

PCR MÚLTIPLE ANIDADA PARA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS Y RICKETTSIA ASOCIADOS CON LOS SÍNTOMAS DEL COGOLLO ARREPOLLADO (BTS) EN PAPAYO

K. Acosta*, Y. Martínez**, L. Zamora**, A. Fernández*, M.E. Santos-Cervantes***, N.E. Leyva-López***

*Universidad Las Tunas (ULT), Las Tunas, Cuba. Email: karelap@ult.edu.cu;

**Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Mayabeque, Cuba;

***Centro Interdisciplinario de Investigaciones para Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), Unidad Sinaloa, México

RESUMEN: Recientemente, los grupos fitoplasmas 16SrI «*Candidatus Phytoplasma asteris*», 16SrII «*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*» y rickettsia se asociaron a síntomas del cogollo arrepollado (BTS) del papayo en Cuba. El ADN de muestras de plantas de papayo positivas a fitoplasmas y rickettsia se empleó para optimizar y evaluar un ensayo de PCR múltiple anidada. Se usaron los iniciadores de PCR genéricos para fitoplasmas R16mF2/R16mR1 en la primera amplificación y en la segunda amplificación una mezcla PBTF1/PBTR1 (específicos para rickettsia) y R16F2n/BPVNr/p86r (específicos para los grupos de fitoplasmas 16SrI y 16SrII). El ensayo de diagnóstico por PCR múltiple anidado permitió la detección simultánea de fitoplasmas y rickettsia en muestras de plantas de papayo de condiciones de campo.

(Palabras clave: fitoplasma; rickettsia; papaya; PCR múltiple anidada)

NESTED PCR MULTIPLEX FOR THE DETECTION OF THE PHYTOPLASMAS AND RICKETTSIA ASSOCIATED WITH BUNCHY TOP SYMPTOM (BTS) IN PAPAYO

ABSTRACT: Recently, the phytoplasmas groups 16SrI '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' and 16SrII group '*Candidatus Phytoplasma asteris*' and rickettsia were associated with Bunchy Top Symptoms (BTS) of papaya in Cuba. The ADN samples from papaya plants positive to phytoplasma and rickettsia were used for evaluate and optimize nPCR multiplex. Generic primers for amplification of phytoplasma R16mF2/R16mR1 were used in the first reaction. A mixture composed of PBTF1/PBTR1 and R16F2n/BPVNr/p86r for rickettsia and phytoplasma (16SrI and 16SrII groups) amplifications were used in the second reaction. The diagnostic assay by the nPCR multiplex permitted the simultaneous detection of phytoplasmas and rickettsias in samples of papaya plants from the field.

(Key words: phytoplasma; rickettsia; papaya; nested PCR multiplex)

INTRODUCCIÓN

El papayo (*Carica papaya* Lin.) es un cultivo de importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (1). Es afectado por varias enfermedades causadas por fitoplasmas que muestran síntomas de mosaico y amarilleamiento con

arrugamiento asociados a los grupos 16SrI y 16SrII, declinamiento al grupo 16SrXII (2, 3, 4, 5) y rickettsia asociada a PBT (6).

Estos patógenos presentan ADN de doble cadena y hasta el momento no son cultivables *in vitro* (7), de ahí que los métodos moleculares sean los más utilizados para su estudio en plantas hospedantes.

En Cuba, se plantan aproximadamente 4 994 ha del cultivo del papayo por año (8). Sin embargo, su explotación comercial afronta numerosas dificultades debido a la siembra extensiva del cultivar «Maradol Roja» de elevada susceptibilidad a plagas de orígenes virales, procarióticos y fúngicos (8), las cuales inciden en la disminución de las producciones, con un rendimiento promedio de 20,29 t/ha (9).

En Cuba, rickettsia y fitoplasmas del grupo 16SrX se asociaron con síntomas similares a la enfermedad de PBT (10, 11). Asimismo, en la provincia Habana se identificaron los grupos XVII «*Candidatus Phytoplasma caricae*» y 16SrII «*Ca. Phytoplasma aurantifolia*» en plantas de papayo y *Empoasca papayae* Oman (11). Recientemente, *E. papayae* se informó como vector de fitoplasmas del grupo 16SrII (12) y fitoplasmas del grupo 16SrI y se detectaron por primera vez en plantas de papayo (13).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se emplea ampliamente para el diagnóstico y caracterización de estos fitopatógenos. La detección de ambos patógenos asociados a los síntomas de cogollo arrollado (BTS) se informó en previos estudios de forma independiente (10,11). Por ello, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de diagnóstico molecular que permita la detección simultánea de fitoplasmas y rickettsia asociados al complejo BTS en plantas de papayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla 1 se resume los controles de los diferentes patógenos utilizados según su procedencia y

las etapas en que se utilizaron para el establecimiento del sistema de diagnóstico basado en PCR múltiple anidada.

