



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE *Haplaxius crudus* COMO
POSIBLE TRANSMISOR DE FITOPLASMAS DEL
GRUPO 16Sr-IV A LA PALMA *Pritchardia pacifica***

Tesis que presenta

RAFAEL CÉSAR SÁNCHEZ BORGES

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Octubre 2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado *EVALUACIÓN DE Haplaxius crudus* COMO POSIBLE TRANSMISOR DE FITOPLASMAS DEL GRUPO 16Sr-IV A LA PALMA *Pritchardia pacifica* fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

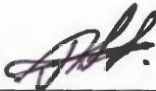
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Octubre 2014.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Biol. RAFAEL CÉSAR SÁNCHEZ BORGES

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán**, por darme el apoyo y la oportunidad de realizar el trabajo de investigación de esta tesis.

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas**, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación como Maestro en Ciencias.

A la **Unidad de Biotecnología**, por brindarme las instalaciones y equipos necesarios para lograr desarrollar el proyecto de Tesis.

A **CONACYT** por la beca de manutención No. 271049

A los Proyectos **CFC: FIGOOF/22** y el de **Ciencia básica (CONACyT) CB-2009129717** que financiaron este trabajo.

Al **Dr. Carlos Oropeza**, por darme la oportunidad y la confianza de ser parte de este gran grupo de trabajo. Muchas gracias por su paciencia y generosidad.

Al **Dr. Luis Sáenz**, por brindarme su apoyo en los procesos académicos. Gracias por su tiempo y paciencia. Gracias.

Al **Dr. Jorge Santamaría, Dr. José Tun y Dr. Gabriel Lizama**, por brindarme su tiempo y paciencia en la revisión de la Tesis de Maestría

A la **M. en C. María Narváez**, por brindarme su tiempo y paciencia durante todo el trabajo de tesis; Gracias brindarme su amistad.

Al **M. en C. Iván Córdova**, por brindarme su sabiduría y conocimiento tanto en el trabajo como en la vida. Gracias.

Al **M. en C. Carlos Puch**, por brindarme su tiempo y conocimientos. Gracias.

A la **I.B.Q. Ana Collí**, por brindarme su tiempo y ayuda en el laboratorio. Gracias.

A mis **Amigos**, gracias por brindarme su amistad y apoyarme incondicionalmente. Muchas gracias.

DEDICATORIAS

A **Dios**, Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mi madre **Leydi Graciela**, por brindarme su amor, cariño y comprensión sin pedir nada a cambio, me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor; y por haber fomentado mi deseo de superación en la vida.

A mi padre **Rafael César**, por su trabajo duro para darnos el sustento, por dar ejemplo de constancia y perseverancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien; y por haber fomentado mi anhelo de triunfo en la vida y por su amor.

A mis **Hermanos**, Por qué siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por su apoyo y amistad.

A mis **Abuelos**, por ser el más perfecto ejemplo del amor eterno, por mostrarme su gran amor y cariño, por enseñarme la alegría de vivir y darme un ejemplo de vida. Les quiero.

A mis **Tíos y Tías**, Por brindarme su cariño y alegría, y por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida.

“Dedico especialmente esta tesis a Lorena, muchas gracias por tu apoyo, cariño y comprensión, gracias por inspirarme a superarme a mí mismo, eres sin duda la persona más importante en mi vida”.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	7
ANTECEDENTES	7
1 FITOPLASMAS	7
1.1 DESCUBRIMIENTO Y ORIGEN	8
1.2 CLASIFICACIÓN	8
1.3 SÍNTOMAS ASOCIADOS A FITOPLASMAS	9
1.4 CICLO DE VIDA	10
1.5 VECTORES	10
2 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO	12
2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	14
2.2 HOSPEDEROS	15
2.3 SINTOMATOLOGÍA	16
2.4 DETECCIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES	17
2.5 HAPLAXIUS CRUDUS	19
3 EVIDENCIAS DE HAPLAXIUS CRUDUS COMO POSIBLE VECTOR DEL AL	23
3.1 EXPERIMENTOS DE TRANSMISIÓN EN FLORIDA, E.U.A.	23
3.2 EXPERIMENTOS DE TRANSMISIÓN EN TABASCO, MÉXICO	26
3.3 EXPERIMENTOS DE TRANSMISIÓN <i>IN VITRO</i>	27

HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
Capítulo II.....	35
ENSAYO DE TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS DEL GRUPO 16SR.IV EN LA PALMA <i>PRITCHARDIA PACIFICA</i>	
2.1. INTRODUCCIÓN.....	35
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.2.1 DISEÑO Y CARACTERÍSTICAS DE LA JAULA.....	37
2.2.2 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	38
2.2.3 COLECTA DE <i>HAPLAXIUS CRUDUS</i>	39
2.2.4 ANÁLISIS MOLECULARES.....	41
2.2.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL.....	41
2.2.4.2 DETECCIÓN DE FITOPLASMAS.....	42
2.2.4.3 CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN, ANÁLISIS POR RFLP'S Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	42

2.3. RESULTADOS.....	44
2.3.1. ENSAYO #1.....	44
2.3.1.1. COLECTA DE <i>H. CRUDUS</i>	44
2.3.1.2. DETECCIÓN POR PCR-TR.	45
2.3.2. ENSAYO #2.....	46
2.3.2.1. COLECTA DE <i>H. CRUDUS</i>	46
2.3.2.2. DETECCIÓN POR PCR-TR.	47
2.3.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	49
2.3.3.1. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS POR RFLP'S.....	49
2.3.3.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	51
2.4. DISCUSIÓN.	53
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	55
Capítulo III	57
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	
3.1. CONCLUSIONES.....	57
3.2. PERSPECTIVAS.....	59

