

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**OBTENCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE
Echeveria pumila cv. 'Glauca' LIBRES DE
BACTERIAS Y FITOPLASMAS ASOCIADOS
A LA FASCIACIÓN DEL TALLO**

JAVIER EMANUEL BULBARELA MARINI

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **OBTENCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS ASOCIADOS A LA FASCIACIÓN DEL TALLO.** Realizada por el alumno: JAVIER EMANUEL BULBARELA MARINI, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dr. Gregorio Arellano Ostoa

ASESOR



Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

ASESOR



Dr. Sergio Aranda Ocampo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2014

OBTENCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Echeveria pumila* cv. 'Glauca' LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS ASOCIADOS A LA FASCIACIÓN DEL TALLO.

Javier Emanuel Bulbarela Marini
Colegio de Postgraduados 2014

RESUMEN

Echeveria pumila cv. 'Glauca' es una crasulácea nativa de México de importancia ornamental, el género *Echeveria* destaca como un grupo que se encuentra en peligro debido a la sobreexplotación de algunas de sus especies. En algunos especímenes de *Echeveria pumila* por ejemplo el cv. 'Glauca', se han observado síntomas de fasciación, alta proliferación y reducción del área foliar; síntomas que son característicos de infecciones por bacterias y fitoplasmas. En el presente trabajo, se detectó la presencia de fitoplasmas y bacterias asociados a este síntoma en plantas de *E. Pumila* cv. 'Glauca' mediante la técnica de PCR. En el caso de bacterias utilizando iniciadores universales 27f y 1492r y para fitoplasmas los iniciadores P1 - P7 y después con una PCR anidada utilizando R16F2 y R16R2. Para poder generar material libre de estos patógenos fue necesario la multiplicación *in vitro* de este cultivar, el procedimiento abarcó la evaluación de medios de cultivo suplementados con fitoreguladores en diferentes concentraciones. Se evaluaron combinaciones de bencil adenina (BA) 0.2 mg·L⁻¹ más ácido naftalén acético (ANA) 0.02 mg·L⁻¹ y otras tres concentraciones de thidiazuron (TDZ) (0.1, 0.2 y 0.6, mg·L⁻¹) sin la presencia de ANA. Todos los

medios se suplementaron con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico y el pH se ajustó a 5.7, antes de la esterilización con autoclave. En los explantes asintomáticos, el medio con TDZ ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) fue el que generó el mayor número de brotes por explante (B/E) con 2.5, mientras que los explantes con síntomas en el medio con BA más ANA produjeron una media de 3.6 B/E. En los brotes con síntomas éstos se siguieron manifestando en todos los subcultivos bajo condiciones *in vitro*. Éstos fueron utilizados para elaborar una nueva metodología para obtener plantas libres de patógenos, basadas en la combinación de tres técnicas para superar la dificultad que presenta el manejo de los tejidos con el síntoma de fasciación. Fue posible obtener plantas libres de patógenos mediante la combinación del uso de antibióticos, la etiolación de los tejidos y la posterior extracción de los meristemas de los brotes que habían sido regenerados *in vitro* a partir de ápices. Los resultados fueron comprobados mediante PCR e indicaron que el 90% de los brotes generados a partir de meristemas estuvieron libres de bacterias y fitoplasmas.

***In vitro* OBTAINING *Echeveria pumila* cv 'Glauca' PLANTS FREE OF BACTERIA AND PHYTOPLASMAS ASSOCIATED FASCIATION OF STEM.**

Javier Emanuel Bulbarela Marini

Colegio de postgraduados 2014

ABSTRACT

Echeveria pumila cv. 'Glauca' is a native of Mexico crasulácea ornamental importance, the genus *Echeveria* out as a group that is at risk due to overfishing of some species. In some specimens of *Echeveria pumila* cv. 'Glauca' have symptoms of fasciation, proliferation and reduction in leaf area; symptoms that are characteristic in cases of infection by bacteria and phytoplasmas. In the present study, detected the presence of phytoplasmas and bacteria associated in *E. pumila* cv. 'Glauca' plants with this symptom by PCR. in the case of bacteria using universal primers 27f and 1492r and for phytoplasms the primers P1 - P7 and a nested PCR with R16F2 and R16R2, to generate material free of these pathogens was necessary in vitro multiplication of this species in this procedure supplemented culture media phytohormones evaluated at different concentrations, combining benzyl adenine $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BA) more naphthalene acetic acid $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (NAA) and three concentrations of thidiazuron (TDZ) (0.1 , 0.2 and $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) without the presence of ANA. All media were supplemented with $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of citric acid and the pH was adjusted to 5.7 before autoclaving. In asymptomatic explants, the medium with TDZ ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was the one that

generated the highest number of shoots per explant (B/E) with 2.5, while the symptoms explants with medium with BA and NAA produced an average of 3.6 B/E. Besides the symptoms continued to express in all subcultures under *in vitro* conditions. These were used to develop a new methodology for pathogen-free plants based on the combination of three techniques to overcome the difficulty of handling tissues with symptoms of fasciation. It was possible to obtain pathogen free plants by combining antibiotics, etiolation and subsequent meristems extraction of shoot regenerated *in vitro*. The results were verified by PCR and indicated that 90% of shoots generated from meristems were free of bacteria and phytoplasmas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados. Especialmente al programa de Fitosanidad-Fitopatología por permitirme desarrollarme profesional y académicamente, a través de mis estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por otorgarme la beca para tesis de posgrado.

Al Dr. Leopold Jan Fucikovsky Zak[†] por haber confiado en mí en el inicio de mi trayecto por esta institución, y aportar la idea inicial de esta tesis.

Al Dr. Gregorio Arellano por la dirección de este trabajo y toda la ayuda brindada durante la realización del mismo.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez por formar parte de mi consejo particular y por las correcciones realizadas a los escritos.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por formar parte de mi consejo particular y su apoyo en lo acontecimientos que surgieron en mi estancia en la institución.

Al Dr. Eduardo García y la Dra Guadalupe Valdovinos, por su ayuda.

Gracias a todas las personas laboratoristas, trabajadores de campo, compañeros de laboratorio, que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor a mis padres Gloria y Javier[†] que hicieron todo para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme, en especial a mi madre por darme todo su apoyo en todos estos años.

A mis hermanos, sobrinos y toda mi familia en general, porque me han brindado su apoyo.

A mis amigos Abimael, David Tapia, Nayely, Verenice, Moisés, Fernando, los hermanos Aradilla, Claudia, Fernando y a todos mis amigos que no puedo mencionar por falta de espacio en este texto por su amistad y apoyo.

CONTENIDO	Pág.
OBTENCIÓN <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE <i>Echeveria pumila</i> cv. 'Glauca'	
LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS ASOCIADOS A LA	
FASCIACIÓN DEL TALLO	
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VII
DEDICATORIA.....	VIII
CONTENIDO.....	IX
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
CAPÍTULO I.- DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN <i>Echeveria pumila</i> cv.	
'Glauca' CON SÍNTOMAS DE FASCIACIÓN EN MÉXICO	
RESUMEN.....	20
ABSTRACT.....	22
INTRODUCCIÓN.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Material vegetal.....	25
Prueba de remisión de síntomas.....	26
Extracción de ADN.....	28
Detección de fitoplasmas por PCR.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
Remisión de síntomas.....	30

Detección de fitoplasmas por PCR.....	31
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
CAPÍTULO II.- DETECCIÓN DE BACTERIAS EN <i>Echeveria pumila</i> cv.	
‘Glauca’ CON SÍNTOMAS DE FASCIACIÓN	
RESUMEN.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUCCIÓN.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Material vegetal.....	42
Extracción de ADN.....	43
Detección de bacterias por PCR.....	45
Secuenciación y análisis del gen 16S ARNr.....	46
Electroforesis.....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
Extracción de ADN.....	47
Detección de bacterias por PCR.....	48
Análisis de secuencia.....	49
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54

CAPÍTULO III.- OBTENCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Echeveria pumila*

cv. 'Glauca' LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS

RESUMEN.....	58
ABSTRACT.....	60
INTRODUCCIÓN.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
Obtención de material vegetal.....	64
Desinfestación y establecimiento <i>in vitro</i> de material vegetal.....	64
Establecimiento de hojas para producción de embriones somáticos...	65
Multiplicación <i>in vitro</i>	67
Estudio anatómico de masas proembriogénicas.....	67
Análisis estadístico de datos.....	68
Obtención de plantas libres de patógenos.....	69
Extracción de ADN.....	71
Detección de fitoplasmas mediante PCR.....	72
Detección de bacterias mediante PCR.....	73
Electroforesis.....	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
Desinfestación y establecimiento de material vegetal.....	74
Multiplicación.....	75
Detección de bacterias y fitoplasmas mediante PCR.....	78
Obtención de plantas libres de bacterias y fitoplasmas.....	80
Producción de embriones somáticos.....	83

CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	90
DISCUSIÓN GENERAL.....	95
CONCLUSIONES GENERALES.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	104

Lista de cuadros	Pág.
CAPÍTULO I.- DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN <i>Echeveria pumila</i> var. glauca CON SÍNTOMAS DE FASCIACIÓN EN MÉXICO	
Cuadro 1.- medio de cultivo MS.....	27
CAPÍTULO II.- DETECCIÓN DE BACTERIAS EN <i>Echeveria pumila</i> cv. ‘Glaucá’ CON SINTOMAS DE FASCIACIÓN	
Cuadro 1.- concentraciones (ng·L ⁻¹) y absorbancia de un lote de nueve muestras de ADN total obtenido de plantas con síntomas de fasciación.....	48
Cuadro 2.- Secuencia de la región 16S ARNr amplificado con iniciadores para bacterias en tejido de <i>E. pumila</i>	50
CAPÍTULO III.- OBTENCIÓN <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE <i>Echeveria pumila</i> cv. ‘Glaucá’ LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS	
Cuadro 1.- Número de brotes y tamaño del brote mayor en plantas sintomáticas y asintomáticas durante un mes en los tratamientos, medio sin hormonas (control), medio suplementado con bencil adenina 0.2 mg·L ⁻¹ y ácido naftalén acético 0.02 mg·L ⁻¹ (BA), thidiazuron (tdz).....	76
Cuadro 2.- Número de brotes y tamaño del brote mayor en plantas sintomáticas y asintomáticas durante dos meses en los tratamientos, medio sin hormonas (control), medio suplementado con bencil adenina 0.2 mg·L ⁻¹ y ácido naftalén acético 0.02 mg·L ⁻¹ (BA), thidiazuron (tdz).....	77

CAPÍTULO I.- DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN *Echeveria pumila* cv. ‘Glauca’ CON SINTOMAS DE FASCIACIÓN EN MÉXICO

Figura 1.- Amplificación de la región 16S ARNr de fitoplasmas. 1 y 18) marcador de peso molecular (1kb Axygen), 2) control negativo, 3) control positivo PCR directa, 4) Control positivo PCR anidada, 5) hoja de planta 1, 6) tallo sección superior planta 1, 7) tallo sección media planta 1, 8) tallo sección baja y raíz planta 1, 9) hoja de planta 2, 10) tallo sección superior planta 2, 11) tallo sección media planta 2, 12) tallo sección baja y raíz planta 2, 13) hoja de planta 3, 14) tallo sección superior planta 3, 15) tallo sección media planta 3, 16) tallo sección baja y raíz planta 3, 17) planta asintomática (5-17 PCR anidada)..... **32**

CAPÍTULO II.- DETECCIÓN DE BACTERIAS EN *Echeveria pumila* cv. ‘Glauca’ CON SÍNTOMAS DE FASCIACIÓN

Figura 1.- plántula *in vitro* de *Echeveria pumila* cv. ‘Glauca’ con síntomas de fasciación, reducción del área foliar y proliferación..... **43**

Figura 2.- Gel de agarosa con las muestras de PCR a partir de plantas *in vitro*: 1) Control negativo, 2) Control positivo, 3-5) plantas asintomáticas, 6) marcador molecular (Axygen 1kb), 7-13) plantas sintomáticas..... **49**

Figura 3.- Árbol filogenético de la región 16S ARNr de la bacteria encontrada en *E. pumila* comparado con secuencias afines y con secuencias de

patógenos que provocan síntomas de fasciación, Invitro representa a la secuencia de estudio obtenida de los tejidos <i>E. pumila</i> mediante PCR con los iniciadores 27f y 1492r.....	52
CAPÍTULO III.-OBTENCIÓN <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE <i>Echeveria pumila</i> cv. 'Glauca' LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS	
Figura 1.- Esquema de la técnica empleada para la obtención de material libre de patógenos.....	70
Figura 2.- Tejidos apicales y meristemáticos de <i>E. pumila</i> (en papel milímetro con ayuda de microscopio estereoscópico a) ápice alargado 1 primordio foliar 2 meristemo b) meristemo (0.5 mm).....	71
Figura 3.- Amplificación de la región 16S ARNr de fitoplasmas. Carril 1 y 18) marcador de peso molecular (1kb Axygen), 2) control negativo, 3) control positivo PCR directa, 4) Control positivo PCR anidada, 5) hoja de planta 1, 6) tallo sección superior planta 1, 7) tallo sección media planta 1, 8) tallo sección baja y raíz planta 1, 9) hoja planta 2, 10) tallo sección superior planta 2, 11) tallo sección media planta 2, 12) tallo sección baja y raíz planta 2, 13) Hoja de planta 3, 14) tallo sección superior planta 3, 15) tallo sección media planta 3, 16) tallo sección baja y raíz planta 3, 17) planta asintomática (carriles 5-17 PCR anidada).....	79
Figura 4.- Explante con un mes en 20 ppm de tetraciclina con remisión de síntomas 1) tallo del brote 2) hojas.....	81
Figura 5.- Meristemo después de dos meses en MS con 0.2 mg•L ⁻¹ de bencil	

adenina 1) tallo del brote 2) hojas.....	82
Figura 6.- Amplificación de la región 16S ARNr bacteriano con producto PCR a partir de meristemas: carril 1) marcador molecular, 4) muestra meristemo 3 (positiva para bacterias amplificación posiblemente de 1500 pd), 12) control positivo, 13) control negativo, 2-11) muestras de meristemas (negativas para bacterias).....	83
Figura 7.- Sección de hoja con nódulos inmaduros.....	85
Figura 8.- Sección de hoja con nódulos maduros (diferenciados).....	85
Figura 9.- Tejido de <i>Echeveria pumila</i> cv. 'Glauca', con nódulos inmaduros (células en división, en: medio MS con 2 mg•L ⁻¹ 2,4-D por 10 semanas en oscuridad; la siguiente etapa en un medio MS con 4 mg•L ⁻¹ de ANA y 0.4 mg•L ⁻¹ BA por un mes, por último se colocó en un MS con 0.4 mg•L ⁻¹ de ANA y 0.04 mg•L ⁻¹ BA por un mes. 1) Nódulos inmaduros con células parenquimatosas en mitosis y una epidermis limítrofe 2) Epidermis foliar.....	86
Figura 10.- Tejido de callo de <i>Echeveria pumila</i> cv. 'Glauca', con nódulos maduros (diferenciados), el cual estuvo en: medio MS con 3 mg•L ⁻¹ 2,4-D por 10 semanas en oscuridad; la siguiente etapa en un medio MS con 4 mg•L ⁻¹ de ANA y 0.4 mg•L ⁻¹ BA por un mes, por último se colocó en un MS con 0.4 mg•L ⁻¹ de ANA y 0.04 mg•L ⁻¹ BA por un mes. 1) Nódulos maduros 2) Tricoma 3) Tejido de parénquima 4) Haz vascular 5) Vaina del haz vascular 6) Epidermis limítrofe del nódulo.....	87

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Echeveria* perteneciente a la familia Crassulaceae y es originario de México. La filotaxia en espiral es distintiva lo cual es llamativo de este género. Son plantas perennes, con raíces fibrosas, tallos simples o ramificados, con inflorescencia lateral o axilar, presenta floración a mediados de verano con brácteas debajo de cada flor (Meyrán, 2003). En el caso de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' las hojas son de color azul-verdoso o gris y se distingue por sus hojas obovado-cuneadas, ápices redondeados y mucronados. Su propagación es mediante rizomas, esquejes o hijuelos. Esta planta ornamental tiene una buena aceptación en el mercado mundial lo cual le da importancia económica (Sajeva y Costanzo, 1994).

