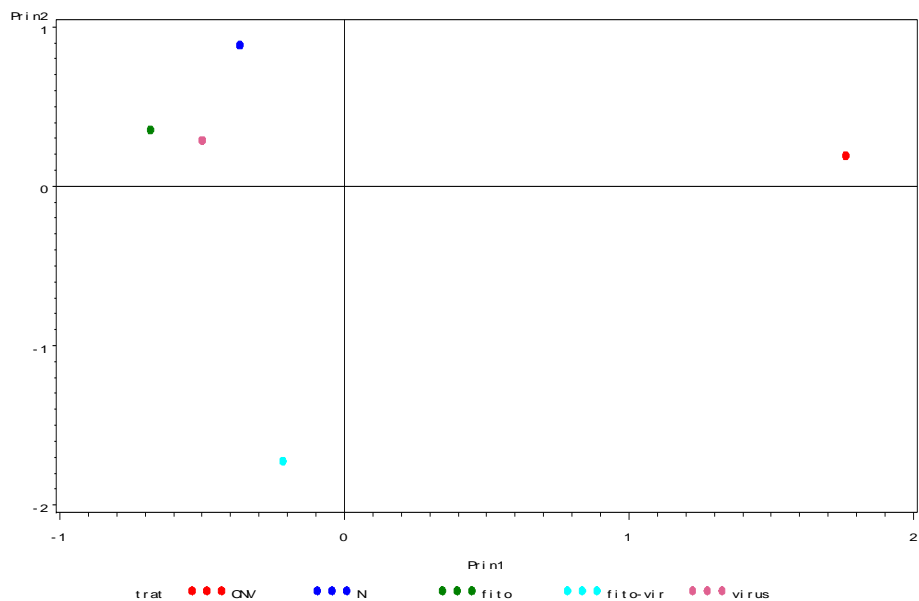


Figura 49. Diagrama de componentes principales de variables no correlacionadas medidas en campo.

8. Conclusiones

1. La técnica de PCR en tiempo real desarrollada es 1000 veces más sensible para la detección del fitoplasma y 100 veces para el reovirus, en comparación con la PCR anidada y RT-PCR utilizados actualmente.
2. La sonda diseñada para la detección del fitoplasma es específica para el grupo 16SrIII pero no para el subgrupo L.
3. En la validación de la técnica de qPCR el porcentaje de detección para el fitoplasma fue de 92.5% y el de virus es de 76.47% partiendo de un mismo número de muestras.
4. La detección del fitoplasma tiene una excelente correlación con la presencia de síntomas en raíces enfermas y con la técnica del injerto, que significa que la técnica de qPCR podría llegar a sustituir al método del injerto en secundina.
5. Las eficiencia de las dos sondas (fitoplasma y virus) diseñadas fue mayor del 97%. En los dos casos se lograron R^2 de 0.99.
6. En raíces obtenidas de 11 genotipos de yuca con síntomas de Cuero de Sapo, se detectó promedio de 2.32×10^5 copias del fitoplasma 16SrIII y de 3.8×10^4 copias de reovirus.
7. Según los genotipos BIPD 289-25 y 249-45. El mejor tejido para la detección de virus y fitoplasma en semilla asexual de yuca es el floema secundario encontrándose porcentajes de detección en este tejido entre 83% y 100%. El cogollo no es un buen tejido para la detección del fitoplasma encontrándose porcentajes de detección entre 40-60%.
8. El fitoplasma 16SrIII-L y el reovirus se distribuyen irregularmente en los diferentes tercios de la planta. Sin embargo el fitoplasma se detectó en mayor porcentaje en los tercios inferior y superior entre 70-75%. El porcentaje de detección del virus fue de 38-42% en los tres tercios evaluados.
9. En las variedades BIPD 284-35, BIPD 249-45 y BIPD 284-43 no se observó diferencias significativas entre la concentración del virus y fitoplasma; a diferencia de las variedades BIPD 289-42, Secundina, y BIPD 284B-66 en donde las concentraciones de los dos microorganismos son significativamente diferentes.
10. La probabilidad de encontrar el fitoplasma 16SrIII-L en semilla asexual proveniente de plantas con síntomas de la enfermedad en raíces comerciales es de 64.29% a diferencia del virus que se encuentra en un 35.81%.
11. La correlación de síntomas con la presencia de cada uno de los dos microorganismos, sugiere un fenómeno de hipovirulencia debido a que en las plantas con detección de Fitoplasma-virus se encontró un menor porcentaje de severidad, raíces enfermas y mayor rendimiento en comparación con las plantas donde solo se detectó el fitoplasma.

9. Recomendaciones

- Se recomienda la utilización de la técnica de qPCR desarrollada como una herramienta para ser utilizada en la certificación de plantas *in vitro* o fragmentos pequeños de semilla asexual como yemas destinadas a la certificación de semilla asexual de yuca. El tipo de tejido utilizado y su tamaño, permitieron garantizar una mejor detección de los patógenos, debido a la distribución irregular de éstos en la planta.
- La sensibilidad de la sonda diseñada para el fitoplasma se podría mejorar con el diseño de nuevas sondas a partir de otros genes diferentes a *rp* que se encuentren repetidos varias veces dentro del genoma del fitoplasma, genes utilizados en filogenia y caracterización como 16S rRNA, 23S rRNA, *secY* y *tuf*.
- Es necesario hacer un estudio sobre variabilidad del fitoplasma y el reovirus en las diferentes regiones de Colombia y Latinoamérica para evitar escapes en la detección en la certificación de semilla.
- Es posible reemplazar la cuantificación relativa utilizando estándares externos por una cuantificación absoluta utilizando un gen normalizador.
- El reciente estudio sobre el medio axénico para cultivar fitoplasmas permitirá confirmar el papel del fitoplasma 16SrIII-L en el desarrollo de la enfermedad.
- Mediante la técnica de secuenciación profunda se puede confirmar la presencia del fitoplasma asociado con la enfermedad.