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Fitoplasmas invadiendo las células de la planta.....	7
Figura 2. Plantación de cocotero devastada por el amarillamiento letal.....	12
Figura 3. Distribución actual del AL.....	14
Figura 4. Sintomatología del AL.....	17
Figura 5. Alimentación de <i>Haplaxius crudus</i>	19
Figura 6. Hembra y Macho de <i>H. crudus</i>	21
Figura 7. Ciclo de vida de <i>H. crudus</i>	22
Figura 8. Jaulas control y jaulas de <i>H. crudus</i> en Florida, USA.....	24
Figura 9. Jaulas del ensayo de transmisión Tabasco.....	25
Figura 10. Jaulas del ensayo de transmisión en el CICY.....	26
Figura 11. Esquema del diseño de la jaula.....	37
Figura 12. Pritchardia en Viveros.....	38
Figura 13. Pritchardia en CICY.....	39
Figura 14. Thrinax en Chicxulub puerto.....	39
Figura 15. Haplaxius alimentandose de la palma y los tubos de captura.....	40
Figura 16. Jaulas del ensayo #1 de Transmisión.....	44
Figura 17. Jaulas del ensayo #2 de Transmisión.....	46
Figura 18. Pritchardia 3-01 y3-03 con necrosamiento en la hoja espada.....	47
Figura 19. Geles Virtuales.....	50
Figura 20. Árbol Filogenético.	52

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Subgrupos de fitoplasmas asociados al grupo 16SrIV.....	13
Cuadro 2. Especies de palmas susceptibles a la enfermedad del AL en Florida.....	15
Cuadro 3. Abundancia de las poblaciones de <i>H. crudus</i> en el año 2011.....	44
Cuadro 4. PCR Tiempo Real del ensayo de transmisión #1 en Pritchardia.....	45
Cuadro 5. Abundancia de las poblaciones de <i>H. crudus</i> en el año 2012.....	46
Cuadro 6. PCR Tiempo Real del ensayo de transmisión #2 en Pritchardia.....	48
Cuadro 7. Análisis BLAST del ensayo de transmisión #1 en Pritchardia.....	49
Cuadro 8. Análisis BLAST del ensayo de transmisión #2 en Pritchardia.....	49

ABREVIATURAS

Amarillamiento Letal	AL
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.	CICY
Cetyl trimethylammonium bromide	CTAB
Deoxynucleotide Triphosphates	DNTP
Micoplasmas	MLO
National Center for Biotechnology Information	NCBI
Polymerase Chain Reaction	PCR
PCR – Tiempo Real	PCR-TR

RESUMEN

Los fitoplasmas son parásitos obligados en las plantas que carecen de pared celular y se encuentran clasificados en 28 grupos distintos. Entre estos parásitos se encuentra el Amarillamiento Letal del cocotero (AL), el cual pertenece al grupo 16SrIV y a su vez dividido en seis subgrupos diferentes (A, B, C, D, E y F) que causa la muerte de alrededor de 35 especies diferentes de palmas. En años pasados se determinó al insecto *Haplaxius crudus* como vector del AL en Florida, lo cual fue verificado mediante ensayos de transmisión; sin embargo, en México no se ha logrado la transmisión de fitoplasmas y la única evidencia ha sido la detección de insectos positivos por medio de la técnica PCR NESTED y ensayos de transmisión empleando plántulas *in vitro*. Para determinar al vector del AL en México, en el presente trabajo se realizaron ensayos de transmisión por medio de jaulas a prueba de insectos, colocándose en el interior palmas *Pritchardia pacifica*, altamente susceptibles a la enfermedad, e introduciendo poblaciones del insecto *H. crudus* colectados en localidades donde se encontró la presencia del AL. Después de unos cinco meses la detección por PCR-TR (Tiempo Real) evidenció que los insectos son capaces de transmitir fitoplasmas del grupo 16SrIV a las palmas evaluadas. La secuenciación de los productos de PCR demostró que los insectos son capaces de transmitir los subgrupos A y D reportados por primera vez en la palma de *P. pacifica*. Estos resultados aportan evidencia de que *H. crudus* como vector del amarillamiento letal del cocotero en México.

ABSTRACT

The phytoplasmas are obligate parasites on plants that lack cell wall and are classified in 28 different groups. These parasites include the lethal yellowing of coconut palm (LY), which belongs to the 16SrIV group and in turn divided into six different subgroups (A, B, C, D, E and F) causing the death of around of 35 different species of Palms. In last years determined the insect *Haplaxius crudus* as vector of the LY in Florida, which was verified by tests of transmission; However, the transmission of phytoplasmas has not been achieved in Mexico and the only evidence has been positive using NESTED PCR insect detection and testing of transmission using *in vitro* seedlings. To determine the vector of the LY in Mexico, in this paper were carried out trials of transmission through insects-proof cages, standing inside Palms *Pritchardia pacifica*, highly susceptible to the disease, and introducing populations of the insect *H. crudus* collected at sites where it was found the presence of the LY. After about five months the detection by PCR-TR (Real time) showed that insects are able to transmit phytoplasmas of the 16SrIV group to the evaluated palms. The sequencing of PCR products showed that insects are capable of transmitting the subgroups A and D reported for the first time in the Palm of *P. pacifica*. These results provide evidence that *H. crudus* as vector of lethal yellowing of coconut palm in Mexico.

INTRODUCCIÓN

Los Fitoplasmas son parásitos obligados del floema transmitidos por insectos chupadores de las plantas, teniendo un ciclo de vida en el hospedante como el vector. No se ha logrado cultivarlos *in vitro* por lo que su caracterización y estudio ha sido limitado (Lee *et al*, 2000). Son patógenos que colonizan un amplio espectro de hospedantes y vectores, y muestran una gran especificidad en estos incluyendo los tejidos que infectan (Fletcher *et al*, 1998; Razin *et al*, 1998). Las plantas infectadas presentan una amplia gama de síntomas que surgen a raíz de cambios en el balance de las hormonas vegetales, desordenes en las funciones del floema y alteración del contenido de savia (Chang, 1998). Actualmente están clasificados en 28 grupos y más de 50 subgrupos que incluyen las diversas enfermedades que ocasionan en la mayoría de especies de plantas (Davis y Sinclair, 1998; Wei *et al*, 2007). Se conoce que los insectos vectores de estos patógenos son insectos que pertenecen al orden Hemiptera los cuales en su mayoría se alimentan del tejido vascular de las plantas (Weintraub y Beabland, 2006).