Se emplearon 152 extractos de ADN totales como controles obtenidos a partir de plantas que presentaron infección mixta de fitoplasmas y rickettsia por el método de extracción (11) que se comprobaron previamente por PCR anidada y digestión con endonucleasa de restricción *HaeIII* (nPCR/*HaeIII*) para la detección de fitoplasmas y PCR específico para rickettsia. Además, se utilizaron ADN totales de cinco controles de cultivos puros de cada una de las especies de bacterias, el fitoplasmas ToLL del grupo 16SrIII y virescencia de la vicaria (*Catharantus roseus* (L.) G. Don) donados por el laboratorio de biología molecular del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa en México (Tabla 1).

Optimización de las condiciones de reacción de la PCR múltiple anidada.

Se realizó una primera amplificación con los iniciadores R16mF2/R16mR1 según Arocha (11). En la segunda reacción se utilizó una mezcla de los iniciadores PBTF1/PBTR1 (6), R16F2n (14) y BPVNr/p86r (15) para la detección específica de rickettsia y los grupos 16SrII y 16SrI de fitoplasmas.

La mezcla se preparó a un volumen final de 25 μ L y contenía solución amortiguadora (Invitrogen, Brasil) 1X; $MgCl_2$ 2,0 mM; dNTPs 0,2 mM; iniciadores a 0,5 μ M cada uno; 2U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil); y H_2O desionizada estéril; se tomaron 50ng ADN totales y 1 μ L de la primera reacción para fitoplasma).

TABLA 1. Controles positivos y negativos usados en el establecimiento del sistema diagnóstico por nPCR múltiple/
Positive and negative controls used in the establishment of diagnosis system by nPCR multiplex

Patógenos	Procedencia	Cantidad	Etapas evaluación
Fitoplasmas y rickettsia	Campos papayo	152	Estimación preliminar/ evaluación
<i>Erwinia carotovora</i> , (Smith)	Cultivos puros	5	Especificidad analítica
<i>Pseudomonas lini</i> , (Delorme <i>et al.</i>)	Cultivos puros	5	Especificidad analítica
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Van Hall)	Cultivos puros	5	Especificidad analítica
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Pammel y Dowson)	Cultivos puros	5	Especificidad analítica
<i>Streptomyces scabies</i> , (Thaxter; Lambert y Loria)	Cultivos puros	5	Especificidad analítica
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner)	Cultivos puros	5	Especificidad analítica
ToLL Grupo 16SrIII	Campo	5	Especificidad analítica
Virescencia <i>Catharantus roseus</i> (L.) G. Don) 16SrXIII	Campo	5	Especificidad analítica
Plantas sanas papayo	Casa aislamiento.	80	Evaluación ensayo

Se probaron diferentes combinaciones de concentraciones de iniciadores en la segunda amplificación 0,3 y 0,4 μM que se amplificaron en un termociclador programable (Biometra® T Personal, Biometra Ltd., Staffordshire, Inglaterra, Reino Unido) con una desnaturalización inicial 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto; temperaturas de anillamiento de 50, 52, 55 y 57°C por 1 minuto; alineamiento a 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 5 minutos.

Se determinaron los parámetros analíticos de la técnica según Massart (16):

Estimación preliminar repetitividad: Se evaluó la repetitividad en cuatro repeticiones con el uso de los parámetros y condiciones optimizadas y dos réplicas de cinco controles positivos para fitoplasma y rickettsia.

Determinación de la Especificidad Analítica: Se evaluó la especificidad analítica frente a otras especies de bacterias y otros grupos de fitoplasmas (Tabla 1). Se realizaron dos repeticiones intraensayo y dos interensayo.

Determinación de la Sensibilidad Analítica: Se evaluaron controles de ADN plasmídico de fitoplasma y rickettsia de concentración conocida: 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,10; 0,01 y 0,001 $\text{pg}/\mu\text{L}$ mezclado en extractos de ADN de plantas sanas de papayo.