10. Bibliografía

Abdel, B., Jahangir, M., van den Hondel, C., Kim, K., Choi, Y.H., and Verpoorte, R. 2009. Fungal infection-induced metabolites in *Brassica rapa*. *Plant Science*, 176: 608-615.

Adlhoch, C., Kaiser, H., Hoehne, M., Marques, A., Stefas, I., Veas, F., and Ellerbrok, H. 2011. Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real time PCR. *V. Journal* 8:63.

Agindotan, B. O., Shiel, P. J., and Berger. P. H. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *J. Virol Methods* 142: 1-9.

Agrios., G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5 ed. Academic press. San Diego. 948p.

Aldaghi, M., Massart, S., Roussel., and Jijakli, M.H. 2007. Development of a new probe for specific and sensitive detection of 'Candidatus *Phytoplasma mali*' in inoculated apple trees. *Annals of Applied Biology*. 151: 251-258.

Álvarez, E., Mejía, J. F., Llano, G. A., Loke, J. B., Calari, A., Duduk, B., and Bertaccini, A. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. *Plant Dis*. 93:1139-1145.

Álvarez, E., Mejía, J.F., Loke, J., and Llano, G. 2006. Detection and characterization of a phytoplasma associated with cassava frog skin disease. *Fitopatología Colombiana*, Vol 24, No 2.

Angelini, E., Bianchi, G., Filippin, L., Morassutti, C., Borgo M., 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* 68: 613-622.

Aniko, V., and Delano, J. 2005. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal. Virol. Methods* 123: 213-220.

Aokia, N., Moriyama, H., Kodamac, M., Arie, T., and Teraokab, T. 2009. Fukuhara, T. A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata* *Virus Research* 140. 179-187.

Balaji, B., Bucholtz, D. B., and Anderson, J. M. 2003. Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. *Phytopathology* 93:1386-1392.

Baric, J., and Dalla, J. 2004. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *J. Microbiol Methods* 57: 135- 145.

Baric, S., Kerschbamer, C., and Dalla, J., 2006. TaqMan Real-time PCR versus Four Conventional PCR Assays for Detection of Apple Proliferation Phytoplasma. *P. Mol Biol Rep* 24: 169-184

Barros, T., Kitajima, E. W., and Resende, R. O. 1998. Diversidade de isolados brasileiro de fitoplasmas através da análise do 16S rADN. *Fitopatol. Bras.* 23(4):459-465

Berges, R., Rott, M., and Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90:1145-1152.

Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., and Barker, I. 2002. The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real-time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods* 101: 37-48.

Calvert, L. A., Cuervo, M., Lozano, I., Villareal, N., and Arroyave, J. 2008. Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava Plants Affected by Frogskin Disease. *J. Phytopathology* 156: 647-653.

Calvert, L. and Cuervo, M. 2002. Enfermedades virales de la yuca: Nuevas Perspectivas para un cultivo milenario: La yuca en el tercermilenio. *Sistemas modernos de producción, procesamiento utilización y comercialización*. Editado por B. Ospina y H. Ceballos. P. 1 - 5. CIAT, Cali, 2002.

Calvert, L.A. 1994. The safe movement of cassava germplasm. En *First Meeting of the internacional Network For Cassava Genetic Resource: Report of the First meeting of the internacional Network fo Cassava Genetic Resources*, Organizado por CIAT, IITA e IBPGR en el CIAT, Cali, Colombia

Carlsbecker, A., and Helariutta, Ykä. 2005. Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Current Opinion in Plant Biology*. Volume 8, (5): 512-517

Carrasco, P., Darós, J.A., Romero, P. A., Elena, S.F. 2007. A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of tobacco etch virus in competition experiments. *J Virol Methods* 139: 181-188.

Castillo, J.J., Castillo, A., Pino, L.T. 1996. Notas sobre histología foliar y radical en yuca (*Manihot esculenta* Crantz), En: Montaldo, A. *La yuca frente al hambre mundo tropical*. Universidad Central de Venezuela. Maracay. P 79-91.

Ceballos, H. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: Nuevas Perspectivas para un cultivo milenario: La yuca en el tercermilenio. *Sistemas modernos de producción, procesamiento utilización y comercialización*. Editado por B. Ospina y H. Ceballos. P. 1 - 5. CIAT, Cali, 2002.