Las principales enfermedades que atacan al género *Echeveria* son las provocadas por hongos, como son la roya causada por *Puccinia echevericiae* y la mancha de la hoja causada por *Stemphylium bolicki* (Pirone, 1978). Algunos especímenes de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá', presentan la sintomatología de fasciación con reducción del área foliar y alta proliferación, estos síntomas en estudios anteriores han sido relacionados con fitoplasmas (Andreu y Gómez 2007) o bacterias como *Rhodococcus fascians* (Norimoto *et al.*, 1980)

En la mayoría de los casos, los síntomas que son producidos por fitoplasmas son el amarillamiento o bronceado, enanismo, entrenudos cortos, flores estériles, frutos y semillas anormales, proliferación de raíces aéreas (desarrollo de apariencia de escoba de bruja) y crestas (OIRSA, 2005) otros son el achaparramiento, la producción excesiva de retoños, hojas estrechas y pequeñas, rayas blanquecinas en las hojas o con albinismo total, rayas cortas o estrías verde claro, márgenes anchos y fasciación (Andreu y Gómez 2007). Varios de estos síntomas inducidos por fitoplasmas, tales como el aumento de brotes, proliferación de hojas, aberraciones y filodia, sugieren la existencia de cambios cuantitativos en fitohormonas (Musetticabi, 2010).

Se ha documentado que los fitoplasmas pueden ocasionar abscisión de hojas y que la acumulación de ácido abscísico puede ocasionar dicho síntoma (Matteoni y Sinclair, 1983). Por otro lado, Pertot *et al.* (1998) reportaron que plántulas de vinca micropropagadas infectadas con fitoplasma, presentaron un contenido de ácido indol acético diez veces mayor que las plantas no infectadas.

La bacteria *Rhodococcus fascians* es Gram-positiva, un actinomiceto fitopatógeno que en una amplia gama de plantas induce brotes modificando el fenotipo, por la activación de los meristemos axilares y la formación de meristemos de *novo* (de O. Manes *et al.*, 2001). En el caso de *Arabidopsis thaliana* la infección por *R. fascians*, provoca un aspecto raquítico de las partes

aéreas de la planta con flores anormales e inflorescencias pequeñas múltiples, hojas dentadas y fasciación de tallos (Vereecke *et al.*, 2000).

Por otro lado, ha sido documentado en investigaciones previas que es posible la co-infección con bacterias y fitoplasmas; en este contexto, se han reportado la coinfección de *Xylella* y fitoplasmas en *Catharanthus roseus*, produciendo un síntoma de escoba de bruja.

La presente investigación de tesis se aborda en tres capítulos, la cual se enfoca en 1) Detectar la presencia de fitoplasmas *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' en tejidos con síntomas de fasciación y asintomáticos de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá'; 2) Detectar la presencia de bacterias en los tejidos con y sin síntomas de fasciación y 3) Desarrollar un protocolo para la obtención de plantas libres de estos dos patógenos.

Por último, resaltar que la generación del conocimiento acerca de los patógenos que se encuentran involucrados en la sintomatología de fasciación en plantas de *E. pumila*, es importante para sentar las bases de estudios posteriores de esta enfermedad, además de abordar la importancia de obtener plantas libres de patógenos como la mejor medida preventiva para solucionar los problemas fitosanitarios que aquejan a los productores.

CAPITULO I.

DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN *Echeveria pumila* cv. 'Glauca' CON SÍNTOMAS DE FASCIACIÓN EN MÉXICO

RESUMEN

Echeveria pumila cv. 'Glauca' es una planta originaria de México perteneciente a la familia crassulaceae. En el caso de la variedad Glauca, lo llamativo son sus hojas de color verde, azul verdoso o gris, las flores se presentan en inflorescencia a mediados de verano y son de color amarillo teniendo cinco pétalos y cinco sépalos configurados en forma de estrella. Esta especie presenta una buena aceptación en el mercado mundial como planta de ornato, siendo una de las más vendidas, lo que le da una importancia económica considerable. Al igual que otros cultivos, el de *Echeveria* se ve afectado por diferentes enfermedades; algunas de estas plantas manifiestan síntomas de fasciación de etiología desconocida y que por la naturaleza de los mismos, se considera que posiblemente estén relacionados con fitoplasmas y/o bacterias. El objetivo de este estudio fue determinar si los síntomas están relacionados con la presencia de fitoplasmas en el tejido de la planta, para lo cual se utilizaron técnicas para la detección directa e indirecta. Mediante la prueba indirecta a través de tratamientos al tejido vegetal con el antibiótico tetraciclina se logró obtener la remisión *in vitro* de síntomas de fasciación en brotes de *Echeveria*. Además, mediante PCR directa con los

iniciadores P1 y P7 anidados con R16F2 y R16R2, se detectó la presencia de fitoplasmas con la amplificación de un fragmento de alrededor de 1200 pb, ambos resultados fueron positivos para dicho patógeno, lo que indica que estos patógenos pudieran estar relacionados con esta sintomatología.

Palabras clave: Fitoplasma, crasulacea, tetraciclina.

ABSTRACT

Echeveria pumila cv. 'Glaucá' is native to Mexico plant in the crassulaceae family. In the case of the variety glauca, the striking leaves are gray, green or blue-green, Flowers appear in midsummer inflorescence and are yellow having five petals and five sepals configured in a star shape. This species has a good reputation in the world market as an ornamental plant, being one of the most sold, which gives it considerable economic importance. Like other crops, *Echeveria* is affected by various diseases; is considered to be possibly related to phytoplasmas and / or bacteria as causal agents. The aim of this study was to determine if the symptoms are related to the presence of phytoplasma in the plant tissue, for which techniques for direct and indirect detection were used. By indirect evidence through the plant tissue treatment with the antibiotic tetracycline were able to obtain *in vitro* reversal of symptoms of fasciation in outbreaks of *Echeveria*. Furthermore, direct PCR with primers P1 and P7 and R16R2 R16F2 nested with the presence of phytoplasmas with amplification of a fragment of about 1200 bp was detected, both results were positive for this pathogen, which indicates that these pathogens might be related to these symptoms.

Keywords: phytoplasma, crasulácea, tetraciclina.

INTRODUCCIÓN

Echeveria pumila cv. 'Glaucá' perteneciente a la familia Crassulaceae, es originaria de México. Esta tiene una llamativa filotaxia en espiral. (Meyrán, 2003). Las hojas son obovado-cuneadas, de color azul-verdoso o gris (Sajeva y Costanzo, 1994). Su propagación es mediante rizomas, esquejes e hijuelos. Esta planta ornamental tiene una buena aceptación mundial siendo una de las plantas más vendidas, lo cual le da una importancia económica considerable.

Las principales enfermedades citadas para el género *Echeveria* son las ocasionadas por hongos (Pirone, 1978). *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' ha llegado a presentar síntomas de fasciación, proliferación y área foliar reducida; síntomas que son frecuentemente asociados con fitoplasmas como agente causal de estas enfermedades. Otros de los síntomas relacionados con estos patógenos son: amarillamientos o bronceados, enanismo, entrenudos cortos, flores estériles, frutos y semillas anormales, proliferación de raíces aéreas, desarrollo de apariencia de escoba de bruja, crestas, (OIRSA, 2005) achaparramiento, producción excesiva de retoños, rayas blanquecinas en las hojas o con albinismo total, rayas cortas o estrías verde claro, márgenes anchos. (Andreu y Gómez 2007).

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular y están asociados con cientos de enfermedades en las plantas. Estos microorganismos aún no se han podido cultivar *in vitro*, por lo que su fisiología y la interacción con el hospedante permanecen aún sin conocerse completamente (Punja y Boer 2007). Existen varios métodos de detección de fitoplasmas, algunos son: mediante la sintomatología expresada por la planta infectada, por microscopía electrónica, mediante remisión de síntomas y por la detección mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIRSA, 2005).

Se ha probado la remisión de síntomas, como un método indirecto de detección de fitoplasmas, esto mediante el uso de tetraciclina, ya que es conocida por su efecto bacteriostático con micoplasmas, fitoplasmas y spiroplasmas (Davis *et al.*, 1968; Liao and Chen, 1981; Lee, 1987), en la mayoría de los caso los tejidos al dejar de tener contacto con el antibiótico vuelven a presentar los síntomas (Brade *et al.*, 2000).

Un método para la determinación directa de fitoplasmas es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Este método presenta confiabilidad y sensibilidad, para ellos se han generado técnicas de extracción de ADN (Ahrens y Seemüller 1992), la amplificación de fragmentos de ADN de fitoplasmas y la utilización de iniciadores específicos que han contribuido con importantes investigaciones con estos patógenos (Deng y Hiruki, 1991a; Lee *et al.*,

1993; Gundersen y Lee, 1996). El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de fitoplasmas en *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' con sintomatología de fasciación mediante métodos directos como indirectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio del Posgrado de Fitosanidad - Fitopatología y el laboratorio del Posgrado de Recursos Genético y Productividad-Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Material vegetal

Para determinar la presencia de fitoplasmas de forma indirecta, mediante remisión de síntomas, se utilizaron ápices de plantas con síntomas de fasciación multiplicadas *in vitro*. Para la prueba directa por PCR, se utilizaron raíces, hojas y tallos de plantas con fasciación evidente y plantas sin presencia de síntomas, obtenidas de los invernaderos del Colegio de Postgraduados, campus Montecillos, Texcoco en el estado de México.

Prueba de remisión de síntomas

Para la prueba de presencia de fitoplasmas mediante remisión de síntomas, se utilizaron ápices de plantas sintomáticas multiplicadas *in vitro*, los cuales fueron colocados en medio Murashige y Skoog (MS) (cuadro 1) para mantener las necesidades nutricionales de las plantas *in vitro*, suplementado con 10, 20, 50, 100, 500, 1000 ppm de tetraciclina agregada por filtración después de haber esterilizado el medio de cultivo en autoclave durante 18 minutos a 121°C (20 psi). Los ápices permanecieron durante un mes en este medio con el objetivo de reducir la presencia de patógenos. Después los brotes se colocaron en un medio MS sin hormonas, esto para observar si los síntomas se presentaban nuevamente, se hicieron 3 repeticiones con 25 brotes sintomáticos en cada concentración de tetraciclina evaluados.

Cuadro 1 medio de cultivo MS

Tipo de nutriente	Componente	Concentración
Micronutrientes		mM
	NH ₄ NO ₃	20
	KNO ₃	18.8
	MgSO ₄	1.5
	KH ₂ PO ₄	1.25
	Ca(NO ₃) 4H ₂ O	1.5
Micronutrientes		μM
	H ₃ BO ₃	100
	MnSO ₄ 4H ₂ O	100
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	30
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.1
	FeSO ₄ 7H ₂ O	2.72
	EDTA	1
Vitaminas		mg·L ⁻¹
	Inositol	100
	Ácido nicotínico	0.5
	Piridoxina HCl	0.5
	Tiamina HCl	0.1
	Ácido ascórbico	100
Fuente de carbono	Sacarosa	30 g·L ⁻¹
Gelificante	Agar	7 g·L ⁻¹

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de raíces, hojas y tallos de plantas con fasciación evidente y plantas sin presencia de síntomas, obtenidas de los invernaderos del Colegio de Postgraduados, campus Montecillos, Texcoco en el estado de México.

Los tejidos fueron macerados por separado con nitrógeno líquido en mortero estéril, el producto se colocó en un tubo microcentrífuga, la extracción de ADN se hizo con el protocolo propuesto por Ahrens y Seemüller (1992). Al tejido macerado se le agregó un mililitro del enriquecedor de MLO modificado (Kirkpatrick *et al.*, 1987), después se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, se decantó el MLO para dejar solamente el tejido vegetal, se agregó 0.6 mL de CTAB (previamente calentado a 60°C) al tubo con la muestra y se incubó en baño María a 60°C por una hora con agitación en vórtex cada 10 minutos para homogenizar la muestra y promover la lisis celular, posteriormente se agregó 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclando con vórtex, se separaron las fases con centrifugación (14000 rpm por 8 min), se procedió tomando la fase acuosa colocándola en un tubo microcentrífuga, al cual se le adicionó 600 µL de isopropanol frío (se mezcla con suavidad), la muestra se incubó a -20°C durante una hora y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobre nadante dejando solo la pastilla, la cual se secó dejando el tubo boca abajo sobre papel absorbente, la dilución final del ADN se realizó en 20 µL de agua. La concentración y la calidad

del ADN obtenido fueron confirmadas con ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1 000 V 3.2.1).

Detección de fitoplasmas por PCR

La detección de fitoplasmas mediante PCR directa se realizó con los iniciadores universales para fitoplasmas P1 (Deng y Hiruki, 1991b) y P7 (Schneider *et al.*, 1995), que flanquean las regiones génicas del 16S ARNr que generan un fragmento de aproximadamente 1800 pb. La mezcla de reacción de PCR se conformó con un volumen final de 25 μ L, que contenía 1X de amortiguador para PCR (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (BioTecMol), 0.2 mM dNTP's (Promega), 2.5 mM de MgCl₂ (BioTecMol), 0.8 μ M de cada oligo (Invitrogen®), una unidad de ADN polimerasa Amplificasa® (Biogénica) y 200 ng de ADN problema. Se realizó una PCR anidada con los iniciadores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican la región 16S ARNr de los fitoplasmas, se utilizó como molde 1 μ L del ADN producto de la PCR directa diluido en agua destilada estéril [1:20 (v/v)], con las mismas concentraciones de los reactivos de la PCR directa. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Techne® TC-300, iniciando con una desnaturalización de 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 2 min a 55 °C (57 °C para la PCR anidada) y 72 °C durante 3 min, y un paso final de 7 min a 72 °C.

Los productos de amplificación obtenidos (1200 pb) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v) previamente teñido con bromuro de etidio. Se colocaron 5 µL de producto de ADN, el marcador de peso molecular fue de 1Kb (Axygen), la corrida fue con TAE 1X por 1 hora, al finalizar se analizó con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®) con el programa QuantityOne 4.1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Remisión de síntomas

Los explantes que estuvieron en los medios con 10, 20 y 50 ppm de tetraciclina sobrevivieron y presentaron remisión de síntomas, lo cual se relaciona con la disminución del patógeno (Askari *et al.*, 2011), mientras que concentraciones mayores (100, 500, 1000 ppm) fueron letales, la remisión de síntomas duró al menos 3 meses posteriores al tratamiento con el antibiótico, ya que cuando los tejidos se pasaron a un medio de cultivo sin antibióticos hubo persistencia de síntomas, esto también fue observado por Brade *et al.* (2000).

Detección de fitoplasmas por PCR

Mediante la PCR directa realizada con los iniciadores P1/P7 no se detectó la presencia de fitoplasmas en el ADN de ninguno de los tejidos analizados de las plantas con síntomas de fasciación, ni en las plantas que carecían de síntomas. Sin embargo, la PCR anidada (R16F2/R16R2) comprobó la presencia de fitoplasmas, con una amplificación de peso molecular cercano a 1.2 kb cuyo tamaño coincide con el reportado por Lee *et al.* (1993) y Rojas *et al.* (2009). (Figura 1). El fragmento fue detectado en tallo en las tres secciones (superior media e inferior) y en la raíces, tanto en las planta sintomáticas como asintomáticas, en estas plantas el fitoplasma se distribuye de forma amplia, esto se debe a que su distribución es sistémica y a que pueden multiplicarse en células del parénquima que rodea al floema y en células de la zona más externa del sistema vascular (Siller *et al.*, 1987).