Además, un microlitro de producto de ADN de la primera reacción de PCR para fitoplasmas se diluyó con agua desionizada estéril en diluciones 1: 10, 1: 100, 1: 1000, 1: 10 000, 1: 20 000 y 1: 30 000. Para rickettsia un microlitro de extracto de ADN totales de la misma muestra control se diluyó con agua desionizada estéril en diluciones 1: 10, 1: 100, 1: 1000, 1: 10 000, 1: 20 000 y 1: 30 000. Un microlitro de cada dilución (fitoplasmas y rickettsia) se sometieron a PCR múltiple anidada. Se realizaron tres ensayos y en estos se evaluó tres réplicas de las muestras diluidas.

Evaluación y comparación de protocolos de PCR

Se emplearon controles positivos 152 plantas y 80 controles de plantas negativas a fitoplasmas y rickettsia (Tabla 1). Se calcularon los parámetros de desempeño de la técnica que se muestran a continuación según Massart (16):

Sensibilidad Diagnóstico (D-SN)= $V_p / (V_p + F_n)$

Especificidad Diagnóstico (D-SP)= $V_n / (V_n + F_p)$

Eficacia (E)= $V_p + V_n / V_p + V_n + F_p + F_n$

Valor Predictivo Positividad (Vpp)= $V_p / (V_p + F_p)$

Valor Predictivo Negatividad (Vpn)= $V_n / (V_n + F_n)$

Donde: V_p =Verdaderos positivos, V_n =Verdaderos negativos, F_n =Falsos negativos y F_p =Falsos positivos

Repetitividad intra-laboratorio PCR múltiple anidada: Se realizaron 10 repeticiones de 15 muestras de controles positivos de fitoplasmas y rickettsia de plantas de papayo para determinar la repetitividad del ensayo. Los datos por repetición se compararon y se determinó la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (C.V) con el empleo del software InfoStat/ Profesional Versión 2.0.

Evaluación del sistema de diagnóstico molecular con muestras de campo

Se muestreó un campo de papayo del cultivar 'Maradol Roja' en la región occidental (Finca La Ceiba, San José, Mayabeque) con una alta prevalencia de síntomas de amarillamiento con arrugamiento, entrenudos cortos, clorosis en hojas de la corona y manchas de aspecto aceitoso en el tallo de donde el latex no fluía. Se colectaron un total de 163 muestras. De ellas se seleccionaron 49 con síntomas. Dos gramos de tejido se sometieron al procedimiento de extracción de ADN (16). Todas las muestras se analizaron por nPCR/*HaeIII* (13) para fitoplasmas y PCR simple para rickettsia (6).

Las muestras se sometieron a PCR múltiple anidada con los parámetros y condiciones optimizados. Se determinaron los parámetros de desempeño según Massart (16):

Prevalencia= $(V_p + F_n) / N$

Razón de verosimilitud positiva

$(LR \text{ o } RV_{\text{positivo}}) = \text{sensibilidad} / (1 - \text{especificidad})$

Razón de verosimilitud negativa

$(LR \text{ o } RV_{\text{negativo}}) = (1 - \text{sensibilidad}) / \text{especificidad}$

Para la interpretación de los valores de RV se empleó la escala descrita por Capote (17).

Probabilidad post-test= Razón de probabilidad post-test / (1 + Razón de probabilidad post-test);

Donde:

Razón de probabilidad Post-Test= razón de probabilidad pre-test x razón verosimilitud

Razón Probabilidad pre-test= prevalencia / (1-prevalencia)

Evaluación de la presencia de fitoplasmas y rickettsia en diferentes cultivares

Se muestrearon campos de diferentes cultivares de papayo ubicados en localidades de diferentes regiones Finca La Ceiba, San José de las Lajas (Mayabeque),

Velasco (Holguín) y Puerto Padre y Jesús Menéndez (Las Tunas) por el método de bandera inglesa (18).