- Chicas, M., Caviedes, M., Hammond, R., Madriz, K., Albertazzi, F., Villalobos, H., Ramírez, M. 2007. Partial characterization of Maize rayado fino virus isolates from Ecuador: Phylogenetic analysis supports a Central American origin of the virus. *Virus Research* 126: 268-276
- Christensen, N., Nicolaisen, M., Hansen, M., and Schulz, A., 2004. Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and bioimaging Molecular Plant-Microbe Interactions. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 17: 1175-1184.
- Christensen, N.M., Axelsen, B., Nicolaisen, N., and Schulz, A. 2005 Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* Vol.10 (11): 114-119
- CIAT. 2005. Integrated Pest and Disease Management in Major Agroecosystems. Annual Report. Cassava and Tropical Fruit Pathology. p 45-53
- Crosslin, J. M., Vandemark, G. J., and Munyaneza, J. E. 2006. Development of a real-time, quantitative PCR for detection of the Columbia Basin potato purple top phytoplasma in plants and beet leafhoppers. *Plant Dis.* 90:663-667
- Cuervo, M., 2006. Tesis de maestría: Caracterización molecular de algunos aislamientos del virus del cuero de sapo de la yuca recolectados en diferentes zonas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia.
- Delanoy, M., Salmon, M., Kummert, J., Frison, E., and Lepoivre, P. 2003. Development of realtime PCR for the rapid detection of episomal Banana streak virus (BSV). *Plant Dis.* 87:33-38.
- Drake, J.W., and Holland, J.J., 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (24): 13910 - 13913.
- Duduk, B., and Bertaccini, A . 2011. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough?. *Phytop. Mollicutes.* 1(1): 3-13
- FAOstat. 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Fernández, J., Fernández, P., Rodríguez, B., Sotelo, E., Robles, A., Arias, and Sánchez, J.M., 2009. Rapid and sensitive detection of African horse sickness virus by real-time PCR. *Research in Veterinary Science* 86: 353-358.
- Foissac, X and Wilson, M. R. 2010. Current and posible future distributions of Phytoplasma Diseases and their Vectors. In: *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors.* CABI. London. UK. Pages 309-311.
- Galetto, L., Bosco, D., and Marzachí, C., 2005. Universal and group-specific realtime PCR diagnosis of Flavescence dorée (16SrV), Bois noir (16SrXII) and apple proliferation (16SrX) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Ann. Appl. Biol.* 147 (2), 191-201.

- Galvis, C. A., Leguizamón, J. E., Gaitán, Á. L., Mejía, J. F., Álvarez, E., and Arroyave, J. 2007. Detection and identification of a 16SrIII-related phytoplasma associated with coffee crispiness disease in Colombia. *Plant Dis.* 91:248-252.
- Ginzinger, D. 2002. Gene quantification using Real-Time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *En: Experimental hematology.* 30: 503-512
- Giovanna, M., Piero, C., Gian, P., and Emanuela, N., 2008. Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *J. Virol. Methods* 147, 282-289.
- Gundersen, D. E., and Lee, I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35:114-151.
- Higuchi, R. 1993. Kinetic PCR analysis: Real Time monitoring of ADN amplification reactions. *Biotechnology.* 11: 1026-1030.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., and Ravnika., M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56: 785-796
- Hui, Yin., Hong, Z., Li, S., Shu, Y., Gai, Z., Sheng, W., and Jin, Z., 2010. Detection and quantitation of bluetongue virus serotypes by a TaqMan probe based real-time RT-PCR and differentiation from epizootic hemorrhagic disease virus *Journal of Virological Methods* 168 (2010) 237-241
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group. 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54: 1243-1255.
- Jarausch, W., Peccerella, T., Schwind, N., Jarausch, B., and Krczal, G., 2004. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Hort.* 657, 415-420.
- Kanematsu, S., Arakawa, M., Oikawa, Y., Onoue, M., Osaki, H., Nakamura, H., Ikeda, K., Kuga-Uetake, Y., Nitta, H., Sasaki, A., Suzaki, K., Yoshida, K., and Matsumoto, N. 2004. A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. *Phytopathology* 94:561-568.
- Kartte, S., and Seemüller, E. 1991. Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. *J. Phytopathol.* 131: 149-160. 20. Kartte, S., and Seemüller, E. 1991. Susceptibility of grafted *Malus* taxa and hybrids to apple proliferation disease. *J. Phytopathol.* 131:137-148.
- Karyeija, R. F., Kreuze, J. F., Gibson, R. W., and Valkonen, J. P. T. 2000. Synergistic Interactions of a Potyvirus and a Phloem-Limited Crinivirus in Sweet Potato Plants. *Virology* 269: 26-36.

- Korimbocus J., Coates D., Barker I., and Boonham N. 2001. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *J Virol Methods* 103: 109-120.
- LeBlanc , N., Rasmussen, T.B., Fernández, J., Sailleau, C., Rasmussen, L.D., Uttenthal, Å., Zientara, S., Belák, S., and Hakhverdyan, M., 2010. Development of a real-time RT-PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of all serotypes of bluetongue virus. *Journal of Virological Methods*. Volume 167, Issue 2: 165-171.
- Lee, I. M., Gundersen, D. E., Davis, R., and Bartoszyk, E. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 1153-1169.
- Lett, J., Granier, M., Hippolyte, I., Grandin, M., Royer, M., Blanc, S., Reynaud, B., and Peterschmitt, M., 2002. Spatial and temporal distribution of geminiviruses in leafhoppers of the genus *Cicadulina* monitored by conventional and quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* 93: 65-74
- Lievens, B., and Thomma, B. P. H. J. 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology* 95:1374-1380
- Lim, P. O. & Sears, B. B. 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J Bacteriol* 174: 2606-11.
- Lin, S.S., Henriques, R., Wu, H.W., Niu, Q., Yeh, S.D., and Chua, N.H. 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnol Rep*. 1:125-134
- Lopez, R., Asensio, C., Guzman, M.M., and Boonham, N., 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of potato yellow vein virus (PYVV). *J. Virol. Methods* 136: 24-29.
- Marbot, S., Salmon, M., Vendrame, M., Huwaert, A., Kummert, J., Dutrecq, O., and Lepoivre, P. 2003. Development of real-time RT-PCR assay for detection of *Prunus* necrotic ringspot virus in fruit trees. *Plant Dis*. 87:1344-1348.
- Margaria, P., Rosa, C., Marzachi, C., Turina, M., and Palmano, S. 2007. Detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine by reverse-transcription PCR. *Plant Dis*. 91:1496-1501.
- Martini, M., Lee, I., Bottner, K., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Carraro, L., Marcone, C., and Osler, R., 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny: a basis for phytoplasma classification. *Int J Syst Evol Microbiol* 57. 2037-2051.
- Marzachi, C., and Bosco, D., 2005. Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Srl) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol*. 30: 117-127.

