

Centro De Investigación Científica de Yucatán, A.C.

CICY

**Estudio de la diversidad genética de los fitoplasmas asociados a la
enfermedad del amarillamiento letal mediante el análisis de alta
resolución de fusión del ADN**

TESIS

Ingeniería Bioquímica

Landy del Carmen Huchin Cauich

ASESOR INTERNO: Dr. Iván Alfredo Estrada Mota

ASESOR EXTERNO: Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell

COASESOR: M.C Iván Córdova Lara

Calkiní, Campeche, México 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



INSTITUTO TECNOLÓGICO
SUPERIOR DE CALKINÍ



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche 45939
P/10/25/797
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. LANDY DEL CARMEN HUCHIN CAUCH 6056
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DR. LUIS ALFONSO SÁENZ CARBONELL, y el co-director DR. IVAN ALFREDO ESTRADA MOTA, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: **"ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS FITOPLASMAS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DEL AMARILLAMIENTO LETAL MEDIANTE EL ANALIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE FUSIÓN DE ADN"**.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría. Fortaleza de Nuestra Cultura®



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINÍ

"DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES"

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MEXICO.

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



Agradecimientos.

Quiero agradecer principalmente a Dios por siempre estar conmigo y ayudarme en el proceso. A mis padres por apoyarme en todo momento a pesar de las dificultades que se presentaron en el camino, ser una motivación para poder darles lo mejor en un futuro, a mis hermanitos por ser un motor para seguir y tratar ser un ejemplo para ellos. También agradecer a mis mascotas por ser siempre ese apoyo emocional que en ocasiones me faltaba., a mi tía Lupe por apoyarme y animarme siempre, a mi tía Esther y mi tío Daniel por darme hospedaje y alimento cuando más lo necesitaba, agradecer también a mis amigas por darme ese apoyo moral que siempre necesitaba, por confiar en mí. Y también quiero agradecer enormemente a mi abuelito que me cuida desde el cielo porque gracias a él pude seguir, por haberme apoyado siempre, por estar conmigo en momentos especiales y por qué siempre me motivaba a seguir.

De igual forma quiero agradecer a mis asesores por ser pacientes conmigo, por su empatía y apoyo, motivarme en todo momento, por formar parte de mi formación académica brindándome grandes enseñanzas y facilidades para poder seguir.

Finalmente agradecerme a mí porque a pesar de lo difícil que llegó a ser, insistí y seguí luchando para ser mejor día con día.

“Este agradecimiento va enormemente a mi padre por haber creído, confiado en mí e impulsado a seguir, que donde quiera que esté sé que estará orgulloso por este logro obtenido y aunque físicamente no esté, siempre estará presente en mi mente y corazón”.

Índice.

AGRADECIMIENTOS.	2
ÍNDICE.	3
RESUMEN.	6
CAPITULO 1	7
INTRODUCCIÓN	7
1.2 ANTECEDENTES. Y/O MARCO TEÓRICO	9
ANTECEDENTES	9
1.2.1 IMPORTANCIA DEL COCOTERO (COCO NUCIFERA L.)	9
1.2.2 FITOPLASMAS	9
1.2.3 ORIGEN DEL AMARILLAMIENTO LETAL Y SÍNTOMAS	10
1.2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	11
1.3 JUSTIFICACIÓN	16
1.5 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.	17
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO 2	18
MATERIALES Y MÉTODOS.	18
2.1 DIAGRAMA DE BLOQUES DE LAS ETAPAS DEL PROYECTO.	18
2.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	18
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN	19
2.3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN EN LA PALMA DE COCOTERO USANDO EL TEJIDO DEL TRONCO	19
2.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN EN EL TEJIDO DE LA HOJA	20
2.4 DETECCIÓN DEL FITOPLASMAS POR MEDIO DE PCR ANIDADO.	22
2.5 DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN PCR POR MEDIO DEL ENSAYO SECA QPCR-HMRA	22
2.6 EVALUACIÓN DE LOS AMPLICONES CON LA TÉCNICA DE HRM	23
CAPITULO 3.	23
3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CAPITULO 4.	29
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	30
RECOMENDACIONES:	34

Índice Figuras.

FIGURA 1. SÍNTOMAS DE AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (CASTILLO, M. G. 2001).	10
FIGURA 2. INICIADORES USADOS PARA LA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS ASOCIADOS AL AL (CORDOVA ET AL 2014).	12
FIGURA 3. GEL DE AGAROSA DESPUÉS DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR ANIDADO EN MUESTRAS DE COCOTERO. LAS MUESTRAS 1-3 SON POSITIVAS Y LA 4 Y 5 SON NEGATIVAS, MARCADOR MOLECULAR (1KB)	25
FIGURA 4. LAS QUE CRUZAN LA LÍNEA UMBRAL SON CONSIDERADAS POSITIVAS Y LAS QUE NO SON NEGATIVAS, ES DECIR; NO ESTÁN INFECTADAS POR AMARILLAMIENTO LETAL	26
FIGURA 5. ANALISIS DE ALTA RESOLUCION DE FUSION DE PRODUCTOS DE PCR DEL GEN SECA DE FITOPLASMAS ASOCIADOS A LAS PALMAS EN ESTA GRAFICA SE PUEDE OBSERVAR DOS PICOS DE TEMPERATURA QUE CORRESPONDEN A LOS SUBGRUPOS 16SRIVA.	28
FIGURA 6. UN GEL DE AGAROSA DONDE SE MUESTRA LOS DIFERENTES TAMAÑOS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR (IVAN CORDOVA 2022)	34
FIGURA 7. DISPLAY PRINCIPAL DE EQUIPO DE PCR BIO RAD T100 THERMAL CYCLER PARÁMETROS USADOS PARA LA PCR ANIDADA (CORDOVA, 2023)	34

Índice Tabla

TABLA 1	24
TABLA 2	26
TABLA 3	28

Resumen

El cocotero es una planta económicamente importante de las zonas tropicales de todo el mundo. Provee de muchos productos como el agua de coco, fibra, aceite etc. Sin embargo, su cultivo está amenazado por factores como la edad de las plantaciones y enfermedades entre ellas el amarillamiento letal que es causado por un fitoplasma y transmitido por el insecto *Haplaxius crudus*. Este fitoplasma presenta cinco variantes genéticas. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar el análisis de alta resolución de fusión (HRMA por sus siglas en inglés) del ácido desoxirribonucleico empleando un par de cebadores del gen *SecA* del fitoplasma del amarillamiento letal para detectar dos variantes en palmas afectadas por la enfermedad. Los resultados mostraron que cuando se utilizaron muestras de palmas previamente secuenciadas las curvas de fusión mostraron dos picos a 71°C para el grupo 16SrIV-D y 72.4°C para el grupo 16SrIV-A las dos cepas de fitoplasmas predominantes en el sureste de México. Por lo tanto, el ensayo que consiste en el par de cebadores y las condiciones PCR en tiempo real-HRM utilizados en la presente tesis es una alternativa sencilla para detectar a las dos cepas de fitoplasmas asociados al amarillamiento letal en México.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son un grupo de patógenos que producen muchas enfermedades a diversas plantas; una de estas enfermedades es el amarillamiento letal (AL), que ha ocasionado la muerte de diversas palmas en varias partes del mundo incluyendo a nuestro país y más específicamente a la región. Este patógeno habitan principalmente en el floema de las plantas y son transmitidos por varios grupos de insectos que se alimentan de este tejido del floema.