Entre los diversos fitoplasmas, encontramos al Amarillamiento letal del cocotero que se describe como la enfermedad más devastadora no solo en la palma de cocotero y sus diferentes variedades sino que también a 35 especies diferentes de palmas (Harrison y Oropeza, 2008). Este fitoplasma en particular está clasificado en el grupo 16SrIV y consta de seis subgrupos diferentes (A, B, C, D, E y F) los cuales son patógenos de diferentes géneros de palmas (Harrison y Oropeza, 2008) (Dollet *et al*, 2009).

El vector conocido de esta enfermedad es el insecto *H. crudus*, distribuido donde se encuentra la enfermedad en las palmas. Fue corroborado como tal por medio de ensayos de transmisión realizados en Florida empleando ensayos de transmisión con jaulas y su método de detección del patógeno fue por medio de observación de síntomas y microscopia electrónica; este trabajo fue la única evidencia de transmisión del AL por medio de este insecto y hasta la fecha no se ha logrado reproducir (Harrison, 1987) (Harrison y Oropeza, 2008).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, estudios de PCR han detectado la presencia de este patógeno en el tejido de los insectos corroborando que pueden transportar la enfermedad pero aún no se sabe si este lo transfiere a las palmas por medio de su alimentación (Harrison y Oropeza 1995). A pesar de estos antecedentes aún se sabe muy poco de la transmisión de estos fitoplasmas por medio de este insecto, por lo cual en el presente trabajo se concentrara en establecer si este insecto es capaz de transmitir los fitoplasmas del grupo 16SrIV a las palmas a evaluar.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. FITOPLASMAS

Existen organismos procariontes endocelulares fitopatogénicos que carecen de pared celular denominados Fitoplasmas (antes conocidos como organismos tipo micoplasmas), estos son transmitidos por insectos que se alimentan del floema de las plantas donde se alojan. Al ser parásitos obligados del floema estos no han podido ser cultivados *in vitro* por lo que su caracterización y estudio ha sido limitado (Lee *et al*, 2000). El genoma de los fitoplasmas es extremadamente pequeño pero poco se sabe de él, se piensa que la disminución de su genoma está relacionado por su especificidad parasítica a las plantas hospedantes por el cual perdieron genes referentes a rutas metabólicas importantes (Lee *et al*, 1998).

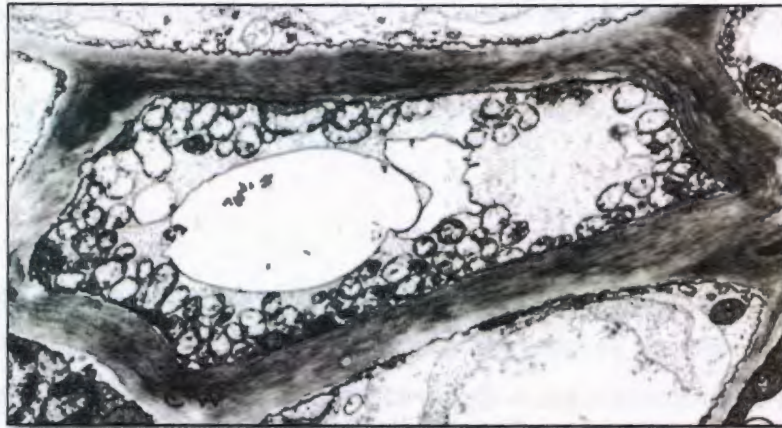


Figura 1. Fitoplasmas invadiendo las células de la planta

1.1. Descubrimiento y Origen

Se creía que las enfermedades con síntomas de amarillamiento y enanismo eran causadas por la presencia de virus, aunque no se había logrado asociar a alguna partícula viral para estos síntomas. Fue hasta 1967 que se descubrió que unos microorganismos sin pared celular eran los causantes de la enfermedad de amarillamiento letal, fueron llamados organismos tipo micoplasmas (MLO). Este descubrimiento generó un entendimiento más claro en muchas enfermedades con síntomas de amarillamiento, enanismo y entre otras que no habían sido asociados a un patógeno. En 1997 recibieron el nombre de fitoplasmas para denotarlos colectivamente ya que formaban claramente un grupo monofilético y por lo tanto, merecían un nombre propio (Welliver, 1999; Lee *et al*, 2000).

Los fitoplasmas son patógenos que colonizan un amplio espectro de hospedantes y vectores, y muestran una gran especificidad en estos incluyendo los tejidos que infectan (Fletcher *et al*, 1998; Razin *et al*, 1998). Están relacionados filogenéticamente con las eubacterias gram-positivas, de las cuales evolucionaron retrógradamente por una drástica reducción de su genoma, en la cual perdieron muchas de sus habilidades biosintéticas (Woese, 1987; Oshima *et al*, 2004).

1.2. Clasificación

Los fitoplasmas como parásitos obligados que carecen de pared celular no han logrado ser cultivados *in vitro* por lo tanto los criterios fenotípicos que son empleados para la caracterización de microorganismos (postulados de Koch) no pueden ser empleados en estos, lo cual limita el entendimiento de estos fitopatógenos. Los fitoplasmas están agrupados de la siguiente manera: Super reino: Bacteria, Filum: Tenericutes, Clase: Mollicutes, Orden Acholeplasmatales, Familia: Acholeplasmataceae, Genero: *Candidatus Phytoplasma* (Davis and Sinclair, 1998; Bertaccini, 2007; Wei *et al*, 2007).

Con el desarrollo de pruebas moleculares como la clonación de fragmentos específicos del ADN del fitoplasma y el desarrollo de iniciadores específicos para fitoplasmas utilizados en la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's), han permitido detectar e identificar con mayor eficacia una gran cantidad de distintos

fitoplasmas y realizar estudios de sus interrelaciones genéticas. Los patrones de RFLP's permitió clasificar a los fitoplasmas de manera rápida y económica en 18 grupos y 50 subgrupos. Actualmente se pueden realizar digestiones de sitios de restricción *in silico* permitiendo obtener patrones de RFLP's virtuales, estos análisis permitieron obtener 10 nuevos grupos y numerosos subgrupos más, muchos de los cuales no habían podido ser clasificados (Davis y Sinclair, 1998; Wei *et al*, 2007).