- Monique, B., Lauriane, S., and Olivier, L. 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. *J. Virol. Methods* 141: 117-124.
- Montano, H. G., Davis, R. E., Dally, E. L., Pimentel, J. P., and Brioso, P. S. T. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Dis.* 84:429-436.
- Mumford R., Walsh K., Barker I., and Boonham N. 2000. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a Multiplex Real-Time Fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 90:448-453.
- Nicolaisen, M. 2003. Partial molecular characterization of Dahlia mosaic virus and its detection by PCR. *Plant Dis.* 87:945-948.
- Osaki, H., Nomura, K., Matsumoto, N., and Ohtsu, Y. 2004. Characterization of double-stranded RNA elements in the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *Mycol. Res.* 108 (6): 635-640
- Pfaffl, A. 2004. Quantitative strategies in real-time PCR: A-Z of quantitative PCR. *International University Line. La Jolla, USA* p. 1-21.
- Pineda, B., Jahasinghe, V., Lozano, J. C. 1983. La enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista ASIAVA. Palmira.* 4:10-12
- Primer Biosoft International. 2010. Software Beacon Desinger Help. Palo Alto. Ca.
- Prince, J. P., Davis, R. E., Wolf, T. K., Lee, I-M., Mogen, B., Dally, E., Bertaccini, A., Credi, R., and Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83:1130-1137.
- Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U., and Rigling, D. 2006. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology* 96:1337-1344.
- Roberts, C.A., Dietzgen, R.G., Heelan, L.A., and Maclean, D.J., 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *J. Virol. Methods* 88: 1-8.
- Roche Molecular Biochemicals. 2000. Absolute quantification with External Standards. *Technical Notes LC 11.* p 53-59
- Ruiz, R. S., Ambrós, S., Vives, M., Navarro, L., Moreno, P., and Guerri, J. 2009. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 160: 57-62.

- Ruiz, S., Ambrós, S., Vives, M., Navarro, L., Moreno, P., and Guerri, J. 2009. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 160: 57-62
- Saracco, P., Bosco, D., Veratti, F., and Marzachi, C.. 2006. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67 :212-219.
- Shaw, A.E., Monaghan, P., Alpar, H.O., Anthony, S., Darpel, K.E., Batten, C.A., Guercio, A., Alimena, G., Vitale, M., Bankowska, K., Carpenter, S., Jones, H., Ouraa, C.A.L., King, D.P., Elliott, H., Mellor, P.S., and Mertens P., 2007. Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J Virol Methods* .,145(2):115-26.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemuller, E., and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2988-2993.
- Spenlinhauer, R. T., Estock, M. L., McFadd, T., Kovacs, S., Hoyos, G., Perez, V. M., Maples, B. K., Provins, J. W., Roth, R. B., and Koulchin. 2009. Nicking Enzyme Amplification Reaction (NEAR), an Isothermal Nucleic Acid Based Technology for Point-of-Testing of Plant Pathogens. Poster presented in American Phytopathological Society Annual Meeting.
- Susans, R., Pedro, M., Jose, G., and Silvia, A., 2007. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues. *J. Virol. Methods* 145: 96-105.
- Stratagene. 2009. Affinity QPCR cADN Synthesis Kit. Instruction manual. p 3-58.
- Sugden, D., 2005. Quantitative PCR: Medical Biomethods Handbook. Edited by: J. M. Walker and R. Rapley © Humana Press, Inc., Totowa. p 132-140
- Tatineni T., Sagaram U., Gowda S., Robertson C., Dawson W., Iwanami T., and Wang N. 2008. In planta distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Jagoueix, J., Yamamoto, P., Ayres, A., and Bove', J. M. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mo and Cellular Probes* 22: 139-150.

- Thébaud, G., Yvon, M., Alary, R., Sauvion, N., and Labonne, G. 2009. NEfficient transmission of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. *Phytopathology* 99:265-273
- Torres, E., Bertolini, B., Cambra, M., Montón, C., and Martín, M., 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*. 19, 334-340.
- Wang, J., Turina, M., Medina, V., and Falk, B. 2009. Synergistic interaction between the Potyvirus, Turnip mosaic virus and the Crinivirus, Lettuce infectious yellows virus in plants and protoplasts. *Virus Research* 144: 163-170.
- Wege, C., and Siegmund, D. 2007. Synergism of a ADN and an RNA virus: Enhanced tissue infiltration of the begomovirus Abutilon mosaic virus (AbMV) mediated by Cucumber mosaic virus (CMV). *Virology* 357: 10-28
- Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H.Y., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T., and Namba, S., 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology* 94, 244-250.
- Wu, M. D., Zhang, L., Li, G. Q., Jiang, D. H., Hou, M. S., and Huang, H.-C. 2007. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 97:1590-1599.
- Wu, S., Wang, Z., Fan, Y., Zhou, Y., Cheng, Z., and Zhang, W., 2000. Detection of Pathogen of Maize Rough Dwarf Disease (MRDD) in Jiangsu Province with RT-PCR. 8 (4):369-372
- Zhang, L., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., and YI, X. 2009. A novel virus that infecting hypovirulent strain XG36-1 of plant fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology Journal*. 6:96.
- Zhang, X., Wang, X., and Zhou, G., 2008. A one-step real time RT-PCR assay for quantifying rice stripe virus in rice and in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén). *Journal of Virological Methods* 151: 181-187.