Las palmas afectadas por el amarillamiento letal presentan síntomas como la caída de frutos, el amarillamiento en las hojas, esta empieza comúnmente en las hojas más viejas para después infectar a toda la palma, la palma ya infectada usualmente tarda de 3 a 6 meses para que esta se muera.

La detección y diagnóstico del AL no ha sido fácil ya que este patógeno se encuentra en concentraciones bajas en los tejidos de las palmas y con una distribución irregular. Afortunadamente actualmente contamos con técnicas moleculares para su detección. Una de ellas es la Reacción de la Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés. El grupo de investigación de cocotero en el CICY ha implementado varias técnicas para la detección del fitoplasma causante del AL, todas ellas basadas en PCR. Actualmente se cuenta con la técnica de PCR anidado, la cual ha demostrado gran sensibilidad y especificidad ya que consiste en dos rondas de amplificación. Así mismo se ha desarrollado la PCR tiempo real de ahora en adelante qPCR, la cual ha permitido la cuantificación del patógeno en las distintas partes de la palma, y también ha demostrado ser muy sensible y rápida lo que permite poder hacer un gran número de muestras. Con estas herramientas de detección ha permitido realizar varios tipos de estudios sobre la enfermedad en general y en particular sobre el patógeno. Ahora se sabe que hay varios subgrupos o cepas de fitoplasmas que están afectando al cocotero y otras palmas. Esto último es muy importante conocer ya que los síntomas podrían ser ligeramente diferentes a los previamente descritos por McCoy 1982; o más agresivos. Para saber qué cepas o subgrupos están presente en las palmas de la región de la península,

se tiene que amplificar el ADN de estos patógenos por PCR anidado y posteriormente enviar los productos a secuenciar y con una comparación filogenética con secuencias reportadas en el GenBank se puede saber el tipo de fitoplasma; pero esto representa tiempo y recursos.

Recientemente se reportó la tecnología qPCR-HRMA (análisis de alta resolución de fusión) del ácido desoxirribonucleico (ADN) que fue empleada para estudiar y diferenciar la variación genética del gen *tuf* del fitoplasma '*Candidatus Phytoplasma solani*' (Luci Landi et al 2018). Por su parte Bloch et al 2022 desarrollaron un ensayo basado en qPCR y el HMRA permitió detectar y distinguir los tres subgrupos de fitoplasmas asociados a la enfermedad del Amarillamiento Letal en el cocotero y otras palmas y la enfermedad denominada lethal bronzing en la palma *Phoenix canariensis* en Florida. Sin embargo, para el desarrollo de este ensayo se utilizaron diferentes pares de cebadores para cada cepa.

En un trabajo previo, en nuestro grupo desarrollamos un sistema de detección usando el gen *SecA* como blanco, un par de cebadores y sondas TaqMan para la detección de dos cepas del fitoplasma del AL (Puch-Hau 2020 tesis Mc). Por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos en hacer los primeros ensayos con la técnica de qPCR-HRMA y como blanco el gen *SecA* del fitoplasma del AL con un solo par de cebadores, lo que haría el sistema de detección mucho más sencillo.

1.2 ANTECEDENTES. Y/O MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES

1.2.1 Importancia del Cocotero (*Cocos nucífera* L.)

La palma de cocotero está distribuida en varias áreas tropicales del mundo y es considerada una planta cultivada más importante del mundo, de hecho, se le conoce como el árbol de la vida o de mil usos. Esto se debe a que todas sus partes se pueden utilizar. (Ramos-Hernández, E., et al. 2018). Sin embargo, los productos más importantes son: El fruto, del cual se puede obtener la copra y el agua. De la cobra se puede obtener el aceite, azúcar de coco entre los más importantes. De tal manera el coco es usado para la salud y belleza, ya que contiene fibra, vitaminas y minerales que son sumamente esenciales para nuestro cuerpo.

1.2.2 Fitoplasmas

Los fitoplasmas son patógenos procariotas similares a las bacterias, porque carecen de pared celular, son polimorfos, tienen una simple membrana como cubierta y contienen orgánulos limitados como son las vacuolas pequeñas, ribosomas y grandes plasmodesmos. Estos patógenos no tienen la capacidad genética de sintetizar los nutrientes que necesitan para su metabolismo, por lo tanto, los adquieren de células vegetales, es por ello por lo que provocan diversos problemas en las plantas ocasionando diversas enfermedades como el amarillamiento, clorosis, entre otros. También tienen un ciclo de vida único y por esta razón se empezaron las investigaciones sobre este organismo y del cómo van afectando a las plantas. (Reveles-Torres et al. 2014)

1.2.3 Origen del amarillamiento letal y síntomas

Los fitoplasmas transmiten la enfermedad del amarillamiento letal (AL), por lo tanto, ha ocasionado la muerte de millones de palmas de cocotero, el cual es transmitido por un insecto llamado *Haplaxius crudus*. (Oropeza et al. 2012). Este patógeno habitan en los tubos cribosos del floema de las plantas y son transmitidos de una planta a otra a través de insectos que actúan como vectores. (Ortiz-García, 2018). El amarillamiento letal presenta síntomas en las palmas como la caída del fruto, el amarillamiento en las hojas como aparece en la figura 1, esta empieza comúnmente en las hojas más viejas para después infectar a toda la palma, la palma ya infectada usualmente tarda de 3 a 6 meses para que esta se muera

Si las hojas rápidamente quedan amarillas, es un síntoma de AL, ya que en ocasiones las hojas quedan de ese color de manera natural, si ocurre de manera natural el proceso de coloración usualmente es lenta. (Castillo, M. G. 2001).

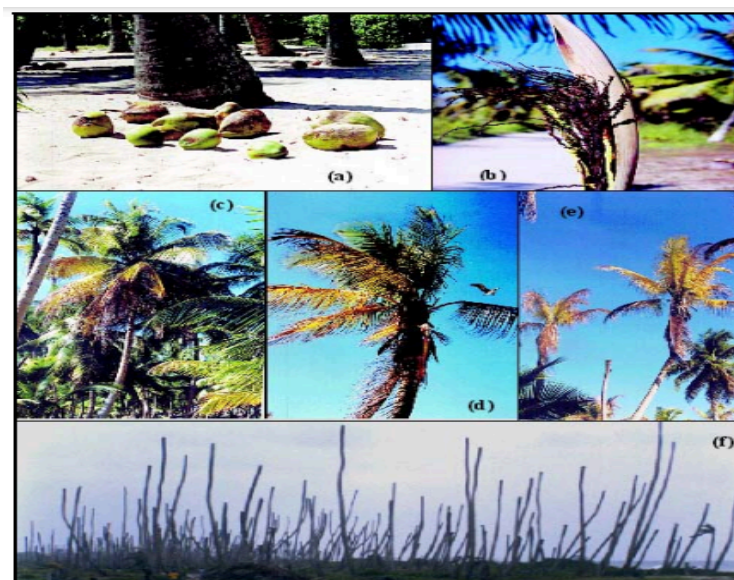


Figura 1. Síntomas de amarillamiento letal del cocotero (Castillo, M. G. 2001).

