

DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE LA PUNTA RIZADA DEL BETABEL (BCTV) POR MARCADORES MOLECULARES

1. INNOVACIÓN TECNOLÓGICA. Se sugieren técnicas de biología molecular para determinar la presencia del virus de la punta rizada del betabel (BCTV); las técnicas sirven tanto en plantas como en vectores y actualmente no existen reportes de estos estudios en Chile. Esto permitirá establecer estrategias para el manejo integrado de estos virus en el cultivo de Chile en la región del centro de México.

2. PROBLEMA A RESOLVER. Esta tecnología permite ahora el diagnóstico confiable de la presencia del virus BCTV tanto en plantas como en insectos, lo que nos permite implementar estrategias de manejo en el cultivo de Chile, para que estos no se propaguen a las plantaciones libres y sanas de virus del BCTV.

3. RESULTADOS ESPERADOS. La aplicación de la tecnología garantiza un diagnóstico 99% confiable de la presencia virus de la punta rizada del betabel (BCTV) en plantas de Chile (*Capsicum annum*) como en diversos vectores.

4. RECOMENDACIÓN PARA SU USO. Para detectar la presencia del virus de la punta rizada del betabel (BCTV) en plantas de Chile se toman 100 mg de tejido de hojas, y la misma cantidad en el caso de insectos. Cuáles sean, los tejidos son molidos en nitrógeno líquido para extraer ADN total donde se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml; a este se le aplica 600 µl de Buffer de extracción (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 % CTAB w/v, 1 % de β-mercaptoetanol) agitando la mezcla hasta homogeneizar. Las muestras son incubadas por 20 minutos a 65 °C. (homogenizando cada 3 minutos). Después de la incubación se le agregan 600 µl de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) (frío), y son mezcladas con agitación por 15 minutos. Los tubos se centrifugan a 13,000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo conteniendo 600 µl de isopropanol frío. Las muestras se mezclan y se dejan a temperatura ambiente por 5 minutos. Enseguida se centrifugan a 13,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante es descartado y los tubos se invierten por 5 minutos para secar la pastilla de ADN. Posteriormente la pastilla se resuspende en 100 µl de buffer TE (Tris- EDTA 0.01 mM pH 8.0) y 100 µl de etanol al 100 %.

Por amplificación el BCTV es detectado por PCR usando los primers universales BCTV CP4f (5'-CAG TAT CGA CCA GTT GTT T-3') y BCTV CP6r (5'-CTC TTC GAA TAC GAT AAG TAG-3'), los cuales amplifican una porción del gen de la cubierta proteica. Para la reacción se utilizan 5-10 ng de ADN y 20 µl de una reacción compuesta por 0,250 µM de cada cebador, 3 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA), 250 µM de dNTPs, 2 µl de tampón para Taq 10X (15 mM Cl₂Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina) y 3 mM Cl₂Mg. El programa de la PCR es: 35 ciclos consistentes de 94°C por 30 segundos, 59°C por 60 segundos y 72°C por 90 segundos. Y una extensión final de 72°C por 5 minutos. La amplificación de los productos es separada por electroforesis. El diagnóstico de BCTV es determinado por la presencia de un fragmento de 576 pb en geles de agarosa al 2%. El ADN es teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

5. ÁMBITO DE APLICACIÓN. Para cualquier ámbito ecológico donde se cultive Chile, la técnica se puede utilizar tanto para las plantas como para las especies de insectos que conviven con el cultivo.

6. USUARIOS Y MERCADO POTENCIAL. Esta técnica puede ser utilizada en Laboratorios de investigación de Universidades, siendo además útil para Laboratorios de Fitopatología, de Diagnóstico, Centros de investigación, demás Universidades, entre otros.

7. COSTO ESTIMADO. Se estima que el costo de diagnóstico por muestra es de \$260.00 pesos

8. IMPACTO POTENCIAL. Al determinar la presencia del virus BCTV en plantas de Chile e insectos, crea la posibilidad de implementar estrategias de manejo para controlar a los vectores del BCTV causantes de algunos de los síntomas de amarillamientos en Chile.

Mayor información:
Luis Roberto Reveles Torres
Campo Experimental Zacatecas

DIAGNOSTICO DE VIRUS DE LA PUNTA RIZADA DEL BETABEL (BCTV) POR MARCADORES MOLECULARES



Figura 1. Planta de chile que muestra achaparramiento, amarillamiento, hojas gruesas y sin flores o frutos.

Impacto potencial de la tecnología validada