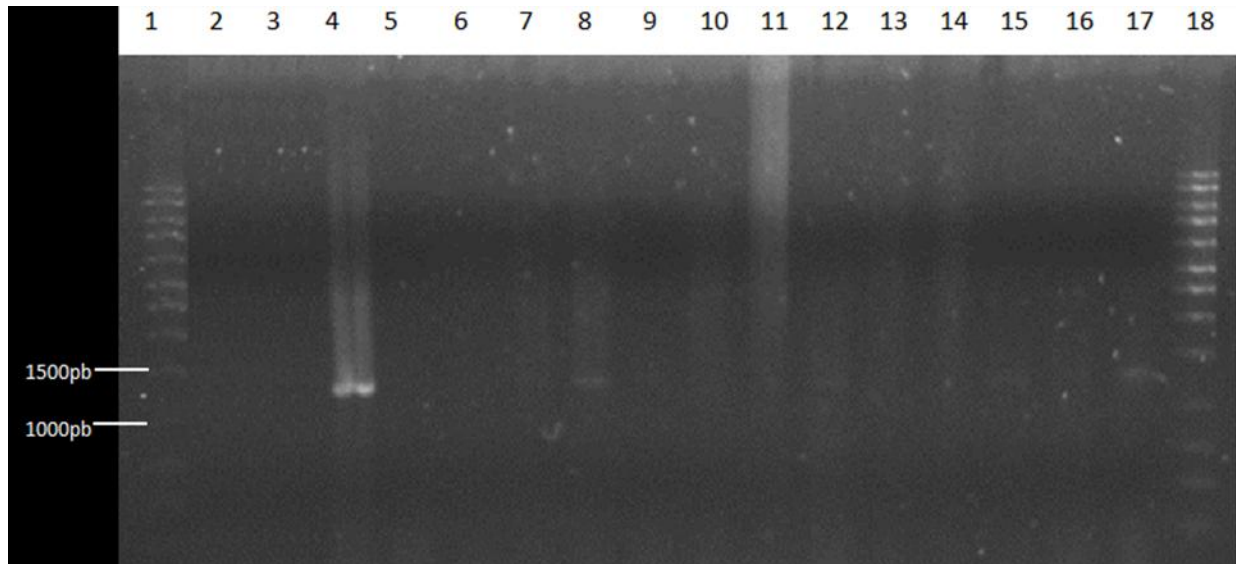


Figura 1.- Amplificación de la región 16S ARNr de fitoplasmas. 1 y 18) marcador de peso molecular (1kb Axygen), 2) control negativo, 3) control positivo PCR directa, 4) Control positivo PCR anidada, 5) hoja de planta 1, 6) tallo sección superior planta 1, 7) tallo sección media planta 1, 8) tallo sección baja y raíz planta 1, 9) hoja de planta 2, 10) tallo sección superior planta 2, 11) tallo sección media planta 2, 12) tallo sección baja y raíz planta 2, 13) hoja de planta 3, 14) tallo sección superior planta 3, 15) tallo sección media planta 3, 16) tallo sección baja y raíz planta 3, 17) planta asintomática (5-17 PCR anidada).

CONCLUSIONES

La PCR anidada con los iniciadores R16F2/R16R2 demostró la presencia de fitoplasmas en tejido de *Echeveria pumila* con síntomas de fasciación, reducción de área foliar y proliferación.

La remisión del síntoma de fasciación en tejidos tratados con las concentraciones 10, 20 ó 50 ppm de tetraciclina, es evidencia de que los fitoplasmas pueden estar relacionados con la inducción del síntoma de fasciación en *Echeveria pumila*.

BIBLIOGRAFÍA

Ahrens U and E Seemüller (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Andreu R C M y S J R Gómez (2007) La Sanidad Vegetal en la Agricultura Sostenible. Cuba. Fejoo. Pp: 410-412

Askari N, G Salehi Jouzani, M Mousivand, A Foroutan, A Hagh Nazari, S Abbasalizadeh, S Soheilvand, and M Mardi (2011) evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches' broom disease using real-time PCR, *Journal Microbiology Biotechnol.* 21: 81–88

Brade B G, W Preil, and H Jeske (2000) remission of the free-branching pattern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment, *Journal Phytopathology* 148, 587±590

Davis R E, R F Whitcomb, R L Steere (1968) Remission of aster yellows disease by antibiotics. *Science* 161: 793-795.

Deng S, and C Hiruki (1991a) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14: 53-61.

Deng S and Hiruki C (1991b) Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81:1475-1479.

Gundersen D E, and I M Lee (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterranea* 35: 144-151.

Kirkpatrick B C, T J Stenger and A H Purcell (1987) Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism, *Science* 238:197-200.

Lee R F (1987) Chemotherapy of cherry buckskin and peach yellow leafroll diseases: an evaluation of two tetracycline formulations and methods of application. *Plant Dis.* 71: 119-121.

Lee I M, R Hammond and D E Gundersen-Rindal (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

Liao C H and T A Chen (1981) In vitro susceptibility and resistance of two spiroplasmas to antibiotics. *Phytopathology* 71, 442±445.

Meyrán G J y C L López (2003) Las Crasuláceas de México. Sociedad Mexicana de Cactología, A.C. México D.F

Murashige T and F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

OIRSA (2005) Manual técnico de fitosanidad en plantas ornamentales y follajes. El Salvador: OIRSA.

Pirone P P (1978) Diseases and pests of ornamental plants. 5th ed. John Wiley and Sons. NY.

Punja Z K, S H D Boer, H Sanfaçon (2007) Biotechnology and plant disease management. CAB International, London, England

Rojas-Martínez, R I, E Zavaleta-Mejía, I M Lee, A Aragón-García, (2009) Identification of an isolate from group 16srIII, *Candidatus Phytoplasma pruni* in plants and seeds of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) in México, *Agrociencia* 43: 851-860.

Sajeva M, and M Costanzo (1994) Succulents, the illustrated dictionary. Cassell plc, Villiers House, London, UK.

Schneider B, E Seemüller, C D Smart, B C Kirkpatrick (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp.369-379. In: S. Razin, and J.G. Tully (eds.). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol. I. Academic Press, New York, USA. 483 p.

Siller W, R Kuhbandner, R Marwitz, H Petzold, and E Seemüller (1987) Occurrence of mycoplasma-like organism in parenchyma cell of *Cuscuta odorata* (Ruiz et Pav). Journal Phytopathol. 119: 147-159.

CAPITULO II

DETECCIÓN DE BACTERIAS INVOLUCRADAS EN LA SINTOMATOLOGÍA DE FASCIACIÓN EN *Echeveria pumila* cv. 'Glauca'

RESUMEN

Echeveria pumila cv. 'Glauca', es una crasulácea ornamental mexicana con gran aceptación comercial debido a sus características llamativas y al poco mantenimiento que requiere. Algunos de los especímenes presentan síntomas de fasciación, reducción del área foliar y proliferación, etiología desconocida hasta la fecha y que son síntomas similares que se presentan en otras especies infectadas por bacterias como *Rhodococcus fascians*. El objetivo del presente estudio fue la de determinar la presencia de bacterias en plantas sintomáticas y asintomáticas *in vitro* de *E. pumila* mediante PCR con iniciadores universales para bacterias (27f y 1492r) que amplifican la región 16S ARNr y obtener la secuenciación del fragmento obtenido. Se amplificó un fragmento de alrededor de 1500 pb que fue secuenciado y comparado con las secuencias de las regiones de 16S ARNr de diversas bacterias, generando así un árbol filogenético del organismo encontrado en los tejidos de la *Echeveria pumila*.

Palabras clave: *In vitro*, crasulácea, bacteria, fasciación.

ABSTRACT

Echeveria pumila cv. 'Glaucá', is a mexican ornamental crasulacea with great commercial acceptance due to its striking features and maintenance requirements. Some of the specimens exhibit symptoms of fasciation, leaf area reduction and proliferation, unknown etiology to date and are similar symptoms that occur in other species infected by bacteria such as *Rhodococcus fascians*, The aim of this study was to determine the presence of bacteria in symptomatic and asymptomatic plants *in vitro* *E. pumila* by PCR with universal primers for bacteria (27f and 1492r) that amplify the 16S rRNA region and get sequencing fragment obtained. Was amplified one fragment of about 1500 bp which was sequenced and compared with the sequences of 16S rRNA regions from various bacteria, thus generating a phylogenetic tree found in body tissues *Echeveria pumila*.

Keywords: *In vitro*, crasulácea, bacteria, fasciation.

INTRODUCCIÓN

Echeveria pumila cv. 'Glaucá', perteneciente a la familia Crassulaceae, es originaria de México (Meyrán, 2003), Esta planta ornamental tiene una buena aceptación mundial siendo una de las plantas más vendidas, lo cual le da una importancia económica considerable. En varios de los especímenes de esta especie se han presentado síntomas de fasciación, proliferación y reducción del área foliar (figura 1) estos síntomas son similares a los que se presentan en otras especies por la acción de *Rhodococcus fascians* (Norimoto *et al.*, 1980).

Existen bacterias con la capacidad de cambiar drásticamente el aspecto de las plantas cuando se encuentran infectándolas, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*, es una bacteria que causa en las plantas dicotiledóneas tumores conocidos como "agallas" o "tumores del cuello", que crecen en la zona donde se unen la raíz y el tallo (Kupila-Ahvenniemi and Therman, 1968).

Rhodococcus fascians causa síntomas de fasciación o escoba de bruja en plantas dicotiledóneas, esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de la dominancia apical en la planta y el crecimiento de las yemas laterales, lo que da lugar a los síntomas característicos de la escoba de bruja (Roussaux, 1965). *Rhodococcus fascians* al infectar *Arabidopsis thaliana* provoca reducción del área

foliar y hojas dentadas, aspecto raquítrico de las partes aéreas de la planta, flores anormales, rosetas múltiples e inflorescencias (Vereecke *et al.*, 2000; de O. Manes *et al.*, 2004). Otro efecto de la infección con *R. fascians* es la persistencia de los cotiledones, incluso después de que las plantas han florecido (Oduro y Munnecke, 1975).

R. fascians produce estos síntomas debido en parte a cambios en las concentraciones internas de fitohormonas como las citoquininas (Pertry *et al.*, 2009). Se ha demostrado actividad epigenética detrás de este aumento de hormonas (Depuydt *et al.*, 2008) y es una bacteria epífita pero puede establecerse también de forma endófito (Goethals *et al.*, 2001).

Para la detección de bacterias endófitas, se requiere de técnicas moleculares como lo son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lane, 1991; Sritharan y Barker, 1991) y se ha logrado la clonación y secuenciación (Ruimy *et al.*, 1994). Entre estas la PCR es la más usada para su detección debido a que es sensible y rápida. Por otro lado, la secuenciación es una técnica que se ha utilizado también para determinar la identidad de la bacteria.

El análisis de secuencia de fragmentos como 16S ARNr, al ser comparadas con la misma región de diversos organismos genera información que nos ayuda a

determinar las relaciones y distancias filogenéticas entre estos organismos. Se han hecho diversos estudios sobre las distancias genéticas de bacterias que producen síntomas de fasciación y reducción del área foliar. Los estudios de filogenia en bacterias a partir de las regiones ARNr son amplios se podría mencionar los estudios de Ruimy *et al.* en 1994 y 1995 realizados con *Corynebacterium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de biología molecular del Posgrado de Fitosanidad - Fitopatología, Campus Montecillo.

Material vegetal

Se utilizaron plantas sintomáticas con tallo aplanado (fasciación) y con disminución del tamaño de las hojas, así como plantas asintomáticas de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca', obtenidas del laboratorio de cultivo *in vitro* de frutales en las instalaciones del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo (Figura 1).

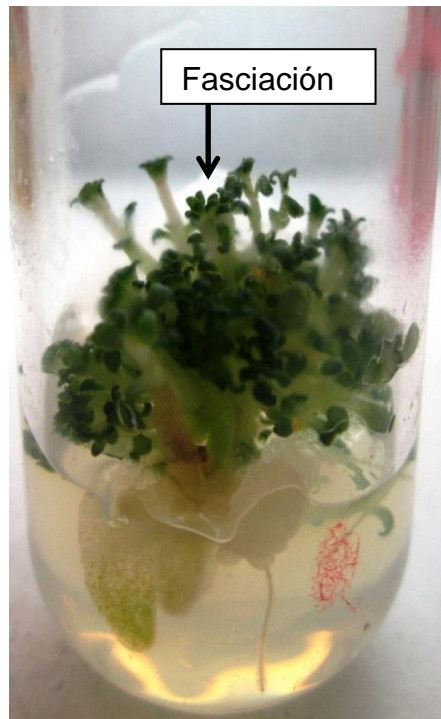


Figura 1.- plántula *in vitro* de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca' con síntomas de fasciación, reducción del área foliar y proliferación.

Extracción de ADN

La extracción ADN se realizó mediante el protocolo propuesto por Ahrens y Seemüller (1992), a partir de tallos de plantas con síntomas de fasciación evidente y plantas sin presencia de síntomas, obtenidas de cultivo *in vitro* previo. Por su

reducido tamaño, los tejidos fueron colocados por separado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, al cual se le agregó un mililitro del enriquecedor de MLO modificado (Kirkpatrick et al, 1987), las cuales fueron maceradas en nitrógeno líquido con un macerador mecánico con punta de vidrio esmerilado. La muestra se centrifugo 14000 rpm por 5 minutos precipitando el tejido vegetal, se decantó el MLO para dejar solamente la muestra en el fondo del tubo, se agregó 0.6 mL de CTAB (previamente calentado a 60°C) al tubo con la muestra y se incubó en baño María a 60°C durante una hora, agitando con vórtex cada 10 minutos para homogenizar la muestra y fomentar la lisis celular. Posteriormente se agregaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se mezcló y se centrifugó a 14000 rpm durante 8 min para separar las fases, se tomó la fase acuosa colocándola en un tubo de microcentrífuga (1.5 mL), se le adicionaron 600 µL de isopropanol frío (mezclando con suavidad), y se incubó a -20°C durante una hora, seguido se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Después de ese tiempo, se eliminó el sobre nadante dejando solo el pellet o pastilla, la cual se secó dejando el tubo boca abajo sobre papel absorbente. Por último las pastillas de ADN fueron disueltas en 20 µL de agua libre de ADNasas y ARNasas. La concentración y calidad de las muestras de ADN obtenidas fueron confirmadas con ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1 000 V 3.2.1).

Detección de bacterias por PCR

La detección de bacterias mediante PCR se realizó con los iniciadores universales para bacterias 27f (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG) y 1492r (TAC GGA TAC CTT GTT ACG ACT T) (Lane, 1991), que flanquean las regiones génicas del 16S ARNr que generan un fragmento de aproximadamente 1500 pb. La mezcla de reacción de PCR con volumen final de 25 μ L, que contenía 1X de amortiguador para PCR (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (BioTecMol), 0.2 mM dNTP's (Promega), 1.5 mM de $MgCl_2$ (BioTecMol), 20 pmol ambos iniciadores (Invitrogen[®]), una unidad de ADN polimerasa Amplificasa[®] (Biogénica) y 200 ng de ADN problema. Se realizó una PCR anidada con los iniciadores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican la región 16S ARNr de los fitoplasmas, se utilizó como molde 1 μ L del ADN producto de la PCR directa diluido en agua destilada estéril [1:20 (v/v)], con las mismas concentraciones de los reactivos de la PCR directa. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Techne[®] TC-300, iniciando con una desnaturalización de 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 2 min a 55 °C (57 °C para la PCR anidada) y 72 °C durante 3 min, y un paso final de 7 min a 72 °C.

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v) previamente teñido en bromuro de etidio, se colocaron 5 μ L de producto de ADN, el marcador de peso molecular fue de 1Kb

(Axygen), la corrida fue con TAE 1X por 1 hora, al finalizar se analizó con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®) con el programa QuantityOne 4.1.1.

Secuenciación y análisis del gen 16S rARN

El producto de PCR anidada se purificó con la utilización de un kit comercial (Wizard Promega®) y fue secuenciado (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Applied Biosystem®), estas secuencias pertenecientes a la región 16S ADN se compararon con las encontradas en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

El análisis filogenético de la región 16S ARNr obtenido del ADN total de las plántulas *in vitro* de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' con síntomas de fasciación y asintomáticas, fueron alineados utilizando el programa Mega 5.10 (5121019), utilizando el método de máxima parsimonia comparando la secuencia con las obtenidas mediante el BLAST. Además de la integración de secuencias 16S ARNr de organismos que ocasionan síntomas de fasciación como lo son los fitoplasmas y *Rhodococcus fascians*, de esta forma el fragmento presente en plantas se comparó con una diversidad de otros organismos (bacterias, fitoplasmas y bacterias no cultivables).