Se colectaron un total de 203 muestras de hojas de plantas de papayo, 163 con síntomas de amarilleamiento con arrugamiento, acortamiento de los entrenudos, clorosis de hojas de la corona y presencia de manchas con aspectos aceitosos en el tallo, además, 40 sin síntomas en campos de los cultivares Maradol Roja, Tainung-1 y Nica III. Dos gramos de tejido se sometieron al procedimiento de extracción de ADN (16) y a continuación se realizó una PCR múltiple anidada de acuerdo a las condiciones que se optimizaron en etapas anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de las condiciones de reacción de la PCR múltiple anidada

Los resultados de la evaluación de las diferentes combinaciones de concentraciones de iniciadores mostraron que la mezcla óptima fue R16F2n (0,3 μ M), p86r (0,4 μ M), BPVNr (0,3 μ M) y PBTF1/R1 (0,4 μ M); pues permitieron la amplificación de bandas definidas y de muy buena intensidad para detectar ambos grupos de fitoplasmas y rickettsia como se observa en los carriles del 6 al 10 (Fig. 1).

Los resultados sugieren, que en una PCR múltiple es necesario mayor concentración de iniciadores para lograr mejor amplificación de los locis de ADN pequeños de 200-300 pb y a la vez el incremento de la temperatura, aumenta la especificidad del ensayo.

La repetitividad preliminar del ensayo fue de 100% de confiabilidad con los parámetros y condiciones anteriormente establecidas y la utilización de los controles positivos a fitoplasmas y rickettsia.

No se amplificaron fragmentos de ADN en las muestras utilizadas como controles negativos y positivos de otras especies de bacterias y grupos de fitoplasmas, lo cual confirmó la especificidad analítica de la técnica solo para detectar rickettsia y fitoplasmas de los grupos 16SrI y 16SrII en muestras de papayo. Las condiciones establecidas para la nPCR múltiple permitieron detectar hasta 0,01 pg del ADN plasmídico, lo cual demostró que el ensayo es capaz de detectar bajas cantidades de ADN de fitoplasmas y rickettsia.

La nPCR múltiple presentó un límite de detección para productos de PCR de la primera amplificación de fitoplasmas de 1:1000, mientras para rickettsia se amplificó el fragmento de PCR esperado en la dilución de 1: 10 000 de extractos crudos de ADN. Estos resultados no coinciden con Khan [19] que demostraron un alta sensibilidad analítica de la PCR anidada para detectar fitoplasmas en una dilución 1: 60 000 de los productos de PCR obtenidos en la primera reacción de extractos crudos de ADN de plantas de *Santalum album* (Lin).

Los resultados en el límite de detección pudieron estar influenciados por la especie de hospedante, debido a la presencia de inhibidores de la PCR y bajas concentraciones de los patógenos en la planta, lo cual dificulta el diagnóstico. Además, la distribución irregular de los fitoplasmas en el floema de las plantas infec-

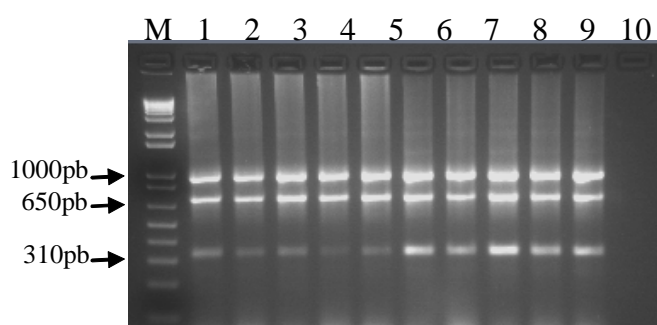


FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que muestra la evaluación de las concentraciones de iniciadores a 0,4 μ M en los locis pequeños para rickettsia 705 bp y fitoplasmas grupo 16SrI. Carriles 1-5: Muestras ADN plantas por amplificación con iniciadores R16F2n (0,3 μ M), p86r (0,3 μ M), BPVNr (0,3 μ M) y PBTF1/R1 (0,4 μ M); y carriles 6-10: muestras ADN plantas por amplificación con iniciadores R16F2n (0,3 μ M), p86r (0,4 μ M), BPVNr (0,3 μ M) y PBTF1/R1 (0,4 μ M). Carril 11: Control negativo. Carril M: 1 Kb plus DNA Ladder, (Invitrogen Life Technologies, EE.UU)./ *Electrophoresis on 1,5 % agarose gel showing the evaluation of the primer concentrations at 0,4 μ M in the small loci for rickettsia of 705 bp and phytoplasmas 16SrI group. Lane 1-5: ADN samples for amplification with R16F2n (0,3 μ M), p86r (0,3 μ M), BPVNr (0,3 μ M) y PBTF1/R1 (0,4 μ M) primers; and lanes 6-10: ADN samples for amplification with R16F2n (0,3 μ M), p86r (0,4 μ M), BPVNr (0,3 μ M) y PBTF1/R1 (0,4 μ M) primers. Lane M: 1 Kb plus DNA Ladder, (Invitrogen Life Technologies, USA).*

tadas, su baja concentración y variaciones en las cantidades de acuerdo a la temporada y órgano de la planta (20), son importantes obstáculos para un eficiente diagnóstico (21). Por estas razones, los fitoplasmas; amenazas para algunas especies de cultivo muy importantes, son de difícil diagnóstico.