1.3. Síntomas asociados a fitoplasmas

Los fitoplasmas son causantes de un gran número de enfermedades en cientos de especies de plantas, incluyendo las de mayor importancia económica para el hombre (Lee *et al*, 2000). Las plantas infectadas presentan una amplia gama de síntomas que surgen a raíz de cambios en el balance de las hormonas vegetales y reguladores de crecimiento, desordenes en las funciones del floema y alteración del contenido de savia (Chang, 1998). Entre los síntomas inducidos por fitoplasmas podemos encontrar la proliferación de brotes axilares, reverdecimiento de las flores, modificación de los pétalos y sépalos en estructuras parecidas a hojas, siendo terriblemente desastrosos en la reproducción de las plantas (Welliber, 1999).

Entre los síntomas externos podemos encontrar elongaciones anormales o entrenudos muy delgados, enanismo generalizado, hojas decoloradas, amarillas o rojizas, enrollamiento de las hojas y caída de frutos (Lee *et al*, 2000). Los síntomas presentes en las plantas varían de acuerdo al fitoplasma y con la etapa de la infección. También existen síntomas internos, tal es el caso de la necrosis en los tejidos del floema y a menudo, un exceso en la acumulación de tejidos floemáticos resultando en hinchamientos por acumulación de carbohidratos en las hojas maduras, disminución del contenido de almidones e inhibición de la fotosíntesis (Christensen *et al*, 2005).

1.4. Ciclo de vida

A pesar de la imposibilidad de poder cultivar a los fitoplasmas *in vitro*, no impide los estudios referentes sobre su biología que es única en comparación de otras bacterias fitopatógenos. Para su ciclo de vida requieren de diversos hospedantes para su replicación, sobrevivencia y dispersión; otra característica importante peculiar de los fitoplasmas es que son capaces de multiplicarse en insectos y plantas organismos de dos reinos diferentes. La transmisión de fitoplasmas está estrechamente ligada a insectos fitopatógenos (Bartaccini, 2007; Hogenhout, *et al*, 2008).

Los fitoplasmas se encuentran principalmente en el floema, donde se alimentan indiscriminadamente de los nutrientes de la planta (Christensen *et al*, 2004). Son transmitidos a otras plantas por medio de insectos chupadores de savia pertenecientes al orden Hemiptera (Cicadellidae, Cixiidae, Cercopidae, Psyllidae, Fulgoridea). También se sabe que los fitoplasmas se pueden transmitir por los embriones de las plantas así como en la descendencia de los insectos (Weintraub y Beabland, 2006). Los fitoplasmas son transferidos a las células del floema por medio de estos insectos vectores, logran dispersarse sistemáticamente en toda la planta debido a su pequeño tamaño que es capaz de atravesar los poros cribosos. Los fitoplasmas se pueden encontrar en los tejidos de los insectos intra y extracelularmente, pasando por el sistema digestivo hasta alcanzar las glándulas salivales donde se transmitirá a la planta de la cual se alimenta el insecto (Christensen *et al*, 2004; Hogenhout, *et al*, 2008).

1.5. Vectores

El orden Hemiptera es el grupo reconocido como transmisores exitosos de fitoplasmas. La eficiencia para transmitir fitoplasmas recae en sus características biológicas: por ser hemimetábolos, transmitiendo fitoplasmas en los estados inmaduros (ninfas) y en los maduros ya que estos se alimentan de manera similar; específicamente y selectivamente en ciertos tejidos de las plantas, también influye en alimentarse sin causar daños físicos a la planta lo cual evita la activación de mecanismos de defensa. Por otra parte, la evidencia sostiene que los fitoplasmas son parásitos obligados, generando una simbiosis con sus vectores logrando sobrevivir y propagarse en el interior de los insectos e incluso por transmisión transovárica. Los experimentos de transmisión proveen una evidencia

convinciente en la evaluación de vectores candidatos y los pone a prueba en condiciones cercanas a la naturaleza (Weintraub y Beabland, 2006).

Los fitoplasmas son parásitos obligados del floema de las plantas, por lo tanto, solo los insectos que se alimenten del floema se vuelven propensos a adquirir y transmitir los fitoplasmas. Las especies de vectores están normalmente agrupados en cuatro familias de fulgoridos: Cixiidae, Delphacidae, Derbidae y una especie en Flatidae (Weintraub y Beabland, 2006).

Los insectos que se alimentan del floema adquieren los fitoplasmas pasivamente durante su alimentación. La duración de la alimentación es un factor importante en la adquisición de los fitoplasmas y estos dependerán de una especie a otra. Posteriormente, hay un periodo de latencia entre la adquisición inicial y la capacidad de transmitir los fitoplasmas, normalmente llamado periodo de incubación. En ese tiempo los fitoplasmas se multiplican en los tejidos internos de los insectos, luego estos alcanzan las glándulas salivales donde son liberados durante la alimentación infectando a la planta (Weintraub y Beabland, 2006).

Las interacciones entre los insectos y los fitoplasmas son bastante complejas y variables. Por una parte hay referencias de que más de un insecto es portador de un tipo de fitoplasma, mientras que hay reportes de que un insecto es capaz de transmitir de dos o más fitoplasmas. Las interacciones entre vector-parasito generan efectos benéficos, perjudiciales o neutrales en términos de impacto a la salud de insecto vector. Entre los perjudiciales encontramos una disminución en la esperanza de vida del insecto, estos efectos perjudiciales varían entre especies de insectos; entre los efectos benéficos vemos un aumento en la vida del insecto así como un aumento en la tasa de fecundidad en ciertas especies (Weintraub y Beabland, 2006).