Electroforesis

La electroforesis se realizó con en un gel agarosa al 1.2 % (p/v) previamente teñido en bromuro de etidio, el marcador de peso molecular fue de 1Kb (Axygen), la corrida fue con TAE 1X por 1 hora, al finalizar se analizó con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®) con el programa QuantityOne 4.1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN

Mediante el protocolo de extracción de ADN previamente descrito se obtuvieron concentraciones de ADN de aproximadamente $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ o superiores, lo cual es una cantidad considerable teniendo en cuenta lo reducido del tejido base; se obtuvo ADN con una pureza aceptable de las muestras, confirmado con ayuda de un espectrofotómetro (Cuadro 1) La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1%.

Cuadro1.- concentraciones (ng·L⁻¹) y absorbancia de un lote de nueve muestras de ADN total obtenido de plantas con síntomas de fasciación.

Número de muestra	ADN obtenido ng·L ⁻¹	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
1	162.71	2.01	0.30
2	180.51	1.94	0.46
3	111.68	2.05	0.60
4	181.54	1.92	0.47
5	136.71	2.08	0.87
6	171.85	1.78	0.58
7	150.03	1.78	0.87
8	270.02	1.96	0.93
9	98.89	2.02	0.80
10	115.92	2.01	0.50

Detección de bacterias por PCR

La detección de bacterias mediante PCR en plántulas cultivadas *in vitro* de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' con síntomas de fasciación y asintomáticas, indicó la presencia de bacterias mediante la amplificación de un fragmento de 1500 pb (Figura 2) en los tejidos de plantas con síntomas y plantas asintomáticas.

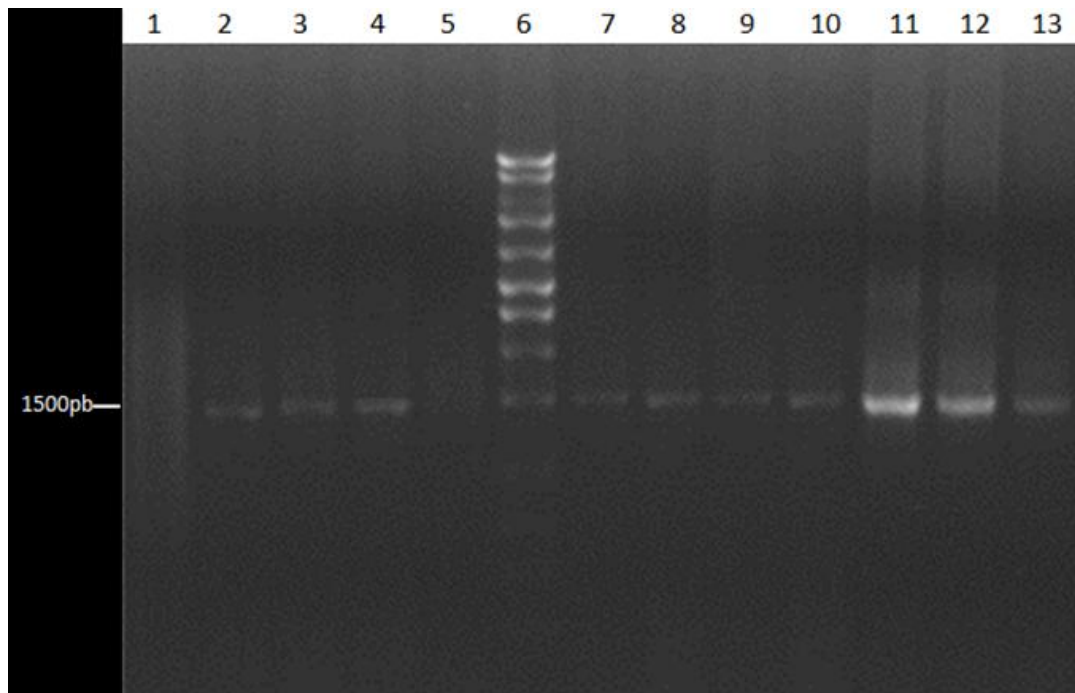


Figura 2.- Gel de agarosa con las muestras de PCR a partir de plantas *in vitro*: 1) Control negativo, 2) Control positivo, 3-5) plantas asintomáticas, 6) marcador molecular (Axygen 1kb), 7-13) plantas sintomáticas.

Análisis de secuencia

La comparación de la secuencia obtenida mediante la PCR para bacterias a partir del ADN total de plantas (Se obtuvo una secuencia consenso de 1258 pb) (Cuadro 2), con las secuencias depositadas en el GenBank mostró 98% de similitud con un gran número de bacterias no cultivables. En el árbol filogenético construido se puede observar la similitud que tiene la secuencia obtenida, con

otras secuencias de bacterias no cultivables además de ver la distancia que tiene ésta comparándola con las regiones 16S ARNr de fitoplasmas y *Rhodococcus*. Lo anterior podría sugerir la posibilidad de ser un organismo no reportado anteriormente ya que las secuencias más similares son bacterias no cultivables y los patógenos que producen síntomas de fasciación no presentan similitud en estas regiones (Figura 3).

Cuadro 2.- Secuencia de la región 16S ARNr amplificado con los iniciadores para bacterias en tejido de *E. pumila*.

Secuencia del fragmento obtenido a partir de la amplificación de genes universales para bacterias

5-3' GTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAACCTGCCCTTGGGA -42
GGGGAACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCCCGTAGGCT
GAGGAGCAAAGGAGGAATCCGCCCGAGGAGGGGCTCGCGTC
TGATTAGCTAGTTGGTGGGGCAATAGCTTACCAAGGCGATGAT
CAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACACTAGGACTGAG
ACACGACCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTC
CGTGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGGAGGTAGA -297
AGGCCACGGGTCATGAACTTCTTTTCCCGGAGAAGAAGCAAT
GACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTG

GGCGTAAAGCGTCTGTAGGTGGCTTTTTAAGTCCGCCGTCAA
TCCCAGGGCTCAACCCTGGACAGGCGGTGGAACTACCAAGC
TGGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTTCCGGTGGAGCGGTG -553
AAATGCGTAGAGATCGGAAAGAACACCAACGGCGAAAGCACTC
TGCTGGGCCGACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGAG
CGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATG
GATACTAGGCGCTGTGCGTATCGACCCGTGCAGTGCTGTAGCT
AACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC -809
ATGTGGTTTAATTCGATGCAAAGCGAAGAACCTTACCAGGtCTT
GACATGCCGCGAATCCTCTTGAAAGAGAGGGGTGCCTTCGGG
AACGCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCC
GTAAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTG
TTTAGTTGCCACCATTGAGTTTGGAAACCCTGAACAGACTGCCG
GTGATAAGCCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCATCATG -1066
CCCCTTATGCCCTGGGCGACACACGTGCTACAATGGCCGGGA
CAAAGGGTCGCGATCCCGCGAGGGTGAGCTAACCCCAAAAAC
CCGTCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAA
GCCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCATACGGCGGTGA
ATTCGTTCCCGGGCCTTGTACAC -1258

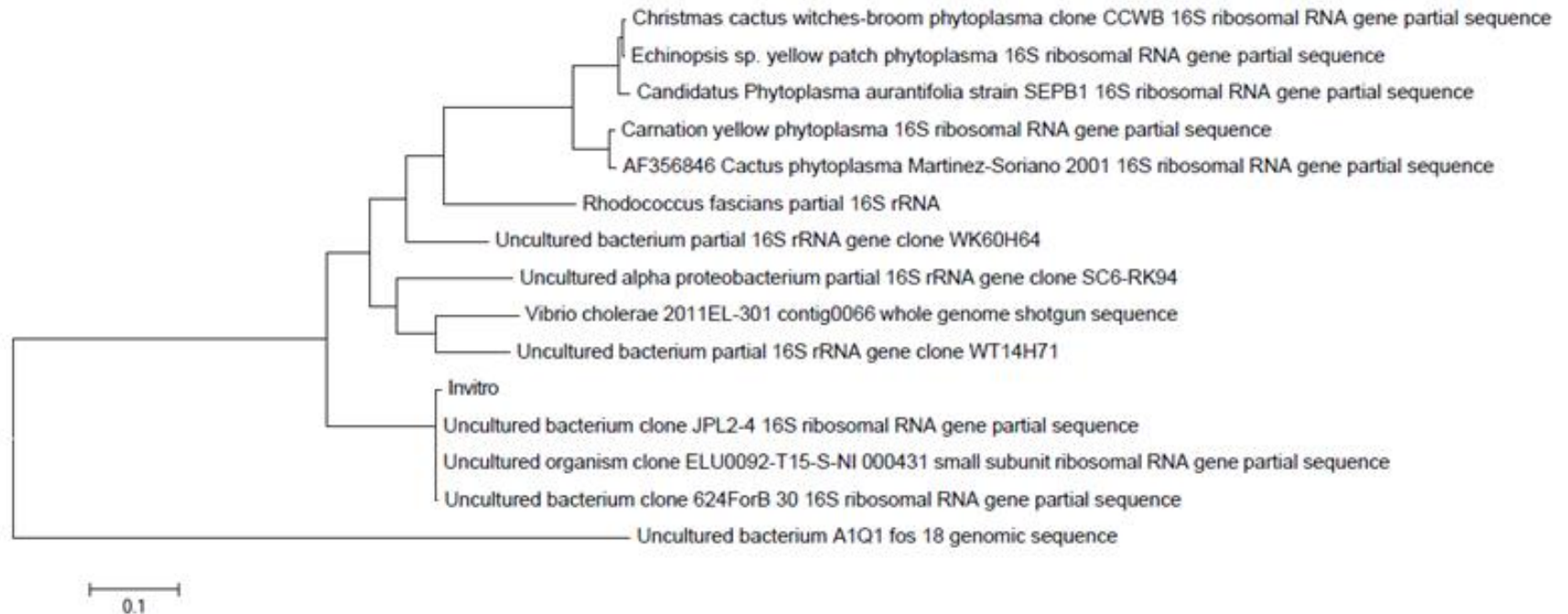


Figura 3.- Dendrograma de la región 16S ARNr de la bacteria encontrada en *E. pumila* comparado con secuencias afines y con secuencias de patógenos que provocan síntomas de fasciación. La secuencia referida como Invitro, representa a la secuencia de estudio obtenida de los tejidos *E. pumila* mediante PCR con los iniciadores 27f y 1492r.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de bacteria en tejidos de *E. pumila* con síntomas de fasciación proveniente de cultivo *in vitro*.

Se secuenció la región 16S ARNr de la bacteria detectada con los iniciadores universales, con dicha secuencia se elaboró un árbol filogenético que mostró relación cercana con bacterias no cultivables

BIBLIOGRAFÍA

Ahrens U, E Seemüller (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Dees P M, Ghiorse W C (2001) Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA FEMS *Microbiology Ecology* 35 pp 207-216.

de O. Manes C-L, T Beeckman, T Ritsema, M Van Montagu, K Goethals, M Holsters (2004) Phenotypic alterations in *Arabidopsis thaliana* plants caused by *Rhodococcus fascians* infection. *Journal of Plant Research* 117: 139–145

Depuydt S, K Doležal, M Van Lijsebettens, T Moritz, M Holsters, and D Vereecke (2008) Modulation of the Hormone Setting by *Rhodococcus fascians* Results in Ectopic KNOX Activation in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 146: 1267–1281.

Goethals K, D Vereecke, M Jaziri, M Van Montagu, and M Holsters (2001) Leafy gall formation by *rhodococcus fascians* *Annual Review of Phytopathology* 39: 27-52.

Kirkpatrick B C, T J Stenger, A H Purcell (1987) Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism, *Science* 238:197-200.

Kupila-Ahvenniemi S, E Therman (1968) Morphogenesis of crown gall. *Adv Morphog* 7: 45-78.

Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), John Wiley and Sons, Chichester. pp. 115-147

Meyrán G J (2003) Las crasuláceas de México. México. Sociedad mexicana de cactología A.C pp: 123-183

Norimoto M, F Skoog, M E Doyle, and R S Hanson (1980) Relationships between cytokinin production, presence of plasmids, and fasciation caused by strains of *Corynebacterium fascians*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA Microbiology* 77-1: 619-623.

Oduro K A (1975) Factors affecting epidemiology of bacterial fasciation of *Chrysanthemum maximum*. *Phytopathology* 65: 719-721.

Pertry I, K Václavíková, S Depuydt, P Galuszkad, L Spíchal, W Temmerman, E Stes, T Schmülling, T Kakimoto, M C E Van Montagu, M Strnad, M Holsters, P Tarkowski, and D Vereecke. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106-3: 929-934

Rohwer F, M Breitbart, J Jara, F Azam, N Knowlton (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*, *Coral Reefs* 20: pp 85-89

Roussaux J (1965) Etude preliminaire des modifications induites chez le pois express Alaska par le *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson, *Revue générale de Botanique* 72 pp 21-53.

Ruimy R, V Breittmayer, P Elhaze, B Lafay, O Boussemart, M Gauthier and R Christen (1994) A general phylogenetic analysis of the family Vibrionaceae (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*) deduced from the comparison of nearly

complete 16S rRNA sequences, International Journal of Systematic Bacteriology 44:416-426.

Ruimy R, P Riegel, P Boiron, H Monteil and R Christen (1995) Phylogeny of the Genus *Corynebacterium* Deduced from Analyses of Small-Subunit Ribosomal DNA Sequences, International journal of systematic bacteriology, 45-4: 740-746

Sritharan V and R H Barker (1991) A simple method for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. Molecular and Cellular Probes 5:385-395.

Vereecke D, S Burssens, C Simón-Mateo, D Inzé, M Van Montagu, K Goethals, M Jaziri (2000) The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* 210: 241–251

CAPITULO III

OBTENCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Echeveria pumila* cv. 'Glauca' LIBRES DE BACTERIAS Y FITOPLASMAS

RESUMEN

Echeveria pumila cv. 'Glauca' pertenece a la familia *crassulaceae*, es nativa de México y tiene gran importancia económica como ornamental. Recientemente esta especie presenta síntomas de fasciación con reducción del área foliar, síntomas que han sido asociados a fitoplasmas y/o bacterias en otras especies de plantas. El objetivo del presente estudio fue evaluar y establecer un protocolo para la obtención *in vitro* de plantas libres de estos patógenos mediante micropropagación de la especie por cultivo de ápices de plantas con y sin síntomas de fasciación. Se desarrollaron dos metodologías utilizando embriogénesis somática a partir de hojas jóvenes y la extracción de meristemas de los brotes regenerados *in vitro*. Durante la multiplicación de ambas líneas de cultivo (sintomáticas y asintomáticas), se evaluó la combinación de bencil adenina $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BA) más ácido naftalén acético $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ANA) y tres concentraciones de thidiazuron (TDZ) (0.1 , 0.2 y $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sin la presencia de ANA. Todos los medios se suplementaron con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico y el pH se ajustó a 5.7, antes de la esterilización con autoclave. Se logró el establecimiento del 50% de los ápices de ambas líneas de cultivo, debido principalmente a problemas de oxidación y contaminación. En los explantes asintomáticos, el medio con TDZ ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) fue el que generó el mayor número de brotes

por explante (B/E) con 2.5, mientras que los explantes con síntomas en el medio con BA y ANA produjeron una media de 3.6 B/E. Durante todos los subcultivos se observó que los brotes con síntomas presentaron la mayor tasa de multiplicación, en comparación con los brotes asintomáticos. Además los síntomas se siguieron manifestando en todos los subcultivos bajo condiciones *in vitro*. Hubo formación de nódulos embriogénicos a partir de las hojas. Sin embargo, nunca se observaron etapas subsecuentes de desarrollo de los embriones ni germinación. Fue posible obtener plantas libres de patógenos mediante la combinación de antibióticos, etiolación y posterior extracción de meristemos de los brotes regenerados *in vitro* de ambas líneas. Estos resultados fueron comprobados mediante PCR, para fitoplasmas se realizó una PCR directa con los iniciadores P1 - P7 y una PCR anidada R16F2 y R16R2, en el caso de bacterias se utilizaron los iniciadores universales 27f y 1492r. Los resultados indicaron que el 90% de los brotes estuvieron libres de bacterias y fitoplasmas.