Variantes del fitoplasma del AL y su determinación

Los fitoplasmas en general se agrupan en más de 30 grupos (en números romanos) de acuerdo a la filogenia del gen 16S ribosomal (Lee et al., 2000). El fitoplasma asociado al amarillamiento letal se encuentra en el grupo 16SrIV-A y se denomina '*Candidatus Phytoplasma palmae*' de acuerdo con la convención de especialistas en el área. Existen otros grupos que afectan a palmas y se denominan en orden alfabético: 16SrIV-B, -D, F, y -E. sin embargo los fitoplasmas predominantes en México son los del grupo 16SrIV-A y -D (Córdova et al., 2017). Para determinar específicamente la cepa que está afectando a las plantas es necesario aislar el ADN del fitoplasma (gen 16Sr), clonarlo y enviarlo a secuenciar para determinar filogenéticamente a que subgrupo o cepa pertenece (Córdova et al., 2017). Este proceso es laborioso y costoso a la vez, por lo que una tecnología que permita que en una sola reacción determine la cepa del fitoplasma sería muy útil para los grupos de investigación que estudian esta enfermedad.

1.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular muy importante para la amplificación de los ácidos nucleicos en general. Pero también es muy utilizada para la detección de patógenos en plantas por ser muy específica, sensible y rápida ya que en poco tiempo te permite analizar un gran número de muestras. Esta técnica fue creada por Kary B. Mullis en los años 1985 y en ese año fue utilizada por primera vez para la detección de la anemia, el cual dio resultados satisfactorios. Es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos. Se usan 2 tipos de PCR, la anidada y la de tiempo real; la anidada necesita de dos ciclos de amplificación, lo cual implica el riesgo de contaminación, por otra parte, la PCR tiempo real solo se necesita una ronda de amplificación, es más factible y rápida. (Skeete, A. O., & Salin, C. M. O. 2018)

Para la realización de la PCR se necesitan de algunos elementos básicos, los cuales son: ADN templado, enzimas, los cebadores, los desoxirribonucleótidos

trifosfatos (dNTPs), el ion magnesio, una solución amortiguadora o buffer y H₂O puro. De igual manera se necesita de secuencias cortas de ADN que son los conocidos como cebadores, los cuales marcan el sitio donde debe iniciar la síntesis. Consta de tres pasos importantes (cambios de temperatura) que se llevan a cabo en el equipo de PCR (termociclador), el primer paso es la desnaturalización del ADN molde a 94°C, segundo paso la hibridación de los cebadores a 50-60°C en el ADN molde y extensión o elongación de la nueva cadena sintetizada por la ADN polimerasa a 72°C.

En el caso de usar ARN mensajero y formar ADN complementario entonces se le conoce como RT-PCR (Transcripción reversa- PCR), la enzima utilizada se llama transcriptasa reversa que es capaz de convertir un ARNm en ADNc.

Para realizar la verificación de amplificación de PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa.

Para la detección de los fitoplasma asociados al AL, se pueden usar diferentes tipos de cebadores como los que se muestran en la tabla de abajo los cuales son las siguientes:

Grado de especificidad	Iniciador	Secuencia (5'→3')	ADN amplificado y tamaño del fragmento
Fitoplasmas en general	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Gen 16S ARNr, inicio del gen 23S ARNr y región espaciadora (1.8 kb)
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
Grupo de amarillamiento letal	LY16Sr	CAGCAGCCGCGGTAATACATA	Secuencia dentro del gen 16S ARNr (1.4 kb)
	16S503F	GCTTACGCAGTTAGGCTGTC	
Amarillamiento letal	LYF1	TCGTTTTGATAATCTTTCATTTGAC	Secuencia de ADN específica del fitoplasma causante del ALC (1.07 kb)
	LYR1	CATATTTTATTTCTTTGCAATCTG	

Figura 2. Iniciadores usados para la detección de fitoplasmas asociados al AL (Cordova et al., 2014).

Por otro lado, el qPCR en tiempo real consiste en la detección de la amplificación del ADN en tiempo real, y esto se logra incorporando un fluoróforo a la reacción. El aparato cuenta con una cámara de detección de fluorescencia. Esta innovación permite que la qPCR sea más rápida y precisa (Gachon et al., 2004) ya que no requiere de verificar la muestra en geles de agarosa, etc. Como la amplificación del ADN se puede detectar de manera temprana principalmente al inicio de la fase logarítmica, se puede cuantificar el ADN inicial por una fórmula sencilla, esto le da una ventaja indiscutible comparado con la PCR convencional (Gachon et al., 2004)

Desde la creación de la PCR, se ha estado utilizando por varias décadas, debido a la facilidad de manejo y a lo rápido que es. Pero para cada análisis se requiere de iniciadores diferentes, depende del resultado que quieres obtener y la enfermedad que quieres detectar en una muestra, ya que esta es usada para la detección de diferentes tipos de enfermedades ya sea en plantas, animales o humanos.

Llevar a cabo de manera correcta la extracción de ADN en las muestras usando el CTAB también influye, ya que así podríamos obtener mejores resultados en la síntesis de ADN en la PCR, de igual forma saber la cantidad de ADN que tiene cada muestra es de suma importancia, ya que en ocasiones la PCR no logra amplificar una enorme secuencia de ADN, es por ello que se diluye la muestra para tener una cantidad pasable de ADN antes de realizar el análisis.

Tipos de detección usando PCR en tiempo real

Para que ocurra la detección de la amplificación del ADN por qPCR es necesario que la duplicación del ADN en cada ciclo se detecte en “tiempo real” para esto es necesario que se agregué un fluoróforo a la reacción de PCR. Este fluoróforo es detectado por una cámara que tiene los filtros adecuados para evitar ruido de fondo (Gachon et al., 2004). El fluoróforo puede ser un colorante como el SYBR Green que se intercala al ADN de manera inespecífica o fluoresceína, que se incorpora a una sonda específica del ADN blanco, con

una molécula apagadora para que no emite señal cuando no este hibridada con su molécula blanco, este tipo de sondas se llama sondas TaqMan. Ambos tipos de detección son los más usados en qPCR (Gachon et al., 2004). Sin embargo, existen otras alternativas como sondas scorpio, molecular beacons, etc. (Gachon et al., 2004)

Detección de fitoplasma del AL por PCR en tiempo real

Desde que estuvieron disponibles los primeros equipos de qPCR se empezó a trabajar en la detección de patógenos, entre ellos los fitoplasmas. El primer reporte se publicó en el año 2004 estudiando el fitoplasma del grupo 16SrIII-H en *Euphorbia pulcherrima* y *Catharanthus roseus* (Christensen et al., 2004). A partir de esa fecha se publicaron los protocolos para otros grupos de fitoplasmas.

En nuestro grupo trabajamos en la detección de los fitoplasmas desde el 2007. En el 2014 publicamos el primer protocolo de detección del fitoplasma asociado al AL utilizando una sonda TaqMan (Córdova et al., 2014). Este protocolo fue más rápido y sensible que el protocolo de PCR anidado convencional.