2. AMARILLAMIENTO LETAL

El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad devastadora que afecta a más de 35 especies de palmas en toda la región del Caribe, donde sus efectos son evidentes en el cocotero que en otras especies de palmas (Figura 2). En los últimos 70 años, la epidemia del AL han matado a millones de palmas, lo cual la convierte en la enfermedad más importante de este recurso vegetal a nivel mundial (Batugal *et al*, 2005; Harrison y Elliott, 2007; Harrison y Oropeza, 2008).



Figura 2. Plantación de cocotero devastada por el amarillamiento letal.

Los fitoplasmas se han identificado como agentes causales de algunas enfermedades tipo amarillamiento en plantas. Esto promovió la búsqueda de estos microorganismos en las palmas afectadas por el AL. Varios grupos independientes corroboraron la presencia de fitoplasmas en el floema de las palmas de coco con síntomas del AL. Gracias a esas investigaciones ahora se sabe que el AL es causado por fitoplasmas; entre sus características se puede decir que son bacterias que carecen de pared celular y no pueden ser cultivados *in vitro*, esto nos dice que es un patógeno sistémico que se puede encontrar únicamente en el tejido del floema (tejido vascular vinculado en el transporte de carbohidratos) de las palmas. Se sabe que solo sobrevive en las plantas y en el insecto.

Los fitoplasmas del AL (Bacteria: Tenericutes: Mollicutes: Phytoplasmas) han sido incluidos en el grupo 16SrIV y actualmente hay descritos seis subgrupos del AL (ver cuadro 1), que solo pueden ser identificados por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) ó por análisis de la secuencia de su ADN. El nombre propuesto para este patógeno es "*Candidatus Phytoplasma palmae*" (IRPCM, 2004; Harrison y Elliott, 2007; Harrison y Oropeza, 2008; Dollet *et al*, 2009; Vázquez-Euán *et al*, 2010).

Cuadro 1. Subgrupos de fitoplasmas asociados al grupo 16SrIV

SUBGRUPO	DESCRIPCIÓN
16SrIV-A	Asociado con muchas especies de palmas afectadas por el AL
16SrIV-B	Incluye fitoplasmas encontrados en cocotero en Tabasco y cerca de Yucatán
16SrIV-C	Incluye fitoplasmas del AL de cocotero en Tanzania
16SrIV-D	Incluye fitoplasmas de decaimiento en palmas del género <i>Phoenix</i> , <i>Syagrus</i> y <i>Carludica</i> en Texas y en Yucatán.
16SrIV-E	Incluye fitoplasmas detectados en cocotero en República Dominicana
16SrIV-F	Incluye cepas de fitoplasmas descubiertas en palmas de <i>Washingtonia robusta</i>

2.1. Origen y Distribución

Los reportes de palmas muertas que presentan síntomas de tipo AL se remontan al siglo XIX en la región Caribe. Durante las últimas siete décadas se ha reportado el AL en Jamaica y Estados Unidos (Florida y Texas) y otros países incluyendo a México, que se ha caracterizado por la rápida propagación y elevadas pérdidas. El AL se registró por primera vez en la península de Yucatán durante 1977 y se ha extendido a Belice, Honduras y Guatemala (Figura 3). Enfermedades similares conocidas como "enfermedades tipo amarillamiento letal" se han descrito zonas de África tales como Ghana, Togo, Nigeria, Camerún, Tanzania, Kenia y Mozambique; lo que ha causado enormes pérdidas, particularmente en Ghana y Tanzania (Batugal *et al*, 2005; Dollet *et al*, 2009).



Figura 3. Distribución actual del AL que va desde el Caribe, moviéndose hacia la florida. En México abarca la península de Yucatán, Tabasco y actualmente se desplaza hacia Veracruz.

2.2. Hospederos

A la mayoría de las palmas se les conoce por su valor ornamental en las zonas tropicales. En Florida se conocen alrededor de 35 especies de palmas las cuales se ven afectadas por el AL. Para la mayoría de las especies hay poco conocimiento sobre la susceptibilidad con el AL, pero no es el caso de *Adonia merrilli*, *Phoenix dactylifera* y *Pritchardia sp.* que han sufrido bastantes pérdidas durante mucho tiempo por lo que no se recomienda emplearlas como ornamentales.

Cuadro 2. Listado de especies de palmas susceptibles a la enfermedad del AL en Florida

Nombre Científico	Región de Origen	Nombre Científico	Región de Origen
<i>Adonidia merrilli</i>	Pacífico Occidental	<i>Hyophorbe verschaffeltii</i>	Madagascar
<i>Aiphanes lindeniana</i>	Caribe	<i>Latania lontaroides</i>	Madagascar
<i>Allagoptera arenaria</i>	América del Sur	<i>Livistona chinensis</i>	China
<i>Arenga engleri</i>	Sureste Asiático	<i>Livistona rotundifolia</i>	Sureste Asiático
<i>Borassus flabellifer</i>	India	<i>Nannorrhops ritchiana</i>	Asia Menor
<i>Caryota mitis</i>	Sureste Asiático	<i>Phoenix canariensis</i>	Islas Canarias
<i>Caryota rumphiana</i>	Sureste Asiático	<i>Phoenix dactylifera</i>	Norte de África
<i>Chelyocarpus chuco</i>	América del Sur	<i>Phoenix reclinata</i>	África
<i>Cocos nucifera</i>	Pacífico Occidental	<i>Phoenix rupicola</i>	India
<i>Corypha taliera</i>	India	<i>Phoenix sylvestris</i>	India
<i>Crysophila warsecewiczii</i>	América Central	<i>Pritchardia affinis</i>	Hawái
<i>Cyphophoenix nucele</i>	Pacífico Occidental	<i>Pritchardia pacifica</i>	Pacífico Occidental
<i>Dictyosperma album</i>	Madagascar	<i>Pritchardia remota</i>	Islas Hawaianas
<i>Dypsis cabadae</i>	Madagascar	<i>Pritchardia thurstonii</i>	Pacífico Occidental
<i>Dypsis decaryi</i>	Madagascar	<i>Ravenea hildebrandtii</i>	Madagascar
<i>Gaussia attenuata</i>	Región Caribe	<i>Syagrus schizophylla</i>	América del Sur
<i>Howea belmoreana</i>	Pacífico Occidental	<i>Trachycarpus fortunei</i>	China
<i>Howea forsteriana</i>	Pacífico Occidental	<i>Veitchia arecina</i>	América del Sur

2.2. Sintomatología

Como en cualquier enfermedad, el diagnóstico inicial se basa en síntomas visibles. En el caso del AL en palmas de cocotero en producción, hay síntomas característicos con una progresión cronológica característica. (Harrison y Elliott, 2007; Harrison y Oropeza, 2008).