Palabras clave: thidiazuron, embriogénesis somática, meristemos, tetraciclina, patógenos endófitos

ABSTRACT

Echeveria pumila cv. 'Glaucá' belongs of the crassulaceae family, is native of Mexico and has great economic importance as an ornamental. Recently this species has symptoms of fasciation with reduction in leaf area, symptoms that have been associated with phytoplasmas and/or bacteria in other plants species. The objective of this study was to evaluate and establish a protocol for *in vitro* production of pathogen-free plants by species micropropagation by growing tips of plants with and without symptoms of fasciation. Two methodologies were developed using somatic embryogenesis from young leaves and meristems extraction of shoot regenerated *in vitro*. During the multiplication both cultivation lines (symptomatic and asymptomatic), were tested the combination of benzyl adenine $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BA) more naphthalene acetic acid $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (NAA) and three concentrations of thidiazuron (TDZ) (0.1 , 0.2 and $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) without the presence of ANA. All media were supplemented with $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of citric acid and the pH was adjusted to 5.7 before autoclaving. Was achieved the establishment of 50% of the apices of both lines of crop, mainly due to problems of oxidation and contamination. In asymptomatic explants, the medium with TDZ ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was the one that generated the highest number of shoots per explant (B/E) with 2.5, while the symptoms explants with medium with BA and NAA produced an average of 3.6 B/E During all subcultures was observed that outbreaks with symptoms had the highest rate of multiplication, compared to asymptomatic outbreaks. Besides the symptoms continued to express in all subcultures under *in vitro* conditions. There was the formation of embryogenic nodules from the leaves. However, never were observed subsequent developmental-stages of embryos and germination. It was possible to obtain

pathogen free plants by combining antibiotics, etiolation and subsequent meristems extraction of shoot regenerated *in vitro* of both lines. These results were verified by PCR, for phytoplasmas was performed direct PCR with primers P1 - P7 and a nested PCR R16R2 and R16F2, in the case of bacteria are used the universal primers 27f and 1492r. The results indicated that 90% of the outbreaks were free of bacteria and phytoplasmas.

Keywords: thidiazuron, phytoplasma, somatic embryogenesis, meristem, tetracycline, endophytes pathogens

INTRODUCCIÓN

El género *Echeveria*, perteneciente a la familia *Crassulaceae*, es originario de México y lo que hace llamativo a este género es la filotaxia en espiral. Son plantas perennes, con raíces fibrosas, tallos simples o ramificados, con inflorescencia lateral o axilar, presenta floración a mediados de verano con brácteas debajo de cada flor (Meyrán, 2003). Las hojas son obovado-cuneadas de color azul-verdoso o gris, ápices redondeados y mucronados (Sajeva y Costanzo, 1994). Su propagación comercial es mediante rizomas, esquejes e hijuelos, lo que favorece la transmisión de patógenos de plantas madres a hijas.

En el cultivo de esta ornamental se ha observado que algunos especímenes presentan síntomas de fasciación con área foliar reducida, inflorescencias con menor longitud de tallo y proliferación. Estos síntomas en otras especies de plantas han sido asociados con bacterias y fitoplasmas como posibles agentes causales (Andreu y Gómez 2007) y se han relacionado con cambios endógenos de fitohormonas (Nicolaisen y Horvath 2008; Pertry et al. 2009; Musetticabi, 2010).

Los fitoplasmas son procariontes carentes de pared celular que se encuentran confinadas al floema y están asociados con cientos de enfermedades en las plantas. Estos microorganismos aún no se han podido cultivar *in vitro*, por lo que su fisiología y la interacción con el hospedante permanece sin conocerse completamente (Punja y Boer

2007). Existen varios métodos para detectar e identificar fitoplasmas y bacterias: Mediante la sintomatología que inducen en la planta, microscopía electrónica y por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIRSA, 2005). Gracias a los métodos para la amplificación génica (Deng y Hiruki, 1991a) y la preparación de iniciadores selectivos para ADN de fitoplasmas (Sears *et al.*, 1989), se ha logrado determinar la presencia de patógenos en síntomas putativos a ellos.

Se ha probado la remisión de los síntomas de fitoplasmas, como un método indirecto de detección, usando antibióticos como la tetraciclina, ésta es conocida por su efecto bacteriostático con micoplasmas, fitoplasmas y spiroplasmas (Davis *et al.*, 1968; Liao y Chen, 1981;). Sin embargo, en la mayoría de los caso cuando los tejidos dejan de tener contacto con el antibiótico vuelven a presentar los síntomas (Brade *et al.*, 2000).

El presente estudio tuvo como objetivo micropropagar plantas de *Echeverria* con síntomas de fasciación y desarrollar una metodología para obtener material vegetativo libre de bacterias y fitoplasmas agentes causales de la fasciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material vegetal.

Se utilizaron plantas de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' con síntomas de tallo aplanado (fasciación) y disminución del tamaño de las hojas, así como plantas asintomáticas, obtenidas de las instalaciones del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo y del Instituto de Investigaciones de Plantas Nativas de México, de la Universidad de Puebla. Todos los ejemplares se mantuvieron en condiciones de invernadero como plantas donadoras en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Desinfestación y establecimiento *in vitro* de material vegetal

Durante los meses de primavera se seleccionaron dos tipos de tejidos para iniciar los cultivos *in vitro*: 1) ápices de 0.5 cm para la regeneración de brotes y 2) hojas jóvenes para la inducción de embriogénesis somática.

De las plantas madre con y sin síntomas, se tomaron brotes de al menos 7 cm de largo. En el laboratorio, los brotes se lavaron con jabón frotando con la ayuda de un cepillo fino y se lavaron con agua de la llave tres veces. Antes de colocar los ápices en el medio de cultivo,

estos se desinfectaron, mediante etanol al 70 % e hipoclorito de sodio (producto comercial) al 30 %; se evaluaron dos tiempos de inmersión en estas soluciones. En el caso de la primera, los tiempos fueron de 30 y 60 s y para el cloro los tejidos se mantuvieron en inmersión durante 15 y 20 min. Por último el material se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Los ápices se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado al sustituir el cloruro de calcio por nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1.5 mM. En esta etapa no se utilizaron reguladores de crecimiento para evitar posible estrés y afectar la respuesta del tejido durante el establecimiento que fue de 15 días.

Establecimiento de hojas para producción de embriones somáticos

Se cortaron porciones de tejido de 1 cm^2 de las hojas y se tomaron las secciones del ápice, parte media y de la base de la hojas. Con estos tipos de explante se hicieron dos grupos para evaluar la posición de la hoja en el medio (la mitad con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo y la otra con el lado adaxial). Durante la fase de inducción, se colocaron los explantes en placas Petri de 9 cm de diámetro, que contenían 20 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) probando tres concentraciones 2, 3 y $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En este medio los explantes estuvieron en oscuridad a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ durante cuatro semanas en el cuarto de incubación. Después de ese tiempo se llevó a cabo la segunda fase de inducción transfiriendo los tejidos a un medio fresco MS suplementado con $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido naftalén acético (ANA), $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bencil

amino purina (BA) y $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de caseína hidrolizada durante diez semanas (Arellano *et al.*, 2009). Posteriormente los explantes fueron transferidos a un medio similar, reduciendo la concentración de ANA y BA a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en esta fase los cultivos duraron cuatro semanas y fueron expuestos a 16 h de fotoperiodo a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la siguiente etapa de expresión embriogénica los explantes se transfirieron a medio base similar, sin reguladores del crecimiento y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de luz y temperatura con subcultivos cada cuatro semanas. Un total de 20 placas Petri por tipo de explante fueron usadas.

Para evitar oxidación, todos los medios fueron suplementados con 3 % de sacarosa (p/v), $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de piridoxina, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, 0.6 % (p/v) de agar agar ([®]Merck) y ácido ascórbico ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). El pH del medio se ajustó a 5.7, antes de ser esterilizado en autoclave durante 18 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ (20 psi). Los cultivos se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas proporcionado por lámparas fluorescentes Phillips de 34 watts dando una intensidad luminosa de $47.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y controlado automáticamente.

Multiplicación *in vitro*

Los ápices que no presentaron oxidación o contaminantes pasaron a la fase de multiplicación, en el mismo medio MS suplementado con diferentes fitoreguladores, y se realizaron los siguientes tratamientos: 1) 0.2 mg·L⁻¹ bencil adenina (BA) más ácido naftalén acético (ANA) 0.02 mg·L⁻¹, 2) thidiazuron (TDZ) en concentraciones 0.1, 0.2 y 0.6, mg·L⁻¹, sin la presencia de ANA, tanto ápices con síntomas como asintomáticos, se consideraron tres repeticiones con 25 explantes para cada tratamiento. Los ápices se incubaron en estos medios durante dos meses, reemplazando el medio cada mes para evitar la escasez de alguno de los nutrientes y las condiciones fueron las mismas que se utilizaron en la etapa de establecimiento.

Estudio anatómico de masas proembriogénicas.

Al finalizar el cultivo de las hojas, se hicieron cortes histológicos, de las masas proembriogénicas y hojas con masas de 10 mm de diámetro, los explantes se fijaron en FAA (normal de uso histológico vegetal) diluido en 50 % en buffer de fosfatos (pH 6.5) por 24 h. Se transfirieron a glicerol 45 %, alcohol etílico 48 % y agua destilada 7 % (GAA) para su preservación mientras se juntaban todas las muestras para su proceso conjunto. Se deshidrataron en ascendente de etanol 8 horas en cada uno, hasta dos cambios de etanol 100% (Berlyn y Miksche, 1976).

La infiltración se realizó con xileno y etanol (1/1), seguido xileno 100 %, seguido se introdujeron las muestras a estufa de calentamiento en parafina dos cambios 62 °C en 12 h en cada una (Berlyn y Miksche, 1976). Se aplicó vacío para mejorar la infiltración y se formaron bloques de parafina. Los cortes se hicieron a 10 µm. (Grosor) con micrótopo rotatorio (American Optical, Modelo 820).

Se tiñó con safranina/verde fijo y se montó con resina sintética, para después observarlos en un microscopio óptico (Zeiss modelo Axiostar Plus).

Análisis estadístico de datos

Durante la multiplicación se evaluó el número de brotes por explante (B/E) y el tamaño del brote mayor. Las evaluaciones se hicieron después de 30 y 60 días. Durante la inducción de embriogénesis y la multiplicación de brotes, se realizaron extracciones de ADN para realizar las pruebas de PCR utilizando iniciadores universales para bacterias y fitoplasmas amplificando la región 16S ARNr para detectar la presencia de ambos patógenos. El experimento de multiplicación fue sometido a un análisis de varianza y para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se utilizó la prueba de separación de medias de Tukey, con un 95% de confianza. Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen x^{1/2}$. Analizados con el paquete estadístico SAS versión 6.1., (SAS, 2002). Las variables usadas están indicadas en la tabla de resultados de cada experimento.

Obtención de plantas libres de patógenos

Para obtener remisión de síntomas de fasciación los brotes sintomáticos multiplicados *in vitro* (figura 1), fueron colocados en medio MS al que se les agregó diferentes concentraciones de tetraciclina (10, 20, 50, 100, 500, 1000 ppm) esto para obtener la remisión de síntomas y la respuesta a las diferentes concentraciones del antibiótico. Los ápices permanecieron durante un mes en este medio con el objetivo de reducir la presencia de patógenos. Posteriormente los brotes se colocaron en un medio MS sin hormonas en condiciones de oscuridad total durante 15 días. Con la ayuda del microscopio estereoscópico se extrajeron los meristemas apicales de 50 brotes elongados (figura 2) y fueron colocados en medio MS con $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bencil adenina, a todos los medios se les agregó $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico, para disminuir la oxidación.

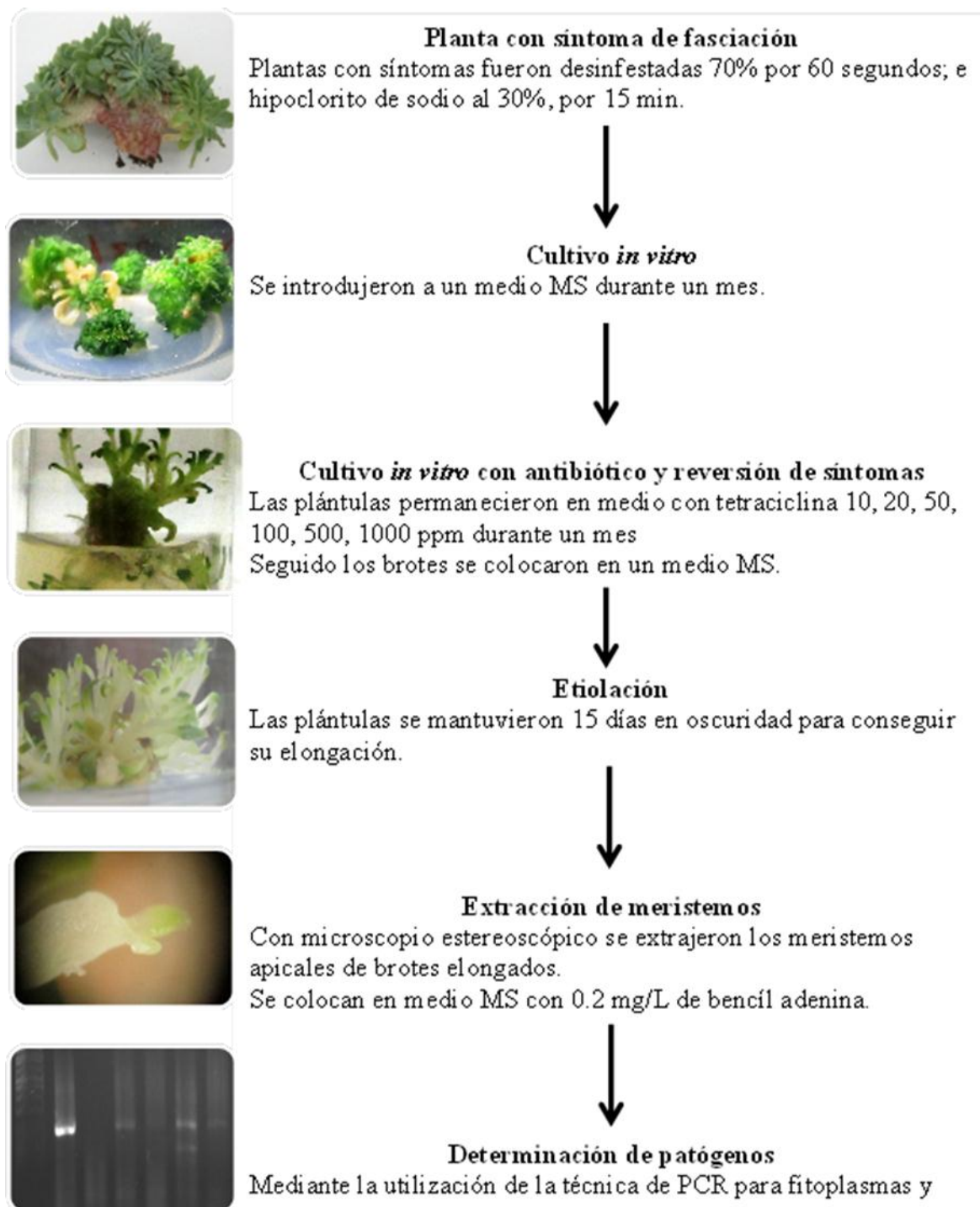


Figura 1.- Esquema de la técnica empleada para la obtención de materia libre de patógenos.