En nuestro grupo seguimos trabajando en perfeccionar la técnica utilizando luego un gen blanco diferente, el gen *GroEL*, el cual fue detectado utilizando una doble sonda con diferentes fluoróforos, esto nos permitió discernir las dos cepas que predominan en el sureste de México subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D (Córdova et al., 2019). Sin embargo, esta técnica utiliza dos juegos de cebadores y dos sondas diferentes, por lo que la reacción se lleva a cabo en dos tubos separados. Mejoramos aún más el protocolo utilizando el gen *SecA* como blanco el cual sólo diferirá algunas bases entre las cepas. Los cebadores eran los mismos para ambas cepas, sólo las sondas variaron, se puede detectar ambas cepas en el mismo tubo en un momento dado (Puch-Hau G, tesis Mc, 2020). Sin embargo, el costo de las sondas TaqMan podría ser una limitante para este ensayo dado su relativo alto costo.

Uso de la técnica de HRM para la detección de fitoplasmas

El análisis de alta resolución de fusión del ADN es una alternativa barata y muy poderosa que es parte de las ventajas de la qPCR. Esta herramienta se aplica que cuando se finaliza la corrida de qPCR, el ADN amplificado por sus características intrínsecas, tiene una temperatura de fusión dependiendo de su tamaño y secuencia, la resolución es tal, que permite hasta detectar una base de diferencia de acuerdo a Bloch et al., (2022). En resumen, cada amplificador tiene una temperatura de fusión específica. Sin embargo, esta técnica solo puede ser utilizada cuando se agrega SYBR- Green como fluoróforo. Utilizando esta herramienta Bloch et al., (2022) pudieron detectar tres cepas del grupo IV del fitoplasma asociado al amarillamiento letal del cocotero. Para ello utilizaron el gen *SecA* del fitoplasma y diferentes pares de cebadores dependiendo de la cepa.

En nuestro caso también usaremos el gen *SecA*, pero utilizando solo un par de cebadores diseñados en nuestro laboratorio que amplifican las cepas 16SrIV-A y -D, predominantes en nuestra región, esto haría que la metodología de detección fuera aún más sencilla y barata. A este ensayo lo denominaremos: ensayo *SecA* qPCR-HMRA

1.3 JUSTIFICACIÓN

El cultivo del coco es muy importante en nuestro país y en otras partes del mundo. Desafortunadamente este cultivo está siendo amenazado por una enfermedad altamente destructiva conocida como amarillamiento letal o AL. Esta enfermedad es ocasionada por un grupo de patógenos conocidos como fitoplasma y son transmitidos por insectos que se alimenta del contenido del floema. Estos patógenos no se pueden cultivar y generalmente sus títulos son bajos en las palmas. Esto ha dificultado su detección y diagnóstico. Afortunadamente las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR han facilitado su detección e identificación. La detección del fitoplasma causante del AL se ha realizado por medio de PCR anidado, la cual se basa en dos rondas de amplificación, esto se realiza con el propósito de aumentar su sensibilidad. En los últimos años esta detección se ha realizado por PCR en tiempo real la cual ha demostrado ser igual de sensible que la PCR anidada. Por otro lado, el amarillamiento letal afecta no solamente a la palma de coco sino también a otras 35 especies más de palmas, esto ha ocasionado que haya una mayor diversidad del patógeno. En este contexto en esta región están presentes dos de los cinco subgrupos de fitoplasma que afectan a las palmas. Los dos subgrupos son el subgrupo 16SrIV-A y -D. Los síntomas que ocasionan en las palmas son muy parecidos; por lo tanto, para saber qué subgrupo está presente en las palmas se tiene que amplificarlos por PCR anidado y secuenciar para su identificación, esto representa un gran esfuerzo y recursos. Por tal razón el equipo de cocotero está trabajando en el desarrollo de una tecnología conocida como qPCR-HRM que en teoría permitiría detectar e identificar a los subgrupos sin la necesidad de secuenciación.

1.5 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.

1.5.1 Objetivo general

Estandarizar el ensayo SecA qPCR-HMRA para detectar las variantes del fitoplasma del amarillamiento letal en palmas afectadas por la enfermedad

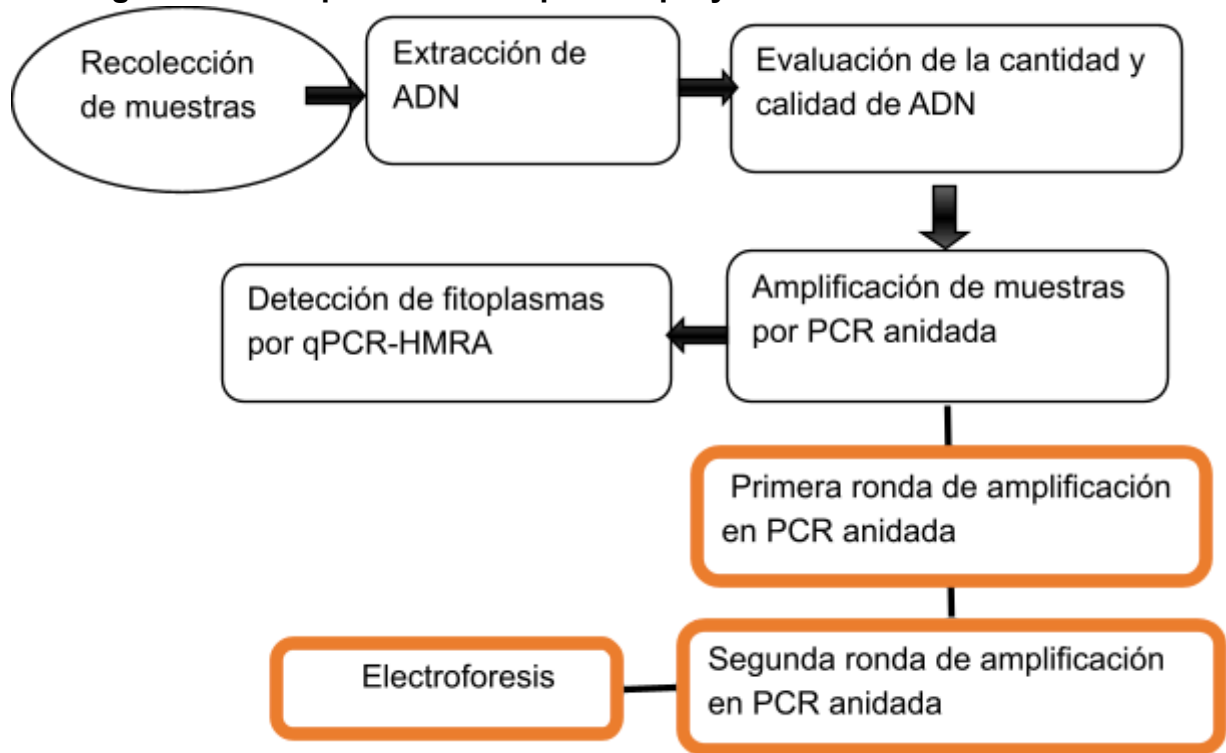
1.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la cantidad y calidad del ADN extraído de palmas de cocotero infectadas por el fitoplasma del AL
- Detectar la presencia del fitoplasma del AL por medio del ensayo SecA qPCR-HMRA en palmas infectadas con diferentes cepas de AL
- Realizar el análisis de alta resolución de fusión de las amplificaciones de ADN de las cepas de fitoplasma

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Diagrama de bloques de las etapas del proyecto.