El primer síntoma visible es la caída prematura de la mayor parte o todos los frutos, independientemente de su etapa de desarrollo (Figura 4). A continuación, se desarrolla necrosis de las nuevas inflorescencias. Pasando de amarillo brillante a quedar parcialmente o totalmente de color negro. Estos síntomas se pueden observar cuando la palma está en floración o en fructificación cuando se desarrolla la enfermedad (Figura 4) (Harrison y Elliott, 2007; Batugal *et al*, 2005; Harrison y Oropeza, 2008).

Para todos los tipos de cultivo de cocotero, el siguiente síntoma es el amarillamiento en el follaje, que empieza desde las hojas más bajas (viejas) y progresivamente va subiendo hasta llegar a la copa (Figura 4); este síntoma inicia normalmente después que se presentan dos o tres inflorescencias necrosadas. Por lo general las hojas amarillas permanecen turgentes, pero conforme avanza el tiempo estas se vuelven marrones, se secan y cuelgan hacia abajo formando una falda alrededor del tronco durante varias semanas antes de caer. Esta decoloración varía entre los cultivares y otros géneros. Para la mayoría de las palmas del tipo Alto, las hojas se tornan de un color amarillo antes de morir, mientras que las variedades Enanas, por lo general dan un color rojizo a pardo grisáceo (Harrison y Elliott, 2007; Harrison y Oropeza, 2008).

A medida que avanza la decoloración del follaje hacia la copa, la hoja espada se marchita, indicando que el meristemo apical (cogollo o punto de crecimiento) ha muerto. Con el tiempo, lo que queda de la copa cae, dejando solo el tronco desnudo de pie. Las palmas infectadas usualmente mueren después de 3 a 5 meses posterior a la aparición del primer síntoma (Batugal *et al*, 2005; Harrison y Elliott, 2007; Harrison y Oropeza, 2008).



Figura 4. Los síntomas del AL. A, palmas con follaje amarillo; B, caída de los frutos; C y D, Necrosamiento de la inflorescencia; E y F, amarillamiento desde las hojas maduras hasta las más jóvenes (Oropeza *et al*, 2010)

2.3. Detección por métodos moleculares

Para establecer un diagnóstico inicial en campo, se emplea la observación de síntomas. Que puede ser confirmado por análisis con técnicas de laboratorio. Pero existe una dificultad en el diagnóstico del AL por sus síntomas, ya que hay variación acorde a las especies de palmas y en el caso de cocotero existen diversas variedades. Debido a esa problemática se requiere el uso de herramientas moleculares, como es el caso de la técnica de PCR, para confirmar la presencia de fitoplasmas en palmas sospechosas. (Harrison y Elliott, 2007; Harrison y Oropeza, 2008).

La PCR fue ideada en 1985 por Karry B. Mullis y una de las principales ventajas de la técnica de PCR es que se ha aplicado de manera exitosa en el diagnóstico de enfermedades asociadas a fitoplasmas en muchas especies de plantas de importancia económica, así como también en la búsqueda de insectos transmisores de fitoplasmas.

Consiste en la amplificación enzimática de una secuencia de ADN específica del microorganismo que se desea amplificar, usando para esto una ADN polimerasa termoestable dirigida por unos iniciadores (primer). La especificidad depende de la elección de los iniciadores y esto aplica para conocer por lo menos parcialmente las secuencias de ADN que se desea amplificar. El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura, que son la desnaturalización (separación de las hebras del ADN), alineamiento (hibridación del cebado con la secuencia) y extensión (taq polimerasa sintetizando la cadena complementaria) (Deng y Hiruki, 1991; Henson y Frech, 1993; Sambrook y Russel, 2001).

La PCR es la herramienta por excelencia para el diagnóstico del AL. Se estableció el protocolo de detección denominado PCR Nested que nos permite la detección de fitoplasmas antes de la aparición de los primeros síntomas. La técnica consiste en dos rondas de amplificación; la primera ronda consiste en el uso de dos cebadores universales P1 y P7 que amplifican secuencias conservadas de fitoplasmas en general, la segunda etapa consiste en la amplificación de los productos de la primera ronda empleando dos cebadores denominados LY16Sr y LY16Sf que son específicos a fitoplasmas del grupo 16SrIV; cuando se da una amplificación positiva en esta ronda nos permite decir que hay presencia de fitoplasmas relacionados con el AL. Sin embargo, la doble amplificación que se realiza en la PCR Nested, aumenta el riesgo de contaminación por manipulación de las muestras (Harrison *et al*, 2002; Harrison *et al*, 2002b; Cordova *et al*, 2003; Torres *et al*, 2005).

En años recientes, el perfeccionamiento de esta técnica, ha dado lugar a la denominada PCR Tiempo Real (PCR-TR). Esta técnica se ha usado para detectar o cuantificar otros microorganismos presentes en una amplia gama de entornos diferentes y tienen el potencial de mejorar drásticamente el conocimiento de la ecología de los microorganismos. La PCR-TR mide la acumulación de los productos amplificados durante la reacción mediante la determinación de la señal de fluorescencia. Este método tiene muchas ventajas sobre la PCR Nested en términos de precisión, rango dinámico, la capacidad de alto rendimiento y la ausencia de una segunda amplificación que evita la contaminación por arrastre. En diversos estudios se ha mostrado que la PCR-TR presenta

alta sensibilidad y fácil manejo haciendo este método la elección para el estudio de la interacción específica entre fitoplasmas y plantas hospederas en tan solo una amplificación. En este caso se emplea la sonda marcada Taq-Man 16Sr-LY para determinar la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrIV (Christensen *et al*, 2004; Torres *et al*, 2005; Myrie *et al*, 2011; Sáenz *et al*, 2011, no publicado).