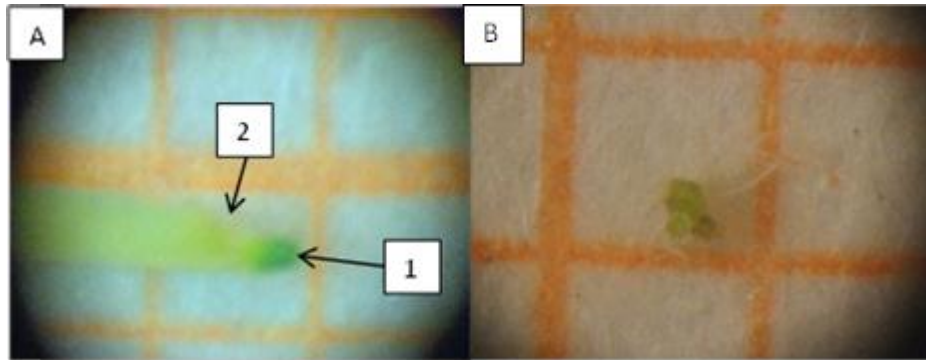


Figura 2.- Tejidos apicales y meristemáticos de *E. pumila* (en papel milímetro con ayuda de microscopio estereoscópico a) ápice elongado 1 primordio foliar, 2 meristemo b) meristemo (0.5 mm).

Extracción de ADN

Para detectar la presencia de patógenos se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para ello se extrajeron: 1) plántulas con síntoma de fasciación evidente, 2) asintomáticas, 3) plántulas resultantes de proceso de obtención de plantas libres de patógenos (35 plántulas), 4) embriones inmaduros (10 muestras conformadas por 10 embriones) y 5) embriones maduros, todo lo anterior proveniente de cultivo *in vitro*. Los primeros dos tejidos se maceraron con nitrógeno líquido en mortero estéril. El producto se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. En el caso de las otras tres muestras, los embriones y los meristemos, debido a su reducido tamaño la maceración se realizó en un tubo microcentrífuga de 1.5 mL con un macerador mecánico con punta de vidrio, los brotes

generados a partir de los meristemas tuvieron más de 0.5 cm de longitud (3 meses) se seccionaron a la mitad para realizar la extracción de ADN de cada brote de forma individual, la extracción de ADN se hizo con el protocolo propuesto por Ahrens y Seemüller (1992), con un mililitro del enriquecedor de micoplasmas (MLO modificado) (Kirkpatrick *et al.*, 1987) agregándose a los tejidos macerados. El pellet o pastilla obtenido se secó a temperatura ambiente, las pastillas de ADN se disolvieron en 20 µL de agua libre ADNasas y ARNasas. La concentración y calidad de las muestras de ADN se determinó con un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1 000 V 3.2.1).

Detección de fitoplasmas por PCR

La detección de fitoplasmas por PCR directa se realizó con los iniciadores universales para fitoplasmas P1 (Deng y Hiruki, 1991b) y P7 (Schneider *et al.* 1995), que flanquean las regiones génicas del 16S ARNr generando un fragmento de 1800 pb. La mezcla de reacción de PCR para volumen final de 25 µL, estuvo compuesta por: 1X de amortiguador para PCR (10X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (BioTecMol), 0.2 mM dNTP's (Promega), 2.5 mM de MgCl₂ (BioTecMol), 0.8 µM de cada iniciador (Invitrogen®), una unidad de ADN polimerasa Amplificasa® (Biogénica) y 200 ng de ADN molde. Se realizó una PCR anidada utilizando 2 µL del ADN producto de la PCR directa diluido en agua destilada estéril [1:20 (v/v)] como molde, en este caso se utilizaron con los iniciadores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican la región 16S ARNr de fitoplasmas, la mezcla de reacción utilizada fue la misma para la PCR directa. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador

Techne® TC-300, iniciando con desnaturalización de 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 2 min a 55 °C (57 °C para la PCR anidada) y 72 °C durante 3 min, y un paso final de 7 min a 72 °C.

Detección de bacterias mediante PCR

La detección de bacterias mediante PCR directa se realizó con los iniciadores universales 27f (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG) y 1492r (TAC GGA TAC CTT GTT ACG ACT T) (Lane, 1991), que flanquean las regiones génicas del 16S ARNr generando un fragmento de 1500 pb. La mezcla de reacción de PCR fue la misma que se utilizó para la detección de fitoplasmas en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador Techne® TC-300, iniciando con una desnaturalización de 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 30 seg a 56 °C y 72 °C durante 1 min, y un paso final de 10 min a 72 °C.

Electroforesis

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v) previamente teñido en bromuro de etidio, se colocaron 5 µL de producto de PCR, como marcador de peso molecular de referencia se utilizó Axygen 1Kb, el amortiguador de

corrida fue TAE 1X la electroforesis se dejó por 1 hora con un 100 volts, al finalizar este tiempo el gel se analizó con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®) con el programa QuantityOne 4.1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfestación y establecimiento de material vegetal.

El mejor tratamiento de desinfestación tanto de los ápices con síntomas y asintomáticos fue con etanol al 70 % por 60 segundos seguido de hipoclorito de sodio (producto comercial) al 30 % durante 15 min. Con este tratamiento se obtuvo el 50 % de supervivencia de los ápices, después de 15 días de incubación en el medio de establecimiento. Durante el proceso de desinfestación con el tratamiento con alcohol al 70% durante 30 segundos, al permanecer menos tiempo los tejidos en alcohol se presentó contaminación por bacterias y hongos: por otra parte, al aumentar el tiempo en hipoclorito de sodio se presentaba oxidación, esto fueron la limitantes del proceso de desinfestación. El primer subcultivo en el medio de cultivo MS posterior a la introducción presento una supervivencia del 90%, en este caso la oxidación fue la causa que algunos ápices no lograran establecerse.

Multiplicación

En la fase de multiplicación, los tejidos generados a partir de material con síntomas, presentaron mayor número de brotes (Cuadro 1 y 2), esto pudo deberse a la mayor concentración de hormonas que algunos autores han observado en los tejidos con síntomas de fasciación en diferentes especies (Nicolaisen y Horvath, 2008; y Pertry et al., 2009; Musetticabi, 2010).

Los explantes con síntomas de fasciación mantuvieron esa característica durante todo el ciclo de cultivo, lo que puede indicar que se mantuvieron los niveles del patógeno *in vitro*.

El medio con TDZ 3 μM produjo en el primer subcultivo el mayor número de brotes con 2.36 brotes por explante (B/E) (Cuadro 1) en ambos tipos de tejidos tanto sintomáticos como asintomáticos. Durante los siguientes subcultivos, en los tejidos con síntomas, el tratamiento con BA y ANA (0.2 y 0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) produjo el mayor número de brotes por explante con 3.6 B/E dato que fue significativo ($p < 0.05$), en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 2) mientras que en los tejidos asintomáticos el TDZ 3 μM mantuvo la mayor producción de brotes por explante con 2.56 B/E.

1 **Cuadro 1.-Número de brotes y tamaño del brote mayor en plantas sintomáticas y asintomáticas durante un**
 2 **mes en los tratamientos, medio sin hormonas (control), medio suplementado con bencil adenina 0.2 mg·L⁻¹ y**
 3 **ácido naftalén acético 0.02 mg·L⁻¹ (BA), thidiazuron (tdz).**

Plantas con un mese de tratamiento

Plantas sintomáticas					
	Control	BA	TDZ (0.5µM))	TDZ (1µM)	TDZ 3µM))
Numero de brotes	1.0833 ± 0.058 cd	2.32 ± 0.0952 ab	2.2963 ± 0.175 ab	2.2222 ± 0.202 ab	2.36 ± 0.207 a
Brote mayor (cm)	0.34583 ± 0.013 bc	0.428 ± 0.021 b	0.40741 ± 0.020 bc	0.60 ± 0.033 a	0.60 ± 0.026 a
Plantas asintomáticas					
Numero de brotes	1.1250 ± 0.068 cd	1.2000 ± 0.082 cd	1.5556 ± 0.123 cd	1.1852 ± 0.093 cd	1.72 ± 0.158 bc
Brote mayor (cm)	0.36667 ± 0.017 bc	0.33200 ± 0.022 c	0.36296 ± 0.016 bc	0.61481 ± 0.0138 a	0.58 ± 0.018 a

4 Los valores son medias de 3 réplicas de 25 explantes cada una, medias con letras distintas entre columnas son
 5 significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

6

7 **Cuadro 2.- Número de brotes y tamaño del brote mayor en plantas sintomáticas y asintomáticas durante**
 8 **dos meses en los tratamientos, medio sin hormonas (control), medio suplementado con bencil adenina 0.2 mg·L⁻¹**
 9 **y ácido naftalén acético 0.02 mg·L⁻¹ (BA), thidiazuron (tdz).**

Plantas con dos meses de tratamiento

Plantas sintomáticas					
	Control	BA	TDZ 0.1	TDZ 0.2	TDZ 0.6
Numero de brotes	1.2083 ± 0.085 e	3.6 ± 0.245 a	2.4444 ± 0.163 bcd	2.5185 ± 0.209 bc	2.44 ± 0.252 bcd
Brote mayor (cm)	0.39583 ± 0.016 d	0.504 ± 0.027 cd	0.50741 ± 0.023 cd	0.65185 ± 0.034 ab	0.676 ± 0.032 a
Plantas asintomáticas					
Numero de brotes	1.3333 ± 0.098 e	1.28 ± 0.091 e	1.5926 ± 0.110 de	1.7778 ± 0.144 cde	2.56 ± 0.217 b
Brote mayor (cm)	0.4 ± 0.022 d	0.556 ± 0.0245 bc	0.4 ± 0.015 d	0.66296 ± 0.022 ab	0.668 ± 0.016 a

10 Los valores son medias de 3 réplicas de 25 explantes cada una, medias con letras distintas entre columnas son
 11 significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Los ápices asintomáticos presentaron mayor número de brotes en los medios complementados con thidiazuron, con la concentración más elevada (ver cuadro 1 y 2), se puede apreciar en los mismos cuadros el contraste de los brotes sintomáticos, ya que, en estos últimos la brotación fue homogénea durante el primer cultivo, en contraste con los resultados que se presentaron en las plantas con síntomas con TDZ y BA para los siguientes subcultivos, ya que el tratamiento con BA se destacó, superando a los tratamientos con TDZ.

Con relación al tamaño de los brotes la mayor longitud en el primer subcultivo fue de 0.6 cm y el tratamiento con mejor respuesta fue con el medio de cultivo suplementado con TDZ (1 μ M), en ambos tipos de tejidos (con síntomas y asintomáticos). Para los subcultivos subsecuentes, ambos tipos de tejidos registraron una mayor longitud de los brotes de 0.67 cm, en el medio suplementado con TDZ (3 μ M), en el cual se obtuvieron los mayores registros de altura en los tejidos con y sin síntomas (Ver cuadro 1, 2).

Detección de bacterias y fitoplasmas mediante PCR

Mediante la PCR directa realizada con los iniciadores P1/P7, no se detectó la presencia de fitoplasmas en ninguno de los tejidos analizados: plantas con síntomas de fasciación, plantas asintomáticas, meristemos y embriones. Sin

embargo, la PCR anidada (R16F2/R16R2) evidenció la presencia de fitoplasmas, tanto en plantas sintomáticas y asintomáticas, como en los embriones maduros, al obtenerse un producto de amplificación de peso molecular entre 1 y 1.5 kb cuyo tamaño coincide con el reportado por Lee et al. (1993) y en Rojas et al (2009) (Figura 3).

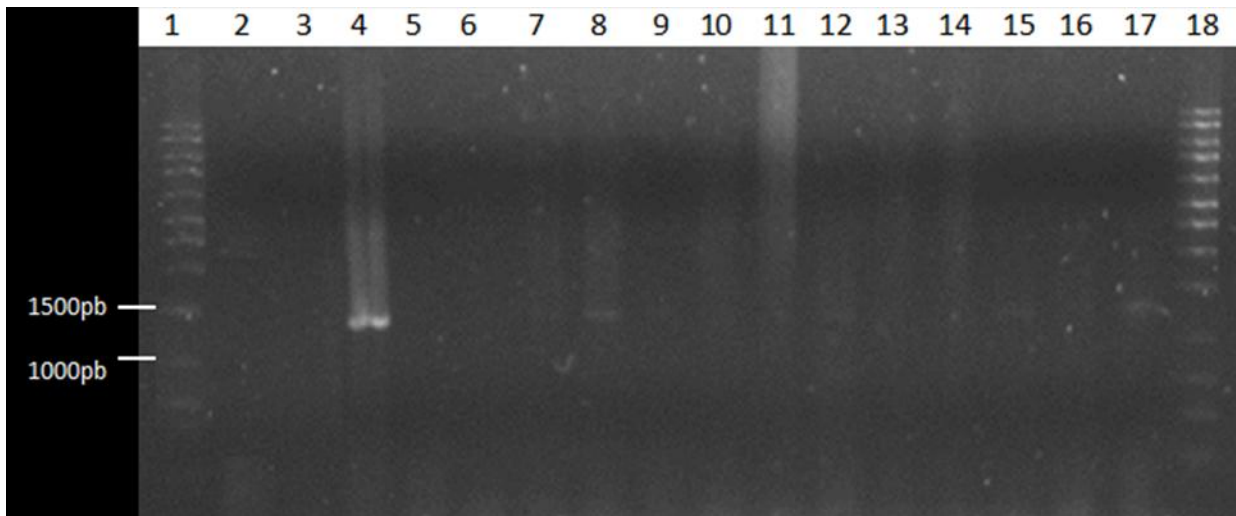


Figura 3.- Amplificación de la región 16S ARNr de fitoplasmas. Carril 1 y 18) marcador de peso molecular (1kb Axygen), 2) control negativo, 3) control positivo PCR directa, 4) Control positivo PCR anidada, 5) hoja de planta 1, 6) tallo sección superior planta 1, 7) tallo sección media planta 1, 8) tallo sección baja y raíz planta 1, 9) hoja planta 2, 10) tallo sección superior planta 2, 11) tallo sección media planta 2, 12) tallo sección baja y raíz planta 2, 13) Hoja de planta 3, 14) tallo sección superior planta 3, 15) tallo sección media planta 3, 16) tallo sección baja y raíz planta 3, 17) planta asintomática (carriles 5-17 PCR anidada).

En el caso de la determinación realizada para bacterias, se observó la amplificación en los siguientes tejidos: plantas con síntomas, plantas asintomáticas, embriones maduros. El producto de PCR de 1500 pb en todos los casos, fue secuenciado, los nucleótidos obtenidos se compararon con la base de datos del GenBank y se encontró una similitud del 97% con bacterias no cultivables.

Obtención de plantas libres de patógenos

En los medios de cultivo suplementados con 10, 20 y 50 ppm de tetraciclina el 100 % de los explantes sobrevivieron y presentaron remisión de síntomas (Figura 4), mientras que a mayor concentración del antibiótico (100, 500, 1000 ppm) fueron letales después de permanecer 30 días en el medio de cultivo. Los tejidos que presentaron remisión de síntomas y fueron colocados en condiciones de oscuridad, presentaron etiolación después de 20 días. A estos brotes se les extrajo los meristemos de aproximadamente 50 micras, pasados ya 30 días de haber sido extraídos y permanecer en el medio de cultivo MS con $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bencil adenina se obtuvo una supervivencia del 100 % de los meristemos, observándose la formación de las plántulas. Se logró que los brotes alcanzaran un tamaño de más de 0.5 cm de altura (Figura 5), con esta longitud fue posible la realización de la extracción de ADN de cada una de las plántulas originadas de los

meristemas de forma independiente, colectando el material suficiente y dejando al menos una yema para asegurar la rebrotación. Del tejido se obtuvieron concentraciones de $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ o más de ADN, con buena pureza, lo cual fue confirmado con un espectrofotómetro.

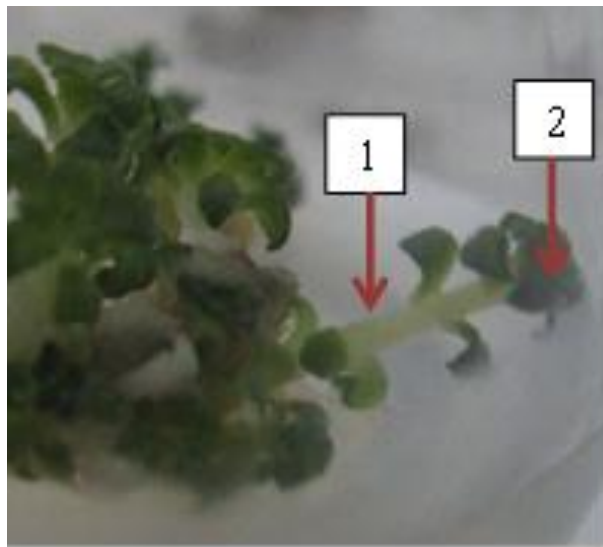


Figura 4.- Explante con un mes en 20 ppm de tetraciclina con remisión de síntomas 1) tallo del brote 2) hojas.

