

DETERMINACIÓN DE FITOPLASMAS EN LARVAS DE INSECTOS POR PCR-ANIDADO

1. DESCRIPCIÓN DE LA INNOVACIÓN. Para determinar la presencia de estos agentes patógenos, se sugieren técnicas de biología molecular para detectar, identificar, y clasificar a estos organismos, lo que permitirá establecer estrategias para su manejo.

2. PROBLEMA A RESOLVER. Dada la importancia del cultivo de nopal tunero, como una de las pocas opciones que ofrecen un ingreso económico, año con año, para muchas de las regiones semidesérticas de México, la incidencia de enfermedades tiene gran relevancia. El "engrosamiento del cladodio" es su principal problema fitosanitario en la actualidad. Este, es causado por fitoplasmas, los cuales utilizan a insectos como vectores.

3. RESULTADOS ESPERADOS. El diagnóstico confiable de la presencia de fitoplasmas en insectos, permite implementar estrategias de manejo en el cultivo del nopal, para que estos no infecten a las plantaciones libres y sanas de fitoplasmas.

4. RECOMENDACIÓN PARA SU USO. A pencas de cultivares de nopal con síntomas de engrosamiento, se les busca larvas de insectos; estos se extraen haciendo cortes con un cuchillo desinfectado con cloro, y se guardan en frascos etiquetados con agua para transportarlos al laboratorio. A las larvas se les extrae ADN total. Para llevar a cabo el PCR-anidado, se utilizan cebadores específicos para la detección de fitoplasmas, con el fin de aumentar la especificidad y la sensibilidad del ensayo. Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados son:
P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3')
P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3')
R16mF2 (5'-CATGCAAGTCCAACG GA-3')
R16mR1 (5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3').

Se realizan dos PCR-anidado. En la primera amplificación se utilizan los cebadores universales P1 y P7. Para cada reacción se utilizan 5-10 ng de ADN y 20 µl de una reacción compuesta por 0,250 µM de cada cebador, 3 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA), 250 µM de dNTPs, 2 µl de tampón para Taq 10X (15 mM Cl2Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina) y 3 mM Cl2Mg. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95° C, seguida de 30 ciclos que consistían en una desnaturalización de 30 s a 94° C,

hibridación de 30 s a 55° C y una elongación a 72° C durante 1min 45 s. La extensión final es a 72° C durante 10 min. Para la segunda amplificación, se utilizan dos µl de una dilución 1:50 de la primera amplificación y se realizan paralelamente 3 PCRs, una con los cebadores específicos P1 /P7, otra con los cebadores P1/Tint y la última con los cebadores R16mF2/R16mR1. Los reactivos fueron los mismos que en la primera amplificación, a excepción de la concentración de los iniciadores (0,375 µM) y las condiciones de amplificación para los tres juegos de cebadores:

Una desnaturalización inicial de 94° C durante 5 min, seguida de 35 ciclos que consisten de una desnaturalización a 94° C durante 1 min, hibridación a 60.1° C durante 2 min y una elongación a 72° C durante 3 min. Finalmente se realiza una extensión final a 72° C durante 10 min. El producto de amplificación de la PCR se analiza mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, con un tampón estándar TAE 1 X (EDTA Tris acetato) El ADN es teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

5. ÁMBITO DE APLICACIÓN. Para cualquier ámbito ecológico donde se cultive nopal, la técnica se puede utilizar para especies de insectos cuyo estadio larval sea notorio a simple vista, y que estos estén como hospederos en pencas de nopal.

6. USUARIOS Y MERCADO POTENCIAL. Esta técnica puede ser utilizada en Laboratorios de Fitopatología en Universidades, Centros de investigación y laboratorios de diagnóstico.

7. COSTO ESTIMADO. Se estima que el costo de diagnóstico por muestra es de \$220 pesos

8. IMPACTO POTENCIAL. Al determinar la presencia de fitoplasmas en larvas de insectos, crea la posibilidad de implementar estrategias de manejo para controlar a los vectores de fitoplasmas causantes del "engrosamiento del cladodio"

Mayor información:

Luis Roberto Reveles Torres

Campo Experimental Zacatecas

DETERMINACIÓN DE FITOPLASMAS EN LARVAS DE INSECTOS POR PCR-ANIDAD



Insectos plagas de nopal, vectores de fitoplasmas