2.4. *Haplaxius crudus*

Entre los insectos más comunes que podemos encontrar en una gran variedad de palmas, están los miembros del orden Hemiptera del suborden Auchenorrhyncha (anteriormente clasificados en el orden Homóptera). Se sabe que las especies adultas se alimentan directamente en las palmas, pero los estados más inmaduros permanecen ocultos (Wilson, 1986).

Se sabe que el posible vector de esta enfermedad es un insecto llamado *Haplaxius crudus*, antes llamado *Myndus crudus* (Ceotto *et al*, 2008) cuya primera evidencia como posible vector fue en los ensayos transmisión de fitoplasmas realizados por Howard (1987) en la Florida (USA) que serán descritos más adelante. Es un insecto chupador pequeño, que se alimenta del floema de las palmas (Figura 5). Estos transportan a los fitoplasmas de palma en palma durante sus ciclos de alimentación (Harrison y Elliott, 2005; Batugal *et al*, 2005; Harrison y Oropeza, 2008).



Figura 5. *Haplaxius crudus* alimentándose del tejido vascular de la palma, empleando su estilete para perforar es tejido.

H. crudus fue primeramente citado en Jamaica en 1907 y después en Florida, Cuba, Islas Caimán, Jamaica, Trinidad y América Tropical desde México y América central hasta el norte de América del Sur, y en casi todos los países afectados por el AL. Pero su distribución se extiende más allá del rango geográfico actual de esta enfermedad (Howard, 2006).

La identificación de *H. crudus* en un estado de desarrollo adulto en el campo se ve facilitada por el hecho de que es una de las pocas especies de la superfamilia Fulgoroidea y dependiendo del país puede ser la única especie de la familia Cixiidae comúnmente encontrados en el follaje de las palmas (Triplehorn y Johnson, 2005; Howard, 2006).

Entre las características peculiares de Fulgoroidea incluyen la forma de la antena (la primera parte tiene forma de barril y del centro sobresale un flagelo que viene siendo la antena). Otras características incluyen la presencia de espinas en las patas traseras en grupos en los extremos de los segmentos de la patas (Howard, 2006).

La hembra adulta en reposo mide aproximadamente 5mm de largo y el prominente ovipositor se distingue claramente (Figura 6). El macho es ligeramente más pequeño y más pálido, su abdomen tiende a ser más pequeño y sus coloraciones son más claras y brillantes como es el color verde y en casos más curiosos de color azul turquesa (por observación en las colectas) (Figura 7). Los ojos pueden tener color claro como su cabeza o ser de un color marrón oscuro, dependiendo de las condiciones de luz. Las alas son transparentes y con venas con una tonalidad marrón (Howard, 2006).

Las ninfas (estado inmaduro) son de color gris y con un color rojizo en la cabeza. Se cubren con una fina capa de cera producida por las glándulas de cera de su cutícula. La tibia de las patas delanteras son aplanadas, una posible adaptación que les serviría para cavar en la superficie del suelo (Howard, 2006).

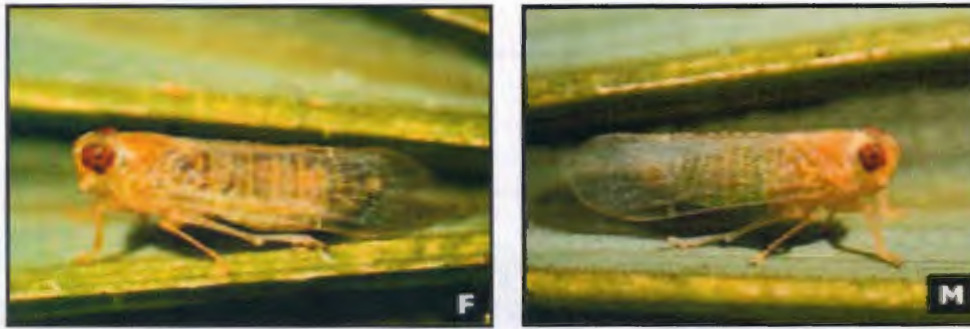


Figura 6. (F) Hembra de *H. crudus*, de mayor tamaño y con abdomen más oscuro; (M) Macho de *H. crudus*, de menos tamaño y con un color más claro (Harrison and Oropeza, 2008).

Hablando un poco de la biología de este insecto podemos ver que las ninfas de *H. crudus* se desarrollan en las raíces de las zonas de pastos. Están presentes en la superficie del suelo, a menudo de las pequeñas acumulaciones de restos de hojas y otras materias orgánicas; en general le son más favorables los sitios húmedos y con gran cantidad de hierba (Howard, 2006). Posteriormente en el estado adulto, los insectos son capaces de volar en el follaje de las palmas en la cual se alimentan y reproducen. Son capaces de alimentarse del follaje de las palmas, insertando su estilete en tejidos de la hoja y así succionan el floema. Son capaces de alimentarse de una gran variedad de palmas, aunque no hay datos que indiquen si tienen alguna preferencia entre las diferentes especies de palmas. En observaciones hechas en campo se ha visto a este insecto en el follaje de otras plantas. Las hembras regresan a los pastos para depositar sus huevos (Figura 7) (Howard, 2006).



Figura 7. Ciclo de vida de *H. crudus*. Las ninfas habitan las raíces de los pastos hasta alcanzar el estado adulto. Posteriormente los adultos vuelan hasta las palmas y se alimentan de las hojas. Los insectos se aparean y las hembras depositan los huevos nuevamente en los pastos.