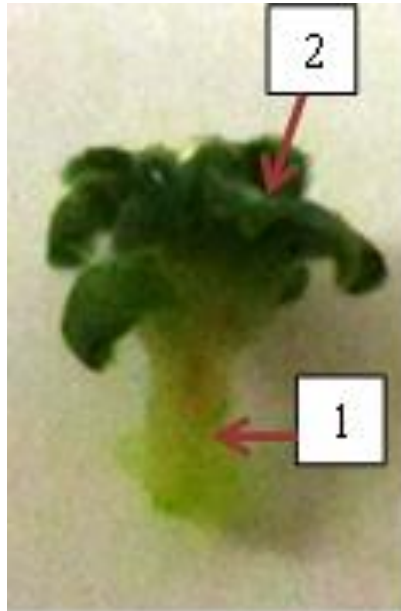


Figura 5.- Meristemo después de dos meses en MS con 0.2 mg•L de bencil adenina 1) tallo del brote 2) hojas

El análisis de PCR para verificar la presencia de patógenos, determinó que el 90 % de los tejidos extraídos de los brotes estuvieron libres de bacterias (Figura 6) y el 100 % se encontró libre de fitoplasmas.

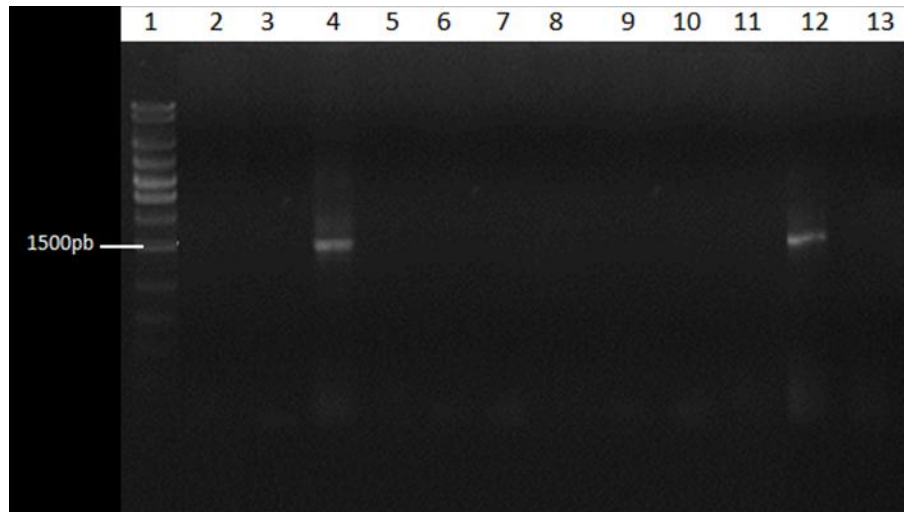


Figura 6. Amplificación de la región 16S ARNr de Bacteria con producto PCR a partir de meristemos: carril 1) marcador molecular, 4) muestra meristemo 3 (positiva para bacterias amplificación posiblemente de 1500 pb), 12) control positivo, 13) control negativo, 2-11) muestras de meristemos (negativas para bacterias).

Producción de embriones somáticos

El mejor tratamiento de desinfección para las hojas de las plantas crecidas en invernadero, fue el de etanol al 70 % por 60 segundos, seguido de hipoclorito de sodio al 30 % por 20 min, el cual presentó los mejores resultados, con una supervivencia de 50 % de los tejidos. En el caso de este tejido, la fuente de contaminación con hongos y bacterias fue la limitante más importante para el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Hojas de las plantas sintomáticas fueron

muy sensibles a la desinfestación y susceptibles a la oxidación, de igual forma los tejidos jóvenes.

Después de nueve semanas en el medio de inducción, los explantes presentaron cambios y se obtuvieron dos tipos de tejidos: 1) nódulos meristemáticos (Figura 7, 9), los cuales tienen potencial de convertirse en embriones ya que se observaron células en mitosis en muchos de ellos además de presentar paredes celulares primarias delgadas, 2) nódulos maduros, con células ya diferenciadas es decir, tejido vascular presente, xilema y floema con una vaina circundante que lo limita, seguido de más parénquima (Figura 8, 10), no hubo diferencias entre los medios probados ya que en todos se formaron ambos tipos de tejidos. En el medio con mayor concentración de 2,4-D se presentó mayor oxidación. Raju y Man (1970) reportaron por primera vez la capacidad de regeneración de hojas jóvenes y adultas de *E. elegans* en un medio sin sales minerales, azúcares o vitaminas, sin embargo, la parte adaxial de las hojas produjeron siempre los brotes, mientras que, la zona abaxial nunca. Por otro lado, concluyen que las hojas más jóvenes tuvieron mayor capacidad para formar raíces y las adultas brotes adventicios.



Figura 7.- Sección de hoja con nódulos inmaduros.



Figura 8.- Sección de hoja con nódulos maduros (diferenciados).

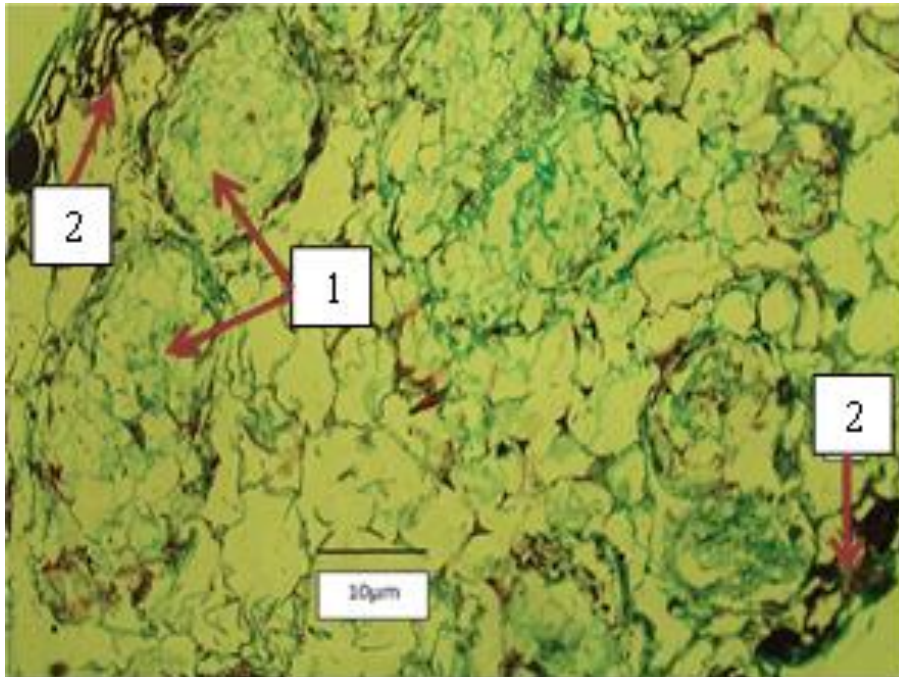


Figura 9.- Tejido de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca', con nódulos inmaduros (células en división, el cual estuvo en: medio MS con 2 mg•L⁻¹ 2,4-D por 10 semanas en oscuridad; la siguiente etapa en un medio MS con 4 mg•L⁻¹ de ANA y 0.4 mg•L⁻¹ BA por un mes, por último se colocó en un MS con 0.4 mg•L⁻¹ de ANA y 0.04 mg•L⁻¹ BA por un mes. 1) Nódulos inmaduros con células parenquimatosas en mitosis y una epidermis limítrofe 2) Epidermis foliar.

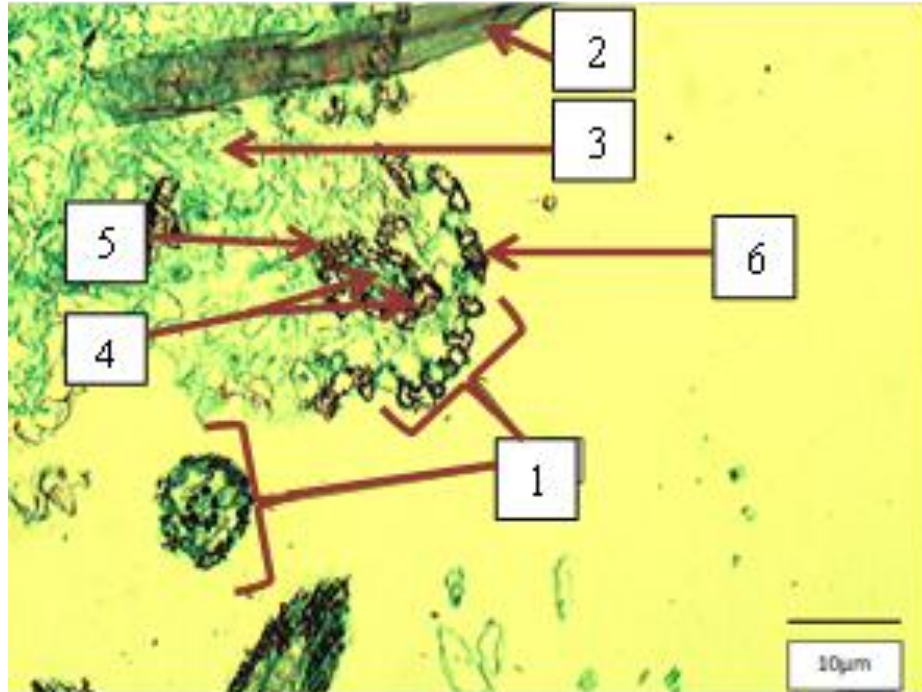


Figura 10.- Tejido de callo de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca', con nódulos maduros (diferenciados), el cual estuvo en: medio MS con $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D por 10 semanas en oscuridad; la siguiente etapa en un medio MS con $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA por un mes, por último se colocó en un MS con $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA por un mes. 1) Nódulos maduros 2) Tricoma 3) Tejido de parénquima 4) Haz vascular 5) Vaina del haz vascular 6) Epidermis limítrofe del nódulo.

Al determinar la presencia o ausencia de patógenos mediante la técnica de PCR, los nódulos inmaduros no se detectaron patógenos mientras que en los nódulos maduros sí.

La técnica de extracción de meristemos empleada para la obtención de plantas libres de patógenos presenta una innovación en la metodología que, permite utilizar material vegetativo disponible que ya está establecido *in vitro* evitando los pasos de desinfestación superficial. Esta técnica podría ser utilizada en otras especies hortofrutícolas, debido a que el porcentaje de plántulas libres de patógenos que se obtienen es mayor que el presentado por otras técnicas evaluadas recientemente como la crioterapia (Wang y Valkonen, 2008) y el cultivo de meristemos apicales (Tiwari *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de una bacteria y un fitoplasma en *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' asociados con los síntomas de fasciación.

Se logró el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá', tanto con síntomas de fasciación como asintomáticas. La sintomatología se ha reproducido en los brotes mantenidos en medio de cultivo por más de dos años. Se obtuvo embriogénesis somática de la especie a partir de hojas y fue posible la obtención de material vegetal de propagación libre de fitoplasmas y bacterias con el protocolo diseñado con la combinación de antibióticos, etiolación y la extracción de meristemas de los brotes multiplicados *in vitro*. La proporción de brotes libres de patógenos fue del 90 % confirmado mediante PCR.

Se logró embriogénesis somática de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá', a partir de hojas

BIBLIOGRAFÍA

Ahrens U, E Seemüller (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Arellano-Ostoa G, S González-Bernal, E García-Villanueva (2011) Propagación *in vitro* y por estacas de linaloe (*Bursera aloexylon* L.) procedente de los estados de Guerrero, Puebla y Morelos, México *In: Linaloe cultivo y aprovechamiento*. Ayala S., J. C. y S. I. Ayala F. (eds). Fundación Produce Puebla, A. C. Puebla, México. pp: 261-288.

Andreu R C M, S J R Gómez (2007) La Sanidad Vegetal en la Agricultura Sostenible. Fejío. Cuba. pp: 410-412.

Berlyn G P, J P Miksche (1976) Botanical Microtechnique and Cytochemistry. Iowa State University Press. USA.

Brade B G, W Preil, and H Jeske (2000) remission of the free-branching pattern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment. *Journal Phytopathology* 148: 587-590.

Davis R E, R F Whitcomb, R L Steere (1968): Remission of aster yellows disease by antibiotics. *Science* 161: 793-795.

Deng S, Hiruki C (1991a) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53–61.

Deng S, Hiruki C (1991b) Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81:1475-1479.

Gundersen D E, and I M Lee (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology. Mediterranea* 35: 144-151.

Kirkpatrick B C, T J Stenger, A H Purcell (1987) Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238:197-200.

Lane D J (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.). John Wiley and Sons, Chichester. pp: 115-147.

Lee I M, R Hammond, D E Gundersen-Rindal (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

- Liao C H, T A Chen (1981)** In vitro susceptibility and resistance of two spiroplasmas to antibiotics. *Phytopathology* 71: 442-445.
- Meyrán G J (2003)** Las crasuláceas de México. Sociedad mexicana de cactología A.C. México. pp: 123-183.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plant* 15: 473-497.
- Musetticabi R (2010)** Biochemical changes in plants infected by phytoplasmas. In *Phytoplasmas: genomes, plant hosts, and vectors*. CABI Phyllis G, Weintraub and Phil Jones (ed). Preston, UK. pp: 132-146.
- Nicolaisen M, D P Horvath (2008)** A branch-inducing phytoplasma in *euphorbia pulcherrima* is associated with changes in expression of host genes. *Journal of Phytopathology* 156: 403–407.
- OIRSA (2005)** Manual técnico de fitosanidad en plantas ornamentales y follajes. OIRSA. El Salvador.
- Pertry I, K Václavíková, S Depuydt, P Galuszka, L Spíchal, W Temmerman, E Stes, T Schmülling, T Kakimoto, M C E Van Montagu, M Strnad, M Holsters, P Tarkowski, D Vereecke (2009)** Identification of *Rhodococcus*

fascians cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. The National Academy of Sciences of the USA 106: 929–934.

Punja Z K, S Boer (2007) Biotechnology and plant disease management. CABI Publishing. Wallingford, Oxon, GBR: pp: 250-275.

Raju M V S, Man H E (1970) Regenerative studies on the detached leaves of *Echeverria elegans*. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. Canadian Journal of Botany 48:1887-1891.

Rojas-Martínez R I, E Zavaleta-Mejía, I M Lee, A Aragón-García, (2009) Identification of an isolate from group 16s, candidatus phytoplasma pruni in plants and seeds of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) in México, Agrociencia 43: 851-860.

Tiwari A K, S Tripathi, M Lal, M L Sharma, P Chiemsoibat (2011) Elimination of sugarcane grassy shoot disease through apical meristem culture. Archives of phytopathology and plant protection 44: 20 1942-1948.

Sajeva M, M Costanzo (1994) Succulents the illustrated dictionary. Timber press Inc. Portland Oregon USA. 98 p.

SAS Institute (2002) The SAS system for windows. Release 6.1. SAS Institute., Cary, NC.

Schneider B, E Seemüller, C D Smart, B C Kirkpatrick (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp.369-379. In: S Razin, and J G Tully (eds). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol. I. Academic Press, New York, USA. 483 p.

Sears B B, P Lim, N Holland, B C Kirkpatrick, K L Klomparens, (1989) Isolation and characterization of DNA from mycoplasma-like organism. Molecular Plant-Microbe Interactions 2: 175– 180.