Anexo A. Validación de técnica de qPCR en casa de malla con injertos de Secundina en la estación CIAT-Santander de Quilicaho



**Anexo B. Segunda Fase Experimental Sembrada en Centro Experimental
Universidad Nacional Sede Palmira.**



Continuación Anexo B.



Anexo B. A. Vista frontal de vigas en guada para la construcción de la casa de malla. **B.** Vista lateral de estructura en guada **C.** Vista frontal de estructura en guada con camellones. **D.** Casa de malla en guadua terminada forrada con muselina. **E.** Plantas de un mes sembradas en casa de malla. **F.** Plantas de dos meses de sembradas en casa de malla. **G.** Plantas de tres meses de sembradas en la casa de malla. **H.** Plantas de 8 meses de sembradas.

Anexo C: Escala de evaluación Patología de Yuca y Frutas Tropicales- CIAT Palmira

Grado (% severidad)	Categoría de los Síntomas	Síntomas observados
0 (0.1)	Planta sana	Raíces engrosadas y asintomáticas. Cáscara delgada y flexible
1 (10)	Muy leves	Raíces engrosadas, con pocas fisuras o hendiduras en forma de labios y en pocas raíces, cáscara levemente opaca y poco flexible
2 (35)	Leves	Raíces engrosadas, con pocas fisuras o hendiduras en forma de labios y en muchas raíces, cáscara opaca y quebradiza
3 (65)	Moderados	Mayor número de fisuras o hendiduras en forma de labios en cualquier parte de la raíz (zona basal, intermedia, distal), con leve disminución del engrosamiento de las raíces, con cáscara opaca y quebradiza.
4 (90)	Severos	Presencia de red o panal en pocas o muchas raíces, con moderada reducción del engrosamiento de las raíces. Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza
5 (100)	Muy severos	Presencia de red o panal en muchas raíces, con severa reducción del engrosamiento de las raíces y apariencia leñosa o fibrosa. Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza.

Anexo D: Escala de evaluación Universidad de Córdoba para selección genotipos resistentes

Grado	Categoría Síntoma	Intensidad labios	Cáscara	Grosor Raíces
0	Planta Sana (Inmune)	No presenta	Delgada y flexible	100% engrosadas
1	Muy leves (Resistente)	1-5 labios en el 10% de las raíces	Levemente opaca y poco flexible	100% engrosadas
2		1-5 labios entre 11-25% raíces	Levemente opaca y poco flexible	100% engrosadas
3	Leves	1-5 labios entre 26-50% raíces	Cáscara opaca y poco flexible	100% engrosadas
4		1-5 labios más de 51% raíces	Cáscara opaca y poco flexible	100% engrosadas
5	Moderados (Tolerante)	Más de 5 labios en cualquier parte de la raíz hasta en el 25% de las raíces	Cáscara opaca y quebradiza	Leve disminución
6		Más de 5 labios en cualquier parte de la raíz en más del 26% de las raíces	Cáscara opaca y quebradiza	Leve disminución
7	Severos (Susceptible)	Red o panal hasta el 25% de las raíces	Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza	Moderada reducción
8		Red o panal entre 26-50% de las raíces	Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza.	Moderada reducción
9	Muy severos (Alta Susceptibilidad)	Red o panal hasta el 50% de las raíces	Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza.	Hasta un 25% raíces leñosas
10		Red o panal en más del 50% de las raíces	Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza.	Más del 25% de raíces leñosas.

Anexo E: Prueba de Componentes Principales para ensayo de campo sembrado en CEUNP

The PRINCOMP Procedure

Observations	5
Variables	8

Simple Statistics

	pra	nrt	nrs	pora
Mean	1.019898000	12.28660000	3.156420000	70.83340000
StD	0.190597431	2.41084732	3.602257584	39.69193133

Simple Statistics

	gre	grs	lrs	lre
Mean	21.98460000	28.44780000	16.96140000	14.66080000
StD	12.53866256	6.70080012	2.02485562	8.22674946

Eigenvalues of the Correlation Matrix

	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	7.17938722	6.68769837	0.8974	0.8974
2	0.49168885	0.19551414	0.0615	0.9589
3	0.29617471	0.26342548	0.0370	0.9959
4	0.03274923	0.03274923	0.0041	1.0000
5	0.00000000	0.00000000	0.0000	1.0000
6	0.00000000	0.00000000	0.0000	1.0000
7	0.00000000	0.00000000	0.0000	1.0000
8	0.00000000	0.00000000	0.0000	1.0000

Eigenvectors

	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4	Prin5	Prin6	Prin7
pra	0.367458	-.099126	0.294840	0.027613	-.120354	0.111871	0.860497
nrt	-.288654	0.888013	0.206958	0.206116	0.051614	-.103095	0.168655
nrs	0.372450	0.074973	-.065746	0.033707	0.922064	0.000000	0.000000
pora	-.371172	-.085946	0.153048	0.101457	0.164120	0.891175	0.000000
gre	-.348095	-.370579	0.443907	0.357694	0.189314	-.332541	0.012091
grs	0.367981	-.019311	0.156686	0.788903	-.164736	0.065017	-.269859
lrs	0.340544	0.125786	0.720815	-.418606	-.081086	0.092765	-.387880
lre	-.364164	-.187285	0.318299	-.140641	0.190162	-.243409	0.087628

Anexo F: Resultados de la evaluación de seis genotipos de yuca por la presencia de los agentes asociados al cuero de sapo y distribución en planta expresando como valores de ct número de copias y desviación estándar. De cada detección se calculó el Ct, No de copias y desviación estándar SD de Ct. Este ensayo corresponde a las evaluación de distribución de las plantas que posteriormente se van utilizar para el ensayo de correlación de síntomas con detecciones.