2.2 Recolección de muestras

Se recolectó el material vegetal de palmas de cocoteros y otras especies de palmas con síntomas tipo amarillamiento letal, estas palmas se ubicaron en el jardín botánico del centro de investigación científica de Yucatán en el mes de marzo y mayo del 2023.

Se muestreó dos tipos de tejidos de la palma de coco. (1) fue el tejido del tronco y (2) las hojas jóvenes. Para la colecta del tejido del tronco se utilizó un taladro eléctrico, con el cual se hizo un orificio en el tronco y se colectó el aserrín en un tubo Falcon que contuvo el amortiguador de extracción CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) para evitar que se finalizará. Los tejidos fueron conservados en refrigeración hasta su uso.

2.3 EXTRACCIÓN DE ADN

2.3.1 Extracción del ADN en la palma de cocotero usando el tejido del tronco

La extracción del ADN del tronco de la palma de coco se realizó de la siguiente manera:

1. La muestra con CTAB se incubó durante 15 min a 65° C en un baño maría.
2. En dos tubos eppendorf se colocó 1ml de la muestra.
3. Se le añadió 1ml de fenol-cloroformo, se mezcló correctamente hasta formar una emulsión.
4. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Se recupera el sobrenadante evitando tocar los residuos, el sobrenadante se transfiere a otro tubo eppendorf de 2 ml.
6. Al sobrenadante se le añadió 400 ml de isopropanol y 40 ml de acetato de sodio, se mezcla suavemente por inversión.
7. Se incubó durante 60 minutos a -20°C.
8. Después de culminar los 60 minutos, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos.
9. El sobrenadante se descartó y se le agregó 500 ml de etanol frío al 70% para lavar la pastilla formada.
10. Se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos.
11. El etanol se descartó en un recipiente cuidadosamente, evitando no botar la pastilla y se dejó secar durante 20 minutos.
12. Finalmente, se le agregó 100 µl de agua ultrapura para poder disolver la pastilla.

2.3.2 Extracción de ADN en el tejido de la hoja

Para la extracción de ADN del tejido de la hoja se usó el nitrógeno líquido, usando la siguiente metodología:

1. Se cortaron fragmentos pequeños de la hoja y se pesó en una balanza 1 g de estas.
2. Se colocaron en un mortero y se pulverizaron con nitrógeno líquido con la ayuda de un pistilo.
3. Al tejido ya pulverizado se le agregó 5 ml del CTAB (previamente calentado a 65°C) para evitar su oxidación.

Nota: si el tejido al momento de pulverizarlo con nitrógeno líquido queda demasiado congelado, se espera a que este quede líquido para posteriormente dar seguimiento al protocolo.

4. En un tubo eppendorf se colocó 1 ml de la muestra y se incubó durante 15 min a 65°C en baño maría.
5. Se le añadió 1ml de fenol- cloroformo y se mezcló correctamente.
6. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos.
7. Se recupera la fase acuosa y se transfiere a otro tubo eppendorf de 1.5 ml.
8. Se le añade 400 µl de isopropanol y 40 µl de acetato de sodio, se mezcla suavemente.
9. Se incuba durante 1 hora a -20°C.
10. Pasada la hora se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min.
11. El sobrenadante se tira y se le agrega 500 µl de etanol al 70% para lavar la pastilla formada.
12. Se centrifugó a 7500 rpm por 5 min.

13. El etanol se derramó cuidadosamente para evitar botar la pastilla y se dejó secar durante 20 min.
14. Posteriormente se le agrega 500 µl de agua ultrapura y se disuelve la pastilla.

Evaluación de la cantidad y calidad del ADN.

Para determinar la cantidad y calidad del ADN extraído de los tejidos de tronco y hoja se empleó el NanoDrop One Thermo Scientific usando 2 µl de la muestra.

Evaluación de calidad del ADN por electroforesis

También se evaluó la calidad de ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Esto se realizó de esta manera:

1. Se pesó 0.35 g de agarosa y se le añadió 35 ml de buffer TAE 1X, se colocó en un matraz.
2. Se pesó en una balanza y se diluyó notando que ya no tenga grumos.
3. Se le agregó 2 ml de bromuro de etidio, se mezcló correctamente.
4. En una bandeja pequeña se colocó la mezcla, se colocó el peine y se quedó por 15 min para que esta pueda quedarse como un gel.
5. Pasado los 15 min se colocó en el equipo de electroforesis y se llenaron las pocetas que se formaron, se usó 5µl del marcador molecular de 1kb y un marcador de pares de bases.
6. Se realizó electroforesis por 30 minutos a un voltaje de 90V.
7. Finalmente se observaron las bandas en un equipo de foto documentación de geles.

2.4 Detección del fitoplasmas por medio de PCR anidado.

La amplificación de ADN extraídos se realizó en una PCR convencional y se realizaron las siguientes rondas:

Primera ronda de amplificación

En esta primera ronda se utilizó 14.75 µl de H₂O, 5 µl de PCR buffer, 0.25 µl de MgCl, 0.5 µl de dNTPs, 1.0 µl de P1 y P7 (cebadores), 0.5 µl de la Taq polimerasa (phire) y 2.0µl de ADN templado, obteniendo un volumen total de 25 µl. Estas se colocaron en un tubo Eppendorff, posteriormente se mezcló en un vortex, se centrifugó por 3 segundos en una microcentrífuga y se colocaron en la PCR convencional.

Segunda ronda de amplificación

En la segunda ronda se diluyó con 200 µl de H₂O la muestra de amplificación de la primera ronda. Se preparó una mezcla utilizando 9.75µl de H₂O, 5 µl de PCR buffer, 0.25 µl de MgCl, 0.5 µl de dNTPs, se usaron 2.0 µl de los cebadores R16F y R16R, 0.5 µl de la Taq polimerasa y 5.0 µl de ADN templado, se obtuvo un volumen de 25 µl en total. Se colocaron en un tubo Eppendorf, se agitó correctamente, se centrifugó en una microcentrífuga por 3 segundos y se llevó a cabo la segunda ronda de amplificación.

2.5 Detección de fitoplasmas por medio del ensayo SecA qPCR-HMRA

La detección de fitoplasmas en las muestras con esta técnica se utilizó el gen SecA como blanco. La máster mix se preparó de la siguiente manera: en un tubo de PCR de 200 µL se le añadieron los siguientes componentes: 6 µl de H₂O, 10 µl de PCR buffer, 1.0 µl de SYBR-Green como fluoróforo, 0.5 µl de los iniciadores SecA Forward y SecA Reverse y 2 µl de ADN templado, se obtuvo un volumen total de 20 µl.

La amplificación del gen *SecA* del fitoplasma se llevó a cabo en el termociclador Rotor Gene plus (QIAGEN), el cual estuvo acoplado a una computadora que contiene un software, que nos permitió monitorear cada ciclo de amplificación y análisis de los resultados. En cada corrida se incluyeron un control negativo y un control positivo, el positivo fue una muestra de palma de cocotero infectada con AL, el cual sirvió para poder verificar que la reacción se realizó de manera correcta. En el control negativo se utilizó agua totalmente pura, en este caso igual se puede utilizar una muestra de palma de cocotero completamente sana.