Wang Q, J P T Valkonen (2008) Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. Plant Pathology 57: 338–347

DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo es el primer reporte de la propagación *in vitro* y la obtención de plantas libres de bacterias y fitoplasmas de *Echeveria pumila* cv. 'Glaucá' en México. En el contexto de la micropropagación de tejido *in vitro*, el informe más cercano acerca del género *Echeveria* fue el estudio elaborado por Raju y Man (1970), donde se reportó por primera vez la capacidad de regeneración de hojas jóvenes y adultas en *Echeveria elegans*. Existen numerosos estudios sobre el cultivo *in vitro* de la familia de las Crasuláceas (Malda *et al.*, 1999; Debnath, 2009), la regeneración de especies de esta familia por medio de multiplicación de brotes puede ser provechosa por ejemplo en el caso de *Obregonia denegrii* con la combinación de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bencil amino purina (BA) y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido naftalen acético (ANA) consiguiéndose tasas de proliferación de 11.3 brotes por explante y la formación de 9.2 embriones somáticos en un período de 4 meses (Malda *et al.*, 1999).

Los resultados que se presentan en este estudio muestran que brotes sintomáticos cultivados en un medio suplementado con BA $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ANA $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presentan hasta 13 brotes en 4 meses. Para el caso de los brotes asintomáticos $3 \mu\text{M}$ de thidiazuron (TDZ) generó hasta 9.4 brotes por explante, evidenciando la eficiencia del medio de cultivo utilizado. Sin embargo, la embriogénesis somática iniciada a través de hojas, es una técnica que

proporciona la ventaja de producir plantas completas, pero requiere de mayor estudio dado que en este trabajo sólo se llegó a la obtención de nódulos embrionarios.

Por otro lado, la multiplicación *in vitro* de Crasuláceas tiene gran importancia, debido a su potencial en la investigación médica, por ejemplo en *Rhodiola fastigiata* se han identificado sustancias como: salidroside, tirosol y fastigitin A (Peng *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002), que tiene propiedades medicinales (Kurkin, 1986). La demanda comercial de esta especie y otras crasuláceas ha provocado la sobreexplotación de las poblaciones nativas, lo que pone en peligro la destrucción del hábitat. La SEMARNAP, (1995), publicó que de 915 especies en peligro o amenazadas, 500 pertenecen a la familia de las Crasuláceas.

Las bacterias endófitas y los fitoplasmas son patógenos que tienen gran importancia económica, debido a las enfermedades ocasionadas; por ejemplo el Huanglongbing (HLB) en cítricos (Marques *et al.*, 2012), que es considerada la enfermedad más destructiva en cítricos (Callaway, 2008), pero existen enfermedades como The sweet potato little leaf, causada por la infección del fitoplasma *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* y que ha ocasionado cuantiosas pérdidas en los rendimientos de papa a nivel mundial (Wang y Valkonen, 2008).

Los resultados de este estudio evidencian la presencia de un fitoplasma y una bacteria, que posiblemente estén asociados en mayor o menor grado con la sintomatología de fasciación en tallos de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca'. Se puede plantear la posibilidad de que exista una coinfección, fenómeno que ya ha sido indicado en combinaciones entre una bacteria y un fitoplasma por Kitajima y Barros (2000), este estudio fue el primer reporte de la presencia simultánea de fitoplasma y *Xylella* (o bacteria similar a *Xylella*) en *Catharanthus roseus*, que manifiestan síntomas de escoba de bruja, el cual es un síntoma característico de fitoplasmas. Por otro lado, también se ha comprobado la presencia simultánea de fitoplasmas y otro tipo de patógenos en plantas como los virus, la presencia de fitoplasmas y un begomovirus en plantas de tomate y chile, los cuales están relacionados con síntomas de amarillamiento (Lebsky *et al.*, 2011).

La generación y utilización de plantas libres de patógenos es importante en una gran gama de especies económicamente importantes, ya que asegura iniciar el proceso productivo con plantas sanas y así evitar grandes pérdidas económicas en diversos sistemas de producción por ejemplo, en cítricos por citrus tristeza virus (VTC), en papa *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* y en limón mexicano el Huanglongbing (Callaway, 2008; Wang y Valkonen, 2008). Otro aspecto digno de tomarse en cuenta, es que el material vegetativo que se utiliza en México, en varias especies importantes provienen del extranjero, lo cual repercute en el incremento de los costos de producción, lo que puede subsanarse si en nuestro país se diseñan nuevas técnicas para la generación de plantas libres de patógenos en especies importantes como las crasuláceas.

La obtención de plantas libres de patógenos, puede ser realizada utilizando varios métodos entre los cuales se excluye o se elimina el patógeno del tejido de interés. Entre los métodos de exclusión se encuentran la etiolación y el cultivo de meristemas, mientras que para la eliminación podemos citar a la crioterapia, termoterapia y a la quimioterapia (Cieślińska, 2007). Sin embargo la efectividad de estas técnicas depende de la especie y del patógeno diana.

El cultivo *in vitro* de meristemas se ha utilizado desde hace varias décadas para eliminar virus (Faccioli y Marani, 1998) y en muchos casos, la extracción y el cultivo de meristemas ha sido una buena manera de conseguir plantas libres de patógenos, por ejemplo: se ha podido eliminar en caña de azúcar el *sugarcane bacilliform virus* (Parmessur *et al.*, 2002), *sugarcane yellow leaf virus* (Naz *et al.*, 2009), en chayote el *Chayote mosaic virus* (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2006) y fitoplasmas en *Artemisia roxburghiana* (Banerjee *et al.*, 2010). Sin embargo, el domo meristemático es un conjunto de células que se encuentran en división activa y su tamaño en promedio tiene 0.1 mm de diámetro y 0.25 mm de longitud, este reducido tamaño hace que la escisión y su posterior reactivación sea casi imposible para cultivarse *in vitro*, por lo que tradicionalmente para su cultivo, se hacen cortes de tejido más grandes (aproximadamente 1 mm) con tres o cuatro primordios foliares (Benson, 2008; Takada y Tasaka, 2002). A pesar de que se ha considerado que las células más jóvenes del meristemo están generalmente libres de virus y otros parásitos obligados, como los fitoplasmas y las bacterias se han encontrado virus en varias ocasiones (Appiano y Pennazio, 1972). La capacidad

de regeneración es proporcional al tamaño del tejido sembrado, sin embargo, para la erradicación de patógenos entre más pequeño sea la porción sembrada más eficiente será la erradicación (0.2-0.4 mm) (Faccioli y Marani, 1998; Wang et al., 2008).

Por lo tanto, la erradicación de patógenos utilizando por si sólo el cultivo de meristemas, se ve limitado por la dificultad de extirpar mecánicamente meristemas muy pequeños. El protocolo desarrollado en este estudio, trata de superar esta primera limitante, al reducir en primer lugar la concentración de partículas patogénicas (Askari *et al.*, 2011) y en segundo, lograr ampliar la distancia que existe entre el domo meristemático y las células que contienen haces vasculares diferenciados. Estos dos pasos previos a la escisión del domo, hizo más eficiente la extracción de los meristemas de un tamaño que varió entre 0.3-0.5 mm, los cuales presentaron una sobrevivencia del 92 % y el 90 % de los brotes regenerados estuvieron libres de bacterias y fitoplasmas.

En la literatura se encuentran esfuerzos para lograr tejidos libres de virus, al utilizar un tratamiento de calor previo a la extracción de los meristemas de ápices enfermos cultivados *in vitro* de tabaco, aumentando con ello la erradicación del patógeno (Cooper y Walkey 1978). Esta técnica ha sido utilizada desde entonces con éxito por muchos investigadores.

Recientemente Wang *et al.* (2008) han logrado erradicar el virus del clon elite de frambuesa Z13, combinando las técnicas del cultivo de meristemas, termoterapia y la crioterapia. Estos autores utilizaron brotes infectados establecidos *in vitro*, los cuales fueron sometidos a un tratamiento de termoterapia por 28 días, después se cortaron ápices de 1 mm que fueron encapsulados para su posterior tratamiento de crioconservación y luego sembrados para su reactivación. Con este procedimiento ellos lograron obtener el 36 % de supervivencia de los ápices a la crioconservación con un 40% de rebrotación y el 33 % de éstos estuvieron libres del virus RBDV.

La técnica que se propone en este trabajo de tesis utiliza el establecimiento *in vitro* de ápices enfermos de *E. pumila* cv. 'Glabra' y combina tres métodos: la quimioterapia con tetraciclina para la remisión de los síntomas, un período de etiolación para lograr la elongación de los ápices enfermos y la extracción de meristemas de aproximadamente 0.3 a 0.5 mm de longitud, con esto se consiguió obtener más del 90 % de los meristemas establecidos y reactivos con una proporción del 90 % de ellos libre de patógenos corroborado por la técnica de PCR.

Con esta nueva técnica en principio se mantienen los síntomas, debido a que se establecen porciones grandes de tejido enfermo (0.5 cm) con síntomas aparentes, permitiéndose la reproducción de los síntomas *in vitro*. Por otro lado, se reduce la posibilidad de fracaso en el establecimiento de meristemas de menor tamaño, al

no requerirse tejidos tan pequeños para la introducción, ya que al usar solo el domo con un par de primordios foliares se obtiene bajo porcentaje de supervivencia (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2006). Con la remisión de los síntomas, que en el caso de la fasciación del tallo es de suma importancia, debido a que se pierde la dominancia apical por su característica aplanada, que hace imposible la extracción del meristemo. Por lo tanto, al lograrse la remisión de dichos síntomas con el uso de un antibiótico (tetraciclina), se asume que hubo una reducción en el número de las partículas de los patógenos involucrados (Askari *et al.*, 2011), especialmente en los haces vasculares y domo, como lo demostraron Wongkaew y Fletcher (2004) quienes no observaron partículas de fitoplasma en esos tejidos de plantas tratadas con oxytetraciclina. Por otro lado, en nuestro caso al inducirse la elongación de la zona apical de los brotes con la etiolación se logró que fuera más fácil la extracción de los meristemas apicales (0.3-0.5 mm) de los brotes generados *in vitro*.

Esta técnica es diferente a la utilizada convencionalmente para la extracción de meristemas mencionada por Tiwari *et al.* (2011), dado que no existe un ápice bien definido en las plantas enfermas, provocado por la fasciación, por lo tanto no se pudieron introducir meristemas directamente al cultivo *in vitro* y por tal motivo, el primer paso fue tratar de tener plantas con meristemas apicales visibles, y esto se logró con la remisión de los síntomas al utilizar la tetraciclina. Esta técnica tampoco requiere de tratamientos que pueden poner en riesgo a los tejidos como es el caso de la termoterapia y la crioterapia en la cual se pierde gran cantidad de

material debido al tratamiento drástico, ya que meristemas pequeños no sobreviven al cambio de temperatura (Wang y Valkonen, 2009). Se han combinado estas técnicas (termoterapia y crioterapia) para obtener plantas libres de fitoplasmas y virus con resultados bajos tanto en la supervivencia de los tejidos (no mayor a 85%) con el 35% de plantas libres de patógenos (Wang *et al.*, 2008; Wang y Valkonen, 2008; Wang y Valkonen, 2009), además la crioterapia requiere de un protocolo específico para la crioconservación de los tejidos y reactivos especiales para la congelación de los mismos, que ponen en peligro su supervivencia (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES GENERALES

Se logró el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca', tanto con síntomas de fasciación como asintomáticas.

La sintomatología se ha reproducido en los brotes mantenidos en medio de cultivo por más de dos años.

Se obtuvo embriogénesis somática de la especie a partir de hojas y fue posible la obtención de material vegetal de propagación libre de fitoplasmas y bacterias, en los nódulos embrionarios incipientes sin haces vasculares.

Con el protocolo diseñado con la combinación de antibióticos, etiolación y la extracción de meristemas de los brotes multiplicados *in vitro* fue posible la obtención de material vegetal libre de fitoplasmas y bacterias, obteniéndose una proporción de brotes libres de patógenos de 90 % confirmado mediante PCR.

Se ha confirmado la presencia de dos tipos de patógenos involucrados en los síntomas de fasciación de *E. Pumila*, una bacteria y un fitoplasma.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour-Esquivel A, L C Bermudez, S Alvarenga, C Rivera (2006) Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 77: 17- 23.

Appiano A, S Pennazio (1972) Electron microscopy of potato meristem tips infected with Potato Virus X. *Journal of General Virology* 14. 3: 273 - 276.

Askari N, M Mousivand, A Foroutan, A Hagh Nazari , S Abbasalizadeh , S Soheilivand, M Mardi, G Salehi Jouzani (2011) Evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches broom disease using Real-Time PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:1 81-88.

Banerjee S, F Haider, G D Bagchi, A Samad (2010) Regeneration of phytoplasma-free *Artemisia roxburghiana* Besser var. *purpurascens* (Jacq.) Hook. plants using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103:189–196.

Benson E E (2008) Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 27: 141–219.

Callaway E (2008) The green menace. *Nature* 452: 148–150.

Cieślińska M (2007) Application of thermo- and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting prunus sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 117-124.

Cooper V C, Walkey D G A (1978) Thermal inactivation of cherry leaf roll virus in tissue cultures of *Nicotiana rustica* raised from seeds and meristem tips. *Annals of Applied Biology* 88: 273–278.

Debnath S C (2009) Zeatin and TDZ-induced Shoot Proliferation and Use of Bioreactor in Clonal Propagation of Medicinal Herb, Roseroot (*Rhodiola rosea* L). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* Vol. 18 2: 245-248.

de O. Manes C-L, T Beeckman, T Ritsema, M Van Montagu, K Goethals, M Holsters (2004) Phenotypic alterations in *Arabidopsis thaliana* plants caused by *Rhodococcus fascians* infection. *J Plant Res* 117: 139–145.

Faccioli V C, Marani F (1998) Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: *Plant Virus Disease Control* (A Hadidi, R K Khetarpal, H Koganezawa (eds). American Phytopathological Society, USA. pp. 346–380.

Kitajima E W; T S L Barros (2000) Natural co-infection of periwinkle by a phytoplasma and a *Xylella*-like bacterium. *Summa Phytopathologica* 26 1:69-70.

Kurkin V A (1986) The chemical composition and pharmacological properties of *Rhodiola* plants. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 20: 1231–1235.

Lebsky V, J Hernández-González, G Arguello-Astorga, Y Cardenas-Conejo, A Poghosyan (2011) Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology* 64: 55-56.

Malda G, Suzán H, Backhaus R (1999) In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism *Scientia Horticulturae* 81: 71–87.

Marques R N, D C Teixeira, P T Yamamoto, and J R S Lopes (2012) Weedy hosts and prevalence of potential leafhopper vectors (Hemiptera: Cicadellidae) of a phytoplasma (16SrIX group) associated with Huanglongbing symptoms in citrus groves. *Journal of Economic Entomology* 105.2: 329-337.

Naz S, F Siddiqui, A Ali, J Iqbal (2009) Virus indexation of in vitro regenerated sugarcane plants. *Pakistan Journal of Botany* 41 4:1931–1939.

Parmessur Y, S Aljanabi, S Saumtally, A Dookun-Saumtally (2002) Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue-culture. *Plant Pathology*. 51:561–566.

Peng J N, Y C Ge, X H Li, (1996) Study on the chemical constituents of *Rhodiola fastigiata*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 31: 798–800.

Raju M V S, Man H E (1970) Regenerative studies on the detached leaves of *Echeverria elegans*. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. *Canadian Journal of Botany* 48:1887-1891.

SEMARNAP (1995) Norma Oficial NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en

peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Gaceta Ecológica. VII, pp. 8 - 72. Mexico.

Takada S, Tasaka M (2002) Embryonic shoot apical meristem formation in higher plants. *Journal of Plant Research*. 115: 411–417.

Tiwari A K , S Tripathi, M Lal, M L Sharma, P Chiemsombat (2011) Elimination of sugarcane grassy shoot disease through apical meristem culture. *Archives of phytopathology and plant protection* 44: 20 1942-1948.

Wang Q C, W J Cuellar, M L Rajamäki, Y Hirata, J P T Valkonen (2008) Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips *Molecular Plant Pathology* 9.2: 237–250.

Wang Q C, J P T Valkonen (2008) Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathology* 57: 338–347.

Wang Q C, J P T Valkonen (2009) Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science* 14. 3: 119-122.

Wongkaew P, J Fletcher (2004) Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. *Plant Cell Reports* 23: 426–434.

Yang H S X Mei, L Y Peng (2002) A new glucoside from *Rhodiola fastigiata* (Crassulaceae). *Acta Botanica Sinica*. 44: 224–226.