No de planta	Genotipo BIPD	Repetición	Tercio	Fitoplasma 16SrIII-L			Reovirus (CFSV)		
				Ct	Ct SD	No de copias	Ct	Ct SD	No de copias
1	284-35 T2 P3	1	2	34.18	0.22	3.88E+02	0	0	0
2	284-35 T1 P2	1	1	31.79	0.04	2.13E+03	0	0	0
3	284-35 T1P1	1	1	0	0	0	31.03	0.5	2.18E+03
4	284-35 T2 P2	1	2	0	0	0	0	0	0
5	284-35 T3 P2	1	3	33.5	0.87	6.30E+02	0	0	0
6	284-35 T3 P3	1	3	32.29	0.86	1.49E+03	33.38	0.57	4.10E+02
7	289-42 T3 P2								
8	289-42 T2 P2	1	2	0	0	0	0	0	0
9	289-42 T3 P3	1	3	31.83	0.71	2.07E+03	0	0	0
10	289-42 T2 P3	1	2	30.22	0.67	6.52E+03	0	0	0
11	289-42 T1 P4	1	1	35.14	0.19	1.96E+02	33.14	0.42	4.86E+02
12	289-42 T1 P4	1	1	32.61	0.55	1.19E+03	0	0	0
13	SECUNDINA T3	1	3	31.99	0.11	1.85E+03	0	0	0
14	SECUNDINA T3	1	3	33.4	0.22	6.76E+02	0	0	0
15	SECUNDINA T1	1	1	31.41	0.71	2.79E+03	0	0	0
16	SECUNDINA T1	1	1	32.19	1.26	1.60E+03	0	0	0
17	SECUNDINA T2	1	2	0	0	0	0	0	0
18	SECUNDINA T2	1	2	33.23	0.05	7.63E+02	0	0	0
19	249-45 T3 P2						0	0	0
20	249-45 T1 P1	1	1	32.32	0.5	1.46E+03	34.41	0.9	3.27E+02
21	249-45 T1 P3	1	1	0	0.1	0	0	0	0
22	249-45 T3 P2								
23	249-45 T2 P1	1	2	33.13	0.7	8.20E+02	0	0	0
24	249-45 T2 P1	1	2	31.1	0.46	3.48E+03	0	0	0
25	284-43 T3 P2	1	3	32.76	0.2	1.07E+03	0	0	0
26	284-43 T2 P3								
27	284-43 T1 P1	1	1	32.2	0.01	1.59E+03	0	0	0
28	284-43 T3 P3	1	3	30.03	0.44	7.47E+03	35.29	0.89	1.05E+02
29	284-43 T1 P4						0	0	0
30	284-43 T2P2	1	2	0	0	0	34.53	0.15	1.51E+02
31	289-42 T2 P4	3	2	32.02	0.42	1.81E+03	0	0	0
32	289-42 T1 P1	3	1	0	0.22	0	0	0	0
33	289-42 T2 P2	3	2	32.07	0.15	1.75E+03	0	0	0
34	289-42 T1 P4	3	1	33.97	1.04	4.51E+02	0	0	0
35	289-42 T3 P3	3	3	32.36	0.13	1.42E+03	0	0	0
36	289-42 T3 P2	3	3	35.16	1.45	1.93E+02	0	0	0
37	284-43 T3 P2	2	3	32.28	0.57	1.50E+03	0	0	0
38	284-43 T3 P2	2	3	0	1.76	0	32.91	0.45	5.72E+02
39	284-43 T1 P4	2	1	31.66	1.42	2.41E+03	0	0	0
40	284-43 T2 P1	2	2	35.38	0.61	1.65E+02	0	0	0
41	284-43 T1 P1	2	1	34.17	1.08	3.91E+02	0	0	0
42	284-43 T2 P4	2	2	0	1.9	0	32.12	0.31	1.00E+03
43	SECUNDINA T1	2	1	1110	0.06	0	0	0	0