Sin embargo, se demostró que la nPCR múltiple puede ser empleada para la detección de fitoplasmas y rickettsia con una alta sensibilidad, lo cual corrobora lo referido por Bertaccini (7), acerca de que el desarrollo de herramientas basadas en la amplificación de ADN como la PCR representó el mejor paso en la detección, identificación y caracterización de estos patógenos.

Evaluación y comparación de protocolos de PCR

En la Tabla 2 se observa el comportamiento de los controles positivos y negativos de fitoplasmas y rickettsia utilizados para la comparación entre las diferentes variantes de PCR evaluadas, los cuales permitieron realizar el cálculo de los parámetros de desempeño.

Los parámetros determinados demostraron la factibilidad de todos los ensayos para la detección de fitoplasmas y rickettsia en plantas de papayo (Tabla 3). La sensibilidad, la eficacia y el valor predictivo de los negativos, en la detección de fitoplasmas mostraron variaciones en su comportamiento con valores superiores al 92%, tanto para la PCR anidada como para la PCR múltiple anidada.

Los valores alcanzados de sensibilidad (95,4%), eficacia (97,0%) y valor predictivo negatividad (92,0%)

en el uso de PCR múltiple anidada, se correlacionaron por la presencia de siete falsos negativos en la detección de fitoplasmas, posiblemente asociado a la distribución irregular de fitoplasmas y en ocasiones de muy baja concentración en el material vegetal que dificultan el diagnóstico (20, 21).

Los resultados en la repetitividad intra-laboratorio de la PCR múltiple anidada mostraron, que la detección de rickettsia no fue afectada. Sin embargo, para fitoplasmas se obtuvo un coeficiente de variación de 3,29 (DE=3,22) para el grupo 16Srl y de 2,85 (DE=0,81) para el grupo 16SrlI.

Los resultados alcanzados permitieron demostrar que la PCR múltiple anidada puede ser utilizada para la detección de infecciones mixtas asociadas a fitoplasmas y rickettsia en el complejo BTS con sensibilidad, especificidad y eficacia similar y en algunos casos igual a los sistemas de detección por PCR convencional previamente informados para estos patógenos (6, 11).

Las ventajas del uso de la PCR múltiple anidada para la detección de infecciones mixtas de virus y bacterias, con relación a otras variantes de PCR, está referida fundamentalmente a su mayor sensibilidad, especificidad, disminución de costos y riesgos de contaminaciones e incrementar la rapidez del diagnóstico (16). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que utilizaron el método de PCR múltiple con iniciadores específicos para la detección de los grupos 16Srl y 16SrlI en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (15).

TABLA 2. Resultados de la evaluación de controles positivos y negativos para la detección de fitoplasmas y rickettsia/ *Evaluation results of positive and negative controls for phytoplasma and rickettsia detection.*

Controles	nPCR		PCR simple			nPCR múltiple						
	Fitoplasmas		Rickettsia			Fitoplasmas			Rickettsia			
		+	-		+	-		+	-		+	-
Infectados	152	147	5	152	149	3	152	145	7	152	147	5
Sanos	80	0	80	80	0	80	80	0	80	80	0	80

TABLA 3. Comparación de los parámetros evaluativos entre PCR anidada para fitoplasmas y PCR simple para rickettsia con PCR múltiple anidada./ *Comparison of the evaluative parameters among nPCR for phytoplasma and simple PCR for rickettsia with nPCR multiplex*

Parámetros Evaluativos	nPCR-PCR simple		nPCR múltiple	
	Fitoplasma	Rickettsia	Fitoplasma	Rickettsia
Sensibilidad (S)	96,7%	98,0%	95,4%	96,7%
Especificidad (SP)	100%	100%	100%	100%
Eficacia (E)	97,8%	98,7%	97,0%	97,8%
Valor Predictivo Positivo (VPP)	100%	100%	100%	100%
Valor Predictivo Negativo (VPN)	94,1%	96,4%	92,0%	94,1%

Esta metodología es capaz de detectar ambos patógenos e inclusive diferenciar la presencia de grupos de fitoplasmas, lo cual puede constituir una herramienta para el estudio de las infecciones mixtas y conocer la distribución de los grupos 16Srl y 16SrlI en papayo, como etapa previa a estudios más complejos como RFLP y secuenciación, similar a lo planteado por Bertaccini (7).