2.6 Evaluación de los amplicones con la técnica de HRM.

Este análisis se realizó inmediatamente después de la amplificación por PCR en tiempo real, es automático, es decir el mismo equipo lo realiza solamente se tiene que programar. El parámetro más importante es el rango de temperatura al cual se someten las muestras, en este caso fue de 68°C a 90°C.

Para esto se utilizaron los ADNs de muestras de palma de cocotero infectadas con el fitoplasma del AL subgrupo A y muestras de la palma *Phoenix dactylifera* infectada por el fitoplasma del subgrupo D. Estos ADN fueron secuenciados e identificados previamente mediante una prueba de BLAST en el GeneBank

CAPÍTULO 3.

3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN y evaluación de la cantidad y calidad del ADN

La extracción de los ácidos nucleicos de las palmas empleando el CTAB, se logró obtener ADN en ambos tipos de tejido (tronco y hoja) utilizados para la detección del patógeno; sin embargo, la cantidad y calidad fueron distintos. En general el ADN aislado fue mayor en cantidad y calidad en las hojas que en el tronco; pero lo suficiente para ser utilizado en los ensayos de PCR tanto para

PCR anidado como para PCR en tiempo real y poder detectar la presencia del patógeno ya que Cordova et al 2017 pudo detectar al fitoplasma del AL en un 1 ng de ADN total de la palma. Los valores del coeficiente entre 260/280 de las muestras fueron bajos en los tejidos del tronco, pero más altos en los de la hoja. Se sabe que muestras con un coeficiente cercano a 2.0 contiene un ADN de buena calidad y muestras más bajo su calidad es inferior.

Tabla 1
Cantidad de ADN obtenido en diferentes tejidos de palmas

Muestras	ng/μl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
12-7-1 (tronco)	64.5	1.82	2.26
8-15-4 (tronco)	196.4	1.67	1.35
7-8-1 (hoja)	1739.8	1.81	1.71
1-4-6 (tronco)	33.0	1.76	2.52
4-7-4 (hoja)	250.6	1.32	0.55
15-07-16 (tronco)	116.0	1.77	1.52
10-2-8 (hoja)	234.4	1.83	1.00

Por otro lado, también se determinó la calidad del ADN por medio de un gel de agarosa al 1.0%. Figura 3. Gel de agarosa al 1% después de ser corrido (electroforesis) y teñido con bromuro de etidio.

Detección del fitoplasma

Después de ser evaluada la cantidad de ADN de las muestras en algunas de ellas se tuvo que hacer una dilución para poner como templado más o menos 50 ng/μl ya que un exceso puede inhibir la reacción de PCR.

Como se ha comentado en materiales y métodos, la detección del fitoplasma asociado al AL por medio de PCR anidado se tuvo que realizar dos rondas de amplificación. En la primera ronda se emplearon los iniciadores P1 y P7 que son primer generales para fitoplasma y en la segunda ronda se usaron los primer LY 503F/ LY16F que son específicos para el grupo de fitoplasmas del amarillamiento letal. En la Figura 3 se presenta un ejemplo de un gel de agarosa después de haber sido corrido por electroforesis y teñido con bromuro de etidio y fotografiado con el equipo fotodocumentador Gel-Doc de Biorad. Las muestras positivas son aquellas que se observa una banda es decir donde se logró amplificar al patógeno y las negativas no se observa esa banda.

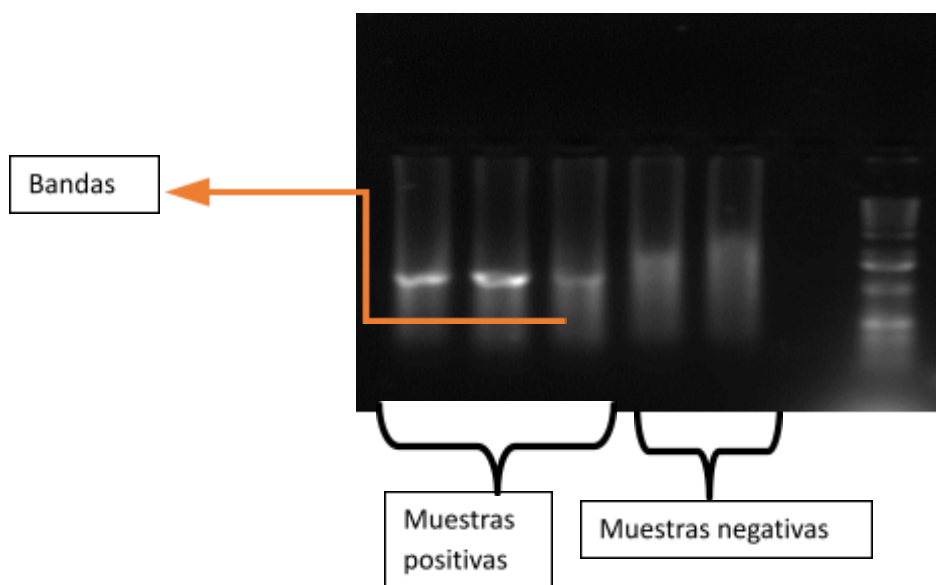


Figura 3. Gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR anidado en muestras de cocotero. Las muestras 1-3 son positivas y la 4 y 5 son negativas, marcador molecular (1KB)

Detección del fitoplasma del AL en PCR tiempo real

En la Figura 4 se muestra la cinética típica de amplificación por PCR en tiempo real; en esta gráfica se presenta la línea base o threshold (línea roja), si la cantidad de fluorescencia (eje Y) emitida por una muestra está por debajo de la línea base la muestra se considera negativa, por el contrario, si está por arriba la muestra se cataloga positiva. En el eje X están los ciclos de amplificación, es decir cuántos ciclos tuvo que pasar para que una muestra rebase la línea base o umbral, esto se le conoce como Ct (ciclo umbral). En la Tabla 2 se presentan

los resultados de un análisis de palmas de cocotero con el sistema qPCR SYBR- Green. Muestras con un Ct = < a 30 Ct se considera como resultado positivo de acuerdo con nuestros parámetros establecidos por Cordova et al, 2014.

Tabla 2
Resultados de PCR tiempo real

Palmas evaluadas	Ct
12-7-1	25.15 (+)
8-15-4	23.6 (+)
10-2-8	23.23 (+)
1-4-6	29.55 (+)
15-07-16	26.40 (+)
Control positivo	25.42
Control negativo	35.56

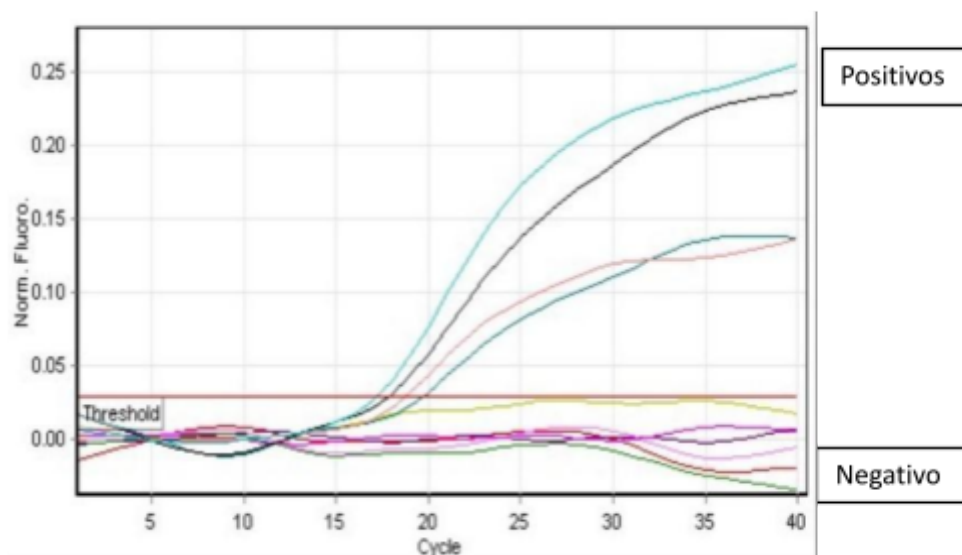


Figura 4. Las que cruzan la línea umbral son consideradas positivas y las que no son negativas, es decir; no están infectadas por amarillamiento letal

Análisis con la técnica HRM.