44	SECUNDINA T2
45	SECUNDINA T2
46	SECUNDINA T1
47	SECUNDINA T2
48	SECUNDINA T3	2	3	0	0.61	0	35.32	0.37	1.03E+02
49	284B-66 T1 P5	1	1	0	1.52	0	35.34	0.96	1.02E+02
50	284B-66 T3 P2	1	3	34.89	1.44	2.34E+02	0	0	0
51	284B-66 T2 P5	1	2	0	0.1	0	0	0	0
52	284B-66 T1 P3	1	1	33.61	1.17	5.82E+02	.	.	.
53	284B-66 T3 P5	1	3	33.93	0.11	4.64E+02	0	0	0
54	284B-66 T2 P5	1	2	34.62	0.93	2.84E+02	33.45	0.31	3.90E+02
55	SECUNDINA T1	3	1	32.18	0.69	1.12E+03	0	0	0
56	SECUNDINA T1	3	1	34.49	0.65	3.11E+02	0	0	0
57	SECUNDINA T2	3	2	0	0.91	0	0	0	0
58	SECUNDINA T2	3	2	0	0.33	0	0	0	0
59	SECUNDINA T3	3	3	0	0	0	34.41	0.51	1.97E+02
60	SECUNDINA T3
61	249-45 T3 P1	2	3	0	0.31	0	0	0	0
62	249-45 T1 P2	2	1	0	0.02	0	.	.	.
63	249-45 T2 P1	2	2	0	0.56	0	34.61	0.66	1.71E+02
64	249-45 T2 P1	2	2	33.18	0.5	7.91E+02	0	0	0
65	249-45 T1 P2	2	1	0	1.03	0	33.85	0.98	2.93E+02
66	249-45 T3 P3	2	3	0	0.82	0	29.46	0.95	6.66E+03
67	284-43 T3 P2	3	3	34.26	0.53	3.66E+02	32.76	0.57	6.37E+02
68	284-43 T2 P3	3	2	34.1	0.43	4.11E+02	0	0	0
69	284-43 T1 P2
70	284-43 T3 P4	3	3	31.88	0.36	2.00E+03	29.73	0.68	5.49E+03
71	284-43 T2 P3	3	2	0	0.64	0	32.16	0.57	9.76E+02
72	284-43 T1 P2	3	1	33.54	0.62	6.12E+02	0	0	0
73	284-35 T1 P2	2	1	33.56	0.81	6.03E+02	0	0	0
74	284-35 T3 P1	2	3	0	0	0	0	0	0
75	284-35 T2 P3	2	2	32.23	0.74	1.56E+03	0	0	0
76	284-35 T2 P2	2	2	0	0	0	34.48	0.33	1.87E+02
77	284-35 T3 P3	2	3	0	0.45	0.00E+00	0	0	0
78	284-35 T1 P1	2	1	0	0	0	0	0	0
79	284B-66 T3 P5	2	3	33.82	0.36	5.01E+02	0	0	0
80	284B-66 T2 P2	2	2	0	0	0	0	0	0
81	284B-66 T1 P2	2	1	0	0	0	32.01	0.81	6.15E+02
82	284B-66 T3 P2	2	3	33.41	0.22	6.72E+02	34.99	0.97	1.30E+02
83	284B-66 T2 P2	2	2	0	0	0	0	0	0
84	284B-66 T1 P2	2	1	0	0.24	0	0	0	0
85	284-35 T2 P2	3	2	0	0.4	0	32.62	0.95	7.04E+02
86	284-35 T3 P3	3	3	0	0	0	26.82	0.43	4.35E+04
87	284-35 T3 P3	3	3	0	0.52	0	30.7	0.53	2.76E+03
88	284-35 T1 P3	3	1	31.27	0.71	3.09E+03	35.75	0.65	7.59E+01
89	284-35 T2 P2	3	2	0	0	0	0	0	0

90	284-35 T3 P2	3	3	0	0	0	0	0	0
91	249-45 T1 P1	3	1	34.09	0.27	4.14E+02	33.79	0.23	3.06E+02
92	249-45 T3 P1	3	3	0	0	0	0	0	0
93	249-45 T2 P3	3	2	0	0	0	33.72	0.55	3.22E+02
94	249-45 T3 P2	3	3	0	0	0	0	0	0
95	249-45 T1 P2	3	1	32.5	0.76	1.28E+03	0	0	0
96	249-45 T2 P3	3	2	0	0	0	0	0	0
97	289-42 T1 P2	3	1	0	0.84	0	31.23	1.15	1.89E+03
98	289-42 T2 P1	3	2	0	0	0	29.29	0.27	7.51E+03
99	289-42 T3 P2	3	3	35.44	0.38	1.58E+02	0	0	0
100	289-42 T3 P1	3	3	0	0.43	0	34.69	0.89	1.61E+02
101	289-42 T2 P4	3	2	33.82	1.62	5.01E+02	0	0	0
102	289-42 T1 P1	3	1	0	0.47	0	0	0	0
103	249-45 T2 P3	4	2	0	0	0	0	0	0
104	249-45 T3 P1	4	3	0	0.66	0	0	0	0
105	249-45 T1 P2	4	1	0	0	0	0	0	0
106	249-45 T1 P3	4	1	33.81	0.5	5.05E+02	0	0	0
107	249-45 T2 P2								
108	249-45 T3 P3	4	3	0	0	0	33.35	0.39	4.19E+02
109	284B-66 T2 P2	3	2	29.05	0.61	1.01E+04	34.69	0.83	1.61E+02
110	284B-66 T3 P2	3	3	25.71	1.03	1.62E+05	0	0	0
111	284B-66 T1 P3	3	1	27.56	0.23	4.34E+04	32.16	0.6	9.76E+02
112	284B-66 T3 P3	3	3	29.05	0.38	1.50E+04	34.17	0.52	2.34E+02
113	284B-66 T1 P3	3	1	29.62	0.96	9.93E+03	0	0	0
114	284B-66 T2 P2	3	2	27.13	0.07	5.90E+04			
115	284-43 T1 P1	4	1	29.33	0.24	1.23E+04	34.1	0.46	2.46E+02
116	284-43 T3 P3	4	3	26.89	0.05	7.00E+04	0	0	0
117	284-43 T2 P3	4	2	30.69	0.87	4.67E+03	0	0	0
118	284-43 T1 P3	4	1	29.12	0.24	1.43E+04	30.94	0.46	2.32E+03
119	284-43 T3 P1	4	3	31.12	0.19	3.43E+03	33.47	0.92	3.84E+02
120	284-43 T2 P4	4	2	0	0.77	0	33.96	0.33	2.71E+02
121	Secuncina T2	4	2	28.24	1.05	2.67E+04	0	0	0
122	Secuncina T2	4	2	33.52	0.66	6.21E+02	32.47	0.99	7.83E+02
123	Secuncina T3	4	3	25.63	0.62	1.72E+05	0	0	0
124	Secuncina T1	4	1	28.08	0.14	3.00E+04	33.85	0.83	2.77E+02
125	Secuncina T3	4	3	27.54	0.53	4.40E+04	0	0	0
126	289-42 T1 P1	4	1	30.95	0.37	3.88E+03	34.78	0.93	1.51E+02
127	289-42 T2 P4	4	2	27.08	0.06	6.11E+04	0	0	0
128	289-42 T3 P1	4	3	28.03	0.05	3.11E+04	30.16	0.15	4.05E+03
129	289-42 T2 P2	4	2	27.36	0.16	5.01E+04			
130	289-42 T1 P4	4	1	26.12	0.42	1.21E+05	0	0	0
131	289-42 T3 P1	4	3	30.45	0.93	5.66E+03	33.74	0.98	3.17E+02
132	284-35 T1 P1	4	1	33.05	1.33	8.68E+02			
133	284-35 T3 P2	4	3	30.84	0.46	4.19E+03	0	0	0
135	284-35 T2 P2	4	2	29.58	0.04	1.03E+04	33.43	0.73	5.37E+02
136	284-35 T1 P2	4	1	34.29	0.59	3.59E+02	0	0	0
137	284-35 T3 P1	4	3	31.14	0.05	3.39E+03	0	0	0