Evaluación del sistema de diagnóstico molecular con muestras de campo

En la evaluación de plantas de campo en 43 de 49 muestras con síntomas se detectaron fitoplasmas y en dos de 40 muestras sin síntomas. Mientras en 41 de 49 muestras con síntomas y en tres asintomáticas se detectaron rickettsia.

Los resultados de la aplicación de la PCR múltiple anidada confirmaron los obtenidos previamente en este trabajo y también los informados por otros autores (22, 23), que plantearon que plantas asintomáticas de papayo pueden comportarse como reservorios de fitoplasmas y bajo determinadas condiciones del cultivo tardar en el desarrollo de los síntomas hasta 11 semanas después de ser infectadas.

El método de diagnóstico permitió confirmar una prevalencia del 55% de la enfermedad en la población de plantas analizadas, mientras que la habilidad del método para la detección de los positivos ($RV_{positivo}$) fue de 17,55 para fitoplasmas y 11,16 para rickettsia (Tabla 4), esta última ligeramente inferior. Sin embargo en ambos casos fue mayor a 10, valor que constituye el límite indicativo de que un método de diagnóstico confirma la presencia de los patógenos asociados a la enfermedad en muestras colectadas en condiciones de campo, según la escala de valores descrita por Capote (17).

Por otra parte, la PCR múltiple demostró una habilidad moderada para la detección de rickettsia y

TABLA 4. Parámetros evaluativos de la nPCR múltiple con muestras de campo./ *Evaluative parameters of the nPCR multiplex with field samples*

Parámetros evaluativos	nPCR múltiple	
	Fitoplasmas	Rickettsia
Prevalencia (P)	0,55	0,55
Razón verosimilitud positiva ($RV_{positivo}$)	17,55	11,16
Razón de verosimilitud negativa ($RV_{negativo}$)	0,13	0,18
Probabilidad Post Test (Prob. post-test)	0,96	0,93

fitoplasmas en plantas sanas ($RV_{negativo}$) con valores inferiores a 0,2 según lo establecido por Capote (17).

La Figura 2 muestra el comportamiento de la probabilidad de que los resultados obtenidos en el diagnóstico correspondan efectivamente con el estado sanitario de la plantación (Probabilidad post-test) con relación a diferentes valores de prevalencia de la enfermedad y $RV_{positivo}$ y $RV_{negativo}$ determinados para el ensayo de PCR múltiple anidada.

Se puede observar que a partir del 10% de prevalencia de la enfermedad en el campo se incrementó la probabilidad de un diagnóstico efectivo de ambos patógenos con el sistema de PCR múltiple anidada, tanto para la detección de plantas sanas como infectadas (Fig. 2).

Evaluación de la presencia de fitoplasmas y rickettsia en diferentes cultivares

Los cultivares mostraron una alta prevalencia de síntomas, lo cual se evidenció por los porcentajes de infección de fitoplasmas detectados (Tabla 5), que estuvieron entre 67-74% sin diferencias significativas entre ellos. En el caso de rickettsia los porcentajes de infección estuvieron entre 33 y 51%, siendo el cultivar 'Tainung-1', significativamente más afectado que 'Maradol Roja' y 'Nica III' (Tabla 5). Este constituye un resultado importante pues 'Tainung-1' es de reciente introducción en áreas de producción del país y, sin embargo su comportamiento ante complejo BTS la hace tan o más susceptible que 'Maradol Roja', cultivar de mayor distribución y establecimiento en la producción.

Los resultados confirmaron que el método de diagnóstico puede ser empleado en programas de mejoramiento para la evaluación de la susceptibilidad de cultivares de papayo antes de ser introducidos y/o extendidos en la producción y para determinar el comportamiento de genotipos silvestres o criollos que pueden ser utilizados como fuente de resistencia. Asimismo, el método de PCR múltiple anidada puede ser utilizado en la evaluación de materiales de propagación de papayo tal como refirió Laviña (24) para otros cultivos de importancia económica.