Como se puede observar en la figura 5 se formaron dos picos de temperatura bien definidos. El pico con la temperatura de 71°C corresponde al fitoplasma del subgrupo D y el otro pico a 72.4°C corresponde al del subgrupo A. Estos resultados, aunque preliminar demuestran que el HRMA es capaz de mostrar la variación genética que existe en gen SecA de los fitoplasmas causantes de las enfermedades tipo amarillamiento letal en palmas.

Tabla...Palmas utilizadas para la realización del análisis de alta resolución de fusión del ADN			
Muestras analizadas	Especie de palma	Cepa de fitoplasma	Temperatura de fusión del amplicón (°C)
1	<i>Cocos nucifera</i>	16SrIV-A	72.18
2	<i>Cocos nucifera</i>	16SrIV-A	72.11
3	<i>Cocos nucifera</i>	16SrIV-A	72.3
4	<i>Cocos nucifera</i>	16SrIV-A	72.15
5	<i>Cocos nucifera</i>	16SrIV-A	72.01
6	<i>Adonidia merrillii</i>	16SrIV-A	72.01
7	<i>Adonidia merrillii</i>	16SrIV-D	71.10
8	<i>Adonidia merrillii</i>	16SrIV-D	71.31
9	<i>Phoenix dactylifera</i>	16SrIV-D	71.40
10	<i>Phoenix dactylifera</i>	16SrIV-D	71.12
11	<i>Phoenix dactylifera</i>	16SrIV-D	71.01
12	<i>Phoenix dactylifera</i>	16SrIV-D	71.21

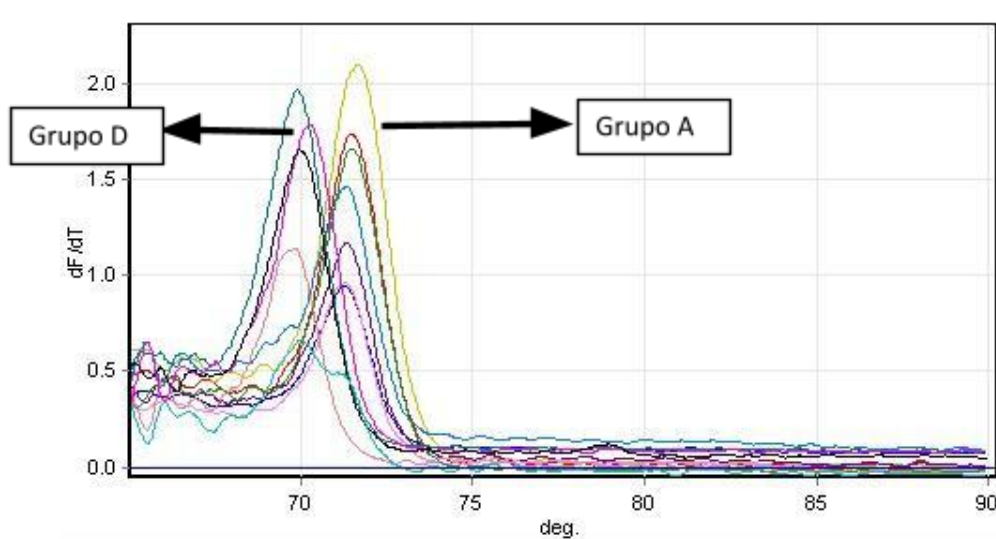


Figura 5. Análisis de alta resolución de fusión de productos de PCR del gen *SecA* de fitoplasmas asociados a las palmas. En esta gráfica se puede observar dos picos de temperatura que corresponden a los dos subgrupos 16SrIV-A y -D.

DISCUSIÓN

Se realizaron análisis en varios tipos de palmas, en algunas presentaban los síntomas del AL pero no estaban infectadas y para investigaciones futuras se podrán usar como un control negativo del AL.

De igual manera los análisis demuestran que la técnica HRMA facilita la detección del AL en la palma de cocotero y en otros tipos de plantas que presentan los síntomas de esta enfermedad. Los resultados que se obtuvieron al realizarse los análisis dependieron mucho de la cantidad y la calidad del ADN, el cual facilitó la detección del fitoplasma. El ensayo *SecA* utilizado ayudó a detectar más rápido el fitoplasma con dos iniciadores *SecA* Forward y *SecA* Reverse.

CAPÍTULO 4.

CONCLUSIONES

Las técnicas moleculares para el diagnóstico del AL y otras aplicaciones son muy sensibles y específicas para la detección de los fitoplasma causantes del AL.

El ensayo SecA qPCR-HMRA desarrollada en el presente trabajo puede identificar las cepas del fitoplasma del AL 16SrIV-A y-D en un solo paso y utilizando un solo par de cebadores

La implementación del ensayo SecA qPCR-HMRA facilitará la identificación de los distintos subgrupos de fitoplasma que afectan al cocotero y otras palmas ayudando a entender el patosistema de la enfermedad del amarillamiento letal.

Referencias Bibliográficas.

- Camarena Gutiérrez, G., & Torre Almaraz, R. (2008). Fitoplasmas: síntomas y características moleculares. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 14(2), 81-87.
- Castillo, M. G. (2001). Estudio básico de la variabilidad genética del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en Honduras. 102 páginas.
- Córdova, C. Oropeza, C. Puch-Hau, N. Harrison, A. Collí-Rodríguez, M. Narvaez, G. Nic-Matos, C. Reyes and L. Sáenz. (2014), A real- time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasma of group 16SrIV subgroup A, D and E found in the Americas. *Journal of Plant Pathology* **96** (2), 343-352.
- De Cartagena Upct, U. P. (2020, 10 septiembre). Test PCR para empresas en laboratorios del IBV. unidad politecnica de cartagena. https://www.upct.es/destacados/cdestacados.php?c=15&ubicacion=general&id_buscar=12542
- Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47, 388-390.
- Iván Córdova¹ & Carlos Oropeza¹ & Nigel Harrison² & Sandra Ku-Rodríguez¹ & Carlos Puch-Hau¹ & María Narváez¹ & Luis Sáenz¹ (2019) Simultaneous detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas (group 16SrIV) by real-time PCR assays using 16Sr- and GroEL-based TaqMan probes. *Journal of Plant Pathology*.
- Jung, R., Soondrum, K., & Neumaier, M. (2000). Quantitative pcr. Manager. (s. f.). Cocos nucifera L. Nature. <http://www.asia-medicinalplants.info/cocos-nucifera-l/>