138	284-35 T2 P1	4	2	29.73	0.18	9.25E+03	31.97	0.54	1.12E+03
139	289-42 T3 P4	5	3	30.41	0.37	5.70E+03	0	0	0
140	289-42 T2 P1	5	2	29.11	0.01	1.44E+04	32.77	0.62	6.32E+02
141	289-42 T1 P4	5	1	29.05	0.02	1.50E+04	34.58	0.48	1.75E+02
142	289-42 T3 P1	5	3	30.68	0.38	4.70E+03	0	0	0
143	289-42 T2 P1	5	2	31.44	0.97	2.73E+03	33.88	0.66	2.87E+02
144	289-42 T1 P1	5	1	28.22	0.6	2.71E+04	0	0	0
145	284B-66 T2 P5	4	2	30.43	1.3	5.62E+03	28.38	0.2	1.44E+04
146	284B-66 T3 P5	4	3	32.42	0.64	1.36E+03	0	0	0
147	284B-66 T1 P5								
148	284B-66 T3 P5	4	3	31.45	0.63	2.71E+03			
149	284B-66 T2 P5	4	2	31.8	1.78	2.12E+03	0	0	0
150	284B-66 T1 P2	4	1	34.14	1.73	3.99E+02	0	0	0
151	SECUNDINA T1	5	1	31.52	0.72	2.58E+03	34.96	0.75	1.33E+02
152	SECUNDINA T1	5	1	32.83	0.39	1.02E+03	33.52	0.67	3.71E+02
153	SECUNDINA T3	5	3	30.49	0.82	5.38E+03			
154	SECUNDINA T2	5	2	33.79	0.32	5.12E+02	34.55	0.7	1.78E+02
155	SECUNDINA T2	5	2	34.06	1.53	4.23E+02	35.39	0.78	9.81E+01
156	SECUNDINA T3	5	3	31.41	1.21	2.79E+03	32.66	0.4	6.84E+02
157	249-45 T2 P3	5	2	33.06	0.01	8.62E+02	35.13	0.75	1.11E+02
158	249-45 T1 P2	5	1	34.87	0.85	2.37E+02	32.27	0.83	9.02E+02
159	249-45 T1 P3	5	1	33.7	0.2	5.46E+02	0	0	0
160	249-45 T3 P3	5	3	34.72	0.07	2.64E+02	34.96	0.79	1.33E+05
161	249-45 T2 P2	5	2	0	0	0.00E+00	0	0	0
162	249-45 T3 P3	5	3	33.54	1.35	6.12E+02	0	0	0
163	284-35 T1 P3	5	1	33.01	1.43	8.93E+02	29.54	0.41	6.43E+03
164	284-35 T3 P2	5	3	35.14	0.24	2.16E+02	0	0	0
165	284-35 T2 P3	5	2	0	0.43	0.00E+00	31.16	0.2	1.99E+03
166	284-35 T3 P1	5	3	33.59	0.36	5.91E+02	0	0	0
167	284-35 T2 P3	5	2	30.4	0.81	5.74E+03	32.74	0.85	6.46E+02
168	284-35 T1 P1	5	1	0	0	0	0	0	0
169	284-43 T2 P1	5	2	33.21	0.57	7.74E+02	0	0	0
170	284-43 T1 P1	5	1	33.53	0.79	6.16E+02	32.84	0.98	6.02E+02
171	284-43 T3 P2	5	3	34.26	0.92	3.66E+02	0	0	0
172	284-43 T2 P4	5	2	33.21	1.12	7.74E+02	0	0	0
173	284-43 T3 P3	5	3	35.06	1.44	2.07E+02	0	0	0
174	284-43 T1 P2	5	1	33.77	1.64	5.20E+02	0	0	0
175	284B-66 T3 P3	5	3	33.01	1.14	8.93E+02	32.68	0.24	6.74E+02
176	284B-66 T2 P5	5	2	33.28	0.54	7.37E+02	33.36	0.85	4.16E+02
177	284B-66 T1 P2	5	1	32.45	0.61	1.33E+03	0	0	0
178	284B-66 T2 P5	5	2	31.19	0.51	3.27E+03	0	0	0
179	284B-66 T1 P5	5	1	31.83	0.39	2.07E+03	33.89	0.21	2.85E+02
180	284B-66 T3 P3	5	3	31.86	0.19	2.03E+03	0	0	0