De forma similar las herramientas moleculares basadas en PCR se implementaron en los programas de mejoramiento genético en cocotero (*Cocos nucifera* L.), manzana (*Malus* spp.) y caña de azúcar (*Saccharum* spp.), en los cuales el uso del diagnóstico molecular permitió la eliminación temprana de plantas infectadas con diferentes grupos de fitoplasmas en plantaciones de producción y bancos germoplasmas (18, 25, 26).

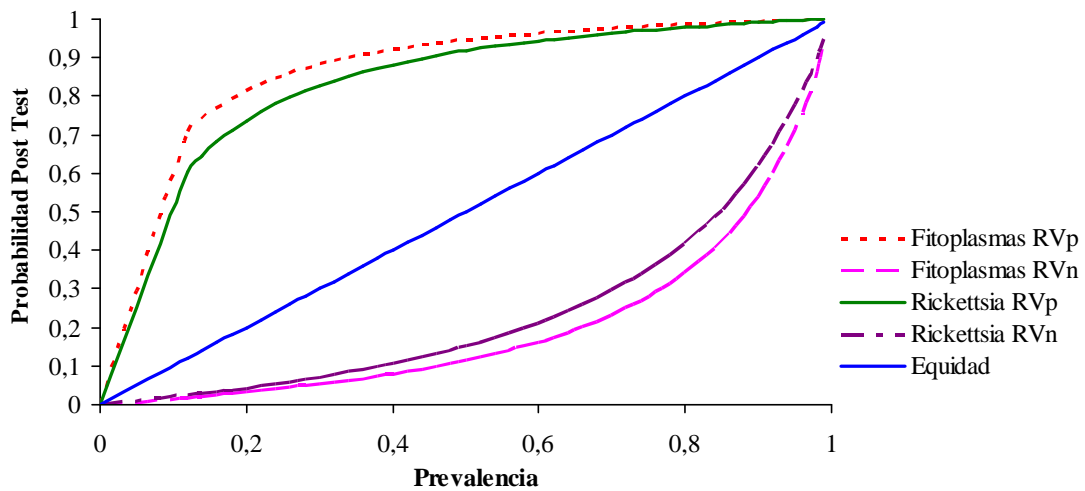


FIGURA 2. Gráfico del comportamiento de la probabilidad post test de la detección de fitoplasmas y rickettsia por PCR anidada múltiple en función de la prevalencia de síntomas asociados al complejo BTS./ *Graphic showing probability post test behaviour of the phytoplasmas and rickettsia detection by nPCR multiplex in function of symptoms prevalence associated with BTS.*

TABLA 5. Plantas positivas por PCR múltiple anidada de tres cultivares de papayos utilizados en la producción./ *Positive plants by nPCR multiplex from three papaya cultivars used in production*

Cultivar	Fitoplasma		Rickettsia	
	Porcentaje Infección (%)	Es \bar{X}	Porcentaje Infección (%)	Es \bar{X}
Maradol Roja	74,07	0,049	35,80 ab	0,054
Tainung-1	67,85	0,059	51,78 a	0,065
Nica III	76,05	0,052	33,80 b	0,057

Nota: Valores con letras diferentes difieren estadísticamente $p < 0,05$.

REFERENCIAS

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Consensus document on the biology of papaya (*Carica papaya* L.). OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, (33). Paris (France): Head of Publications Service; 2005.
2. Gibb K, Persley D, Schneider B, Thomas J. Phytoplasmas associated with papaya diseases in Australia. *Plant Disease*. 1996; 80: 174-178.
3. Lebsky V, Poghosyan A, Silva-Rosales L. Application of scanning electron microscopy for diagnosing phytoplasmas in single and mixed (virus-phytoplasma) infection in Papaya. In: Proceedings of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops; 2010 July 5-10; Neustadt, Germany. Berlin: GmbH.
4. Rojas RI, Zavaleta-Mejía E, Rivas-Valencia P. Presencia de fitoplasmas en papayo (*Carica papaya*) en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2011; 17(1): 47-50.
5. Bekele B, Hodgetts J, Tomlinson J, Boonham N, Nikolic P, et al. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology*. 2011; 60: 345-355.
6. Davis M, Ying Z, Brunner B, Pantoja A, Fewerda F. Rickettsial relative associated with Papaya Bunchy Top disease. *Curr Microbiol*. 1998; 36: 80-84.
7. Bertaccini A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*. 2007; 12: 673-689.
8. Alonso M, Tornet Y, Aranguren M, Ramos R, Rodríguez K, et al. Caracterización de los frutos de cuatro cultivares de papaya del grupo solo,