- Mejía Rodríguez, F. O. (2007). *Validación de dos técnicas para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero por la reacción en cadena de la polimerasa y caracterización molecular de fitoplasmas asociados a esta enfermedad en Guatemala por polimorfismo de largo de fragmentos de restricción* (Doctoral dissertation, Universidad del Valle de Guatemala). 78 páginas.
- Montenegro, V. E. C. (2020). Estandarización de una PCR para detectar Fowl Adenovirus tipo 4 (FADV-4) en Farvet S.A.C. Engormix. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/estandarizacion-pcr-de-tectar-fowl-t45434.htm>
- Oropeza, C., Myrie, W., Roca, M. M., Aguilar, E., Sáenz, C. L., Narvaez, M., ... & Harrison, N. (2012). Avances recientes en el estudio del amarillamiento letal del cocotero.
- Ortiz-García, C. F. (2018). MANEJO DEL AGROECOSISTEMA COCOTERO, CON ÉNFASIS EN EL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (Cocos nucifera L.). Agro Productividad, 11(1).
- Ramos-Hernández, E., Torres De La Cruz, M., Leshner-Gordillo, J., Magaña-Alejandro, M. A., Oropeza-Salín, C., & Ortiz-García, C. F. (2018). MANEJO DEL AGROECOSISTEMA COCOTERO, CON ÉNFASIS EN EL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (Cocos nucifera L.). AGROProductividad, 11(1).
- Reveles-Torres L.R., Velásquez-Valle, R., y Mauricio-Castillo, J.A. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. Folleto Técnico Núm 56. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 41 páginas

- SKEETE, A. O., & SALIN, C. M. O. (2018). Establecimiento de protocolos para el intercambio de germoplasma de cocotero resistente a amarillamiento letal en América Latina y el Caribe (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. 9 páginas.
- Graciano Puch Hau. Uso de diferentes genes para una mejor diferenciación del 'Candidatus *Phytoplasma palmae*' en la península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Luis Sáenz. Maestría. Agosto 2017-21 agosto 2020.
- Lee I, Davis R, Gundersen-Rindal D (2000) *Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes*. *Annu Rev Microbiol* 54:221–255
- Córdova-Lara I, Mota NL, Puch HC et al (2017) Detection and identification of lethal yellowing phytoplasma 16SrIV-A and D associated with *Adonidia merrillii* palms in Mexico. *Australas Plant Path* 46:389–396
- Gachon C, Mingman A, Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of experimental Botany*, 55:1445-1454
- Christensen N., Nicolaisen M., Hansen M., Schulz A., 2004. Distribution of phytoplasma in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1175-1184.
- Córdova I, Oropeza C, Puch-Hau C, Harrison N, Collí-Rodríguez A, Narvaez M, Nic-Matos G, Reyes C, Sáenz L (2014) A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing *Phytoplasma* of group 16SrIV subgroups a, D and E found in the Americas. *J Plant Pathol* 96(2):343–352

Córdova I, Oropeza C, Harrison N, Ku-Rodríguez S, Puch-Hau C, Narvaez M, Sáenz L (2019). Simultaneous Detection of Coconut Lethal Yellowing Phytoplasmas (Group 16SrIV) by Real-Time PCR Assays Using 16Sr- and GroEL-Based TaqMan Probes. *Journal of Plant Pathology*. 101: 609-619.

Graciano Puch Hau. Uso de diferentes genes para una mejor diferenciación del 'Candidatus *Phytoplasma palmae*' en la península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Luis Sáenz. Maestría. Agosto 2017-21 agosto 2020.

Bloch M, Helmick EE, Bahder BW (2022). Differentiation of Palm-Infecting Phytoplasmas in the Caribbean Basin Using High Resolution Melt Curve Analysis of the *secA* Gene. *Plant Disease* 106 (9).

Recomendaciones:
Cuadros y figuras.

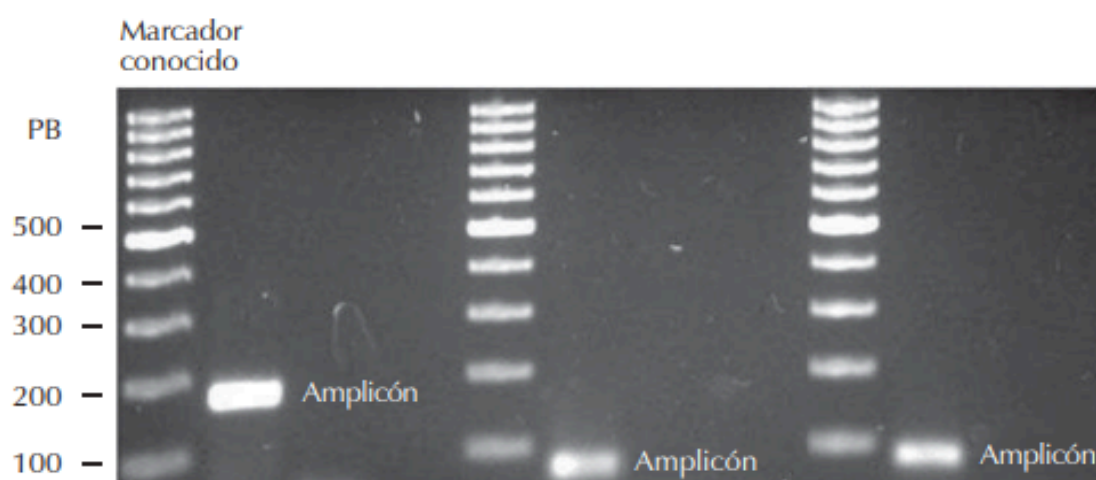


Figura 6. Un gel de agarosa donde se muestra los diferentes tamaños de los productos amplificados por (Iván Cordova 2022)

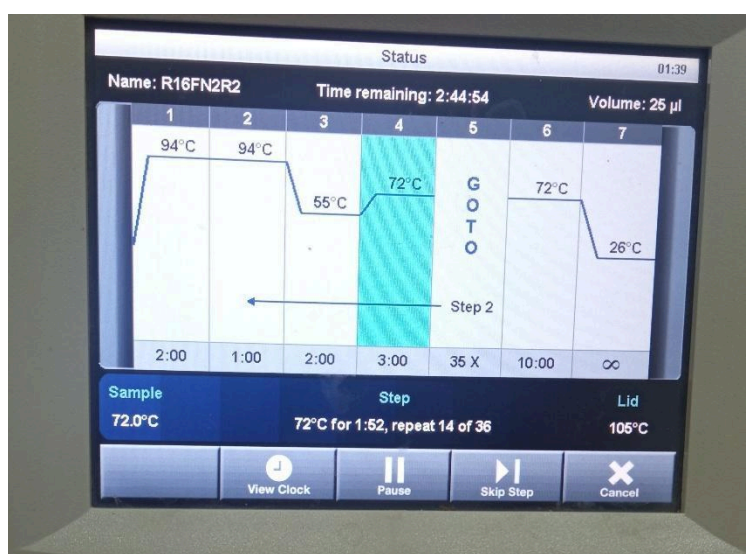


Figura 7. Display principal de equipo de PCR Bio Rad T100 Thermal Cycler Parámetros usados para la PCR anidada (Cordova, 2023)