- introducidos en Cuba. *Revista Agronomía Costarricense*. 2008; 32 (2): 169-175.
9. Food Agricultural Organization. [database on the Internet] Crop production Statistics (FAO-STAT). c2009-[Cited 2011 Feb 15]. Available from: <http://www.fao.org/>
 10. Naranjo M. Detección de bacterias tipo *Rickettsia* en plantas con síntomas de cogollo arrepollado de la papaya en Cuba. En actas del I Simposio Internacional sobre Vigilancia Fitosanitaria y su relación con la Protección del Entorno; 10-13 Septiembre 2002; La Habana. Cuba. Habana: Libro de resúmenes.
 11. Arocha Y, Piñol B, López M, Miranda I, Almeida R, et al. 'Bunchy Top Symptom' of papaya in Cuba: new insights. *Bulletin of Insectology*. 2007; 60 (2): 393-394.
 12. Acosta K, Piñol B, Arocha Y, Wilson M, Boa E, et al. Transmission of the Phytoplasma Associated with Bunchy Top Symptom of Papaya by *Empoasca papayae* Oman. *J. Phytopathology*. 2010; 158:194-196.
 13. Acosta K, Piñol B, Zamora L, Chávez JA, Flores GL, et al. Molecular characterization and diagnostic of phytoplasma and rickettsia pathogens in papaya (*Carica papaya* L.) affected with bunchy top symptom (BTS) in Cuba. En actas del III Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical; 5-9 Octubre 2010; Habana, Cuba. Habana: Libro de resúmenes; 2010.
 14. Gundersen D, Lee IM. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*. 1996; 35: 144-151.
 15. Leyva-López NE, Ochoa-Sánchez JC, Leal-Klevezas DS, Martínez-Soriano JP. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal Microbiology*. 2002; 48: 1062-1068.
 16. Massart S, Brostaux Y, Barbarossa L, Battle A, Cesar V, et al. Inter-laboratory evaluation of two Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction-based methods for detection of four fruit tree viruses. *Ann. Appl. Biol.* 2009; 154:133-141.
 17. Capote N, Bertolini E, Olmos A, Vidal E, Martínez MC, Cambra M. Direct sample preparation methods for detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. *International Microbiology*. 2009; 12: 1-6.
 18. Arocha Y. Detección y caracterización de los fitoplasmas asociados al síndrome del amarilleamiento foliar (YLS) de la caña de azúcar en Cuba [tesis]. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA): Universidad Agraria de La Habana; 2000.
 19. Khan JA, Srivastava P, Singh SK. Efficacy of nested-PCR for the detection of phytoplasma causing spike disease of sandal. *Current Science*. 2004; 86 (11): 1530-1533.
 20. Firrao G, Garcia-Chapa M, Marzachí C. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plants and insects host. *Frontiers in Bioscience*. 2007; 12: 1353-1375.
 21. Galetto L, Marzachí C. Real-time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas. In: Weintraub PG, Jones P, Editors. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. United Kingdom: CAB International; 2010.p. 1-18.
 22. Guthrie JN, White DT, Walsh KB, Scott PT. Epidemiology of phytoplasma associated papaya diseases in Queensland, Australia. *Plant Disease*. 1998; 82: 1107-1111.
 23. Elder R, Milne J, Reid D, Guthrie J, Persley D. Temporal incidence of three phytoplasma associated diseases of *Carica papaya* and their potential hemipteran vectors in central and south-east Queensland. *Australian Plant Pathol.* 2002; 31: 165-176.
 24. Laviña A, Sabaté J, Battle A. Evaluation of detection methods for Virus, Viroids and Phytoplasmas affecting pear and apple. In: *Proceedings of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*; 2010 July 5-10; Neustadt, Germany. Berlin: GmbH.
 25. Kullaya A, Mpunami A. Breeding for resistance to coconut lethal disease in Tanzania. In: *Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing Disease of Coconut*; 2008 June 3-5; Accra, Ghana. France: CIRAD.
 26. Bisognin C, Schneider B, Salm H, Grando MS, Jarausch W, et al. Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. *Phytopathology*. 2008; 98: 153-158.

(Recibido 21-9-2011; aceptado 9-10-2011)