3. EVIDENCIAS DE *HAPLAXIUS CRUDUS* COMO POSIBLE VECTOR DEL AL

No hay evidencia convincente que impliquen a *H. crudus* como un vector del AL. Estudios de las poblaciones de insectos mostraron que *H. crudus* fue por mucho el más abundante, lo cual lo convierte en el potencial vector del AL en cocotero. Los estudios demostraron que las poblaciones de esta especie eran hasta 40 veces mayor en las zonas de incidencia de AL que en zonas libres de esta enfermedad (Harrison y Oropeza, 2008). En Florida se realizaron estudios de PCR en insectos colectados en palmas con síntomas del AL, el resultado del experimento demostró que los insectos fueron positivos a fitoplasmas relacionados con el AL, siendo la evidencia más clara de que *H. crudus* sea el posible transmisor de la enfermedad (Harrison y Oropeza, 1995). En Jamaica, sitio donde está presente la enfermedad, no solo se encuentra *H. crudus* sino también insectos del género *Cedusa* (Derbidae) que se encuentran en mayor abundancia, lo cual se llevaron a cabo análisis por PCR NESTED y estos dieron positivo a fitoplasmas del Amarillamiento letal lo cual se está llegando a pensar que el patógeno puede tener varios vectores (Brown, 2006).

Durante mucho tiempo, este insecto ha sido objeto de una serie de estudios de transmisión, la mayoría de las cuales fueron grandes esfuerzos por parte de científicos altamente capacitados, sin embargo tuvieron resultados negativos (Howard, 1987).

3.1. Experimentos de transmisión en Florida, EUA

De entre las primeras evidencias de *H. crudus* como posible vector se dio en experimentos hechos en Florida. Para estos ensayos emplearon el uso de jaulas de acero cubiertas por una malla tipo invernadero para aislar a las plantas. En un primer ensayo que tuvo una duración de tres años, empleando tres palmas que son muy susceptibles a la enfermedad con síntomas del AL: *Cocos nucifera*, *Veitchia merrillii* y *Pritchardia Thurstonii* distribuidas en 10 jaulas (5/control y 5/exp.) (Figura 8) a prueba de insectos donde fueron expuestas a los adultos del insecto *H. crudus* colectados en áreas afectadas por el AL que fueron un total de 150 mil individuos durante todo el experimento. Se logró la transmisión de esta enfermedad a las palmas evaluadas por presencia de síntomas y posteriormente por microscopía electrónica; por otro lado las palmas en jaulas control (sin insectos) permanecieron sanas. En un segundo ensayo que duró un año, se evaluaron

palmas jóvenes de nueve especies diferentes que fueron colocadas en dos jaulas diferentes, la primera con palmas de alrededor de dos años de edad mientras que en la segunda jaula palmas de 3 a 4 años e introdujeron en ellas un total de 1900 insectos y 500 insectos respectivamente. Concluido el año del experimento se vio que la transmisión del AL posible en plantas jóvenes de dos a cuatro años de edad y con una población pequeña de insectos *H. crudus*. Todas estas evidencias demostraron que el posible vector de los fitoplasmas causantes del AL es el insecto *H. crudus* (Howard, 1987).

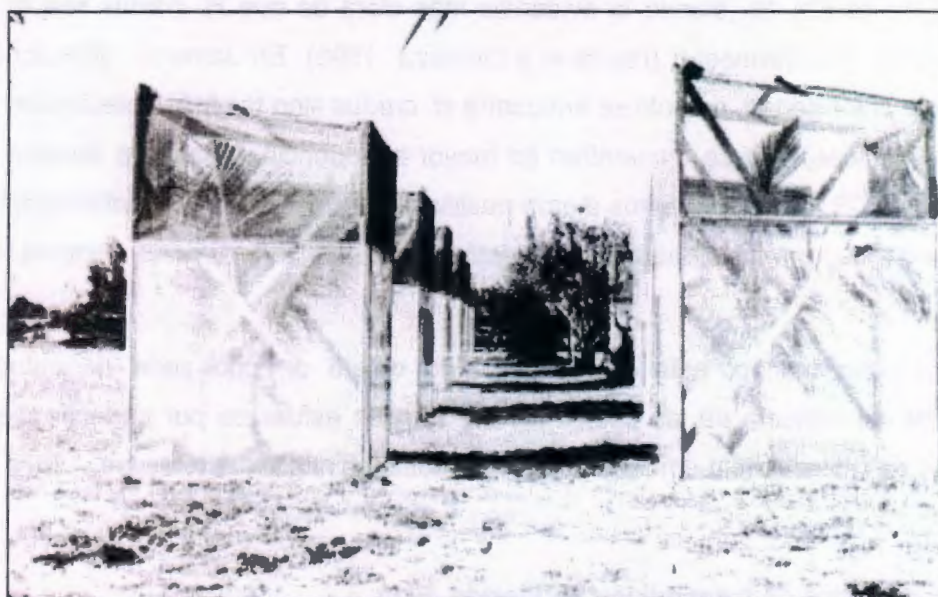


Figura 8. Jaulas control y jaulas con *H. crudus* en Florida, USA

3.2. Experimentos de Transmisión en Tabasco, México

Por primera vez en México se evaluó la transmisión de *H. crudus* en palmas de cocotero en el estado de Tabasco. Fue realizado en una plantación de Pailebot (Tabasco) y tuvo como duración de Octubre de 2006 a Junio de 2010. Las palmas de cocotero fueron colocadas en jaulas a prueba de insectos. Se colectaron en total 78,800 *H. crudus* en localidades con presencia del amarillamiento letal. Al concluir los experimentos, las palmas no presentaron síntomas típicos de la enfermedad y los análisis por PCR fueron negativos (Dzido *et al*, 2010, no publicado). Posteriormente en un estudio de Microsatélites realizado en el ADN de las plantas de Cocotero, mostraron que están emparentadas con palmas procedentes del Alto del Pacífico las cuales se ha visto que son resistentes al AL (CICY, 2014, Resultados no publicados).



Figura 9. Ensayo de transmisión en Tabasco

3.3. Experimentos de Transmisión *in vitro*, CICY

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), se desarrolló un método de transmisión por medio de cajas magentas; este método de transmisión mostro que se puede tener más control sobre los insectos y las plantas y sobre las condiciones de temperatura, humedad y luz. En este ensayo de transmisión del Amarillamiento Letal se emplearon palmas de cocotero micropropagadas e insectos *H. crudus* colectados en la localidad de Chicxulub puerto. Al concluir el ensayo de transmisión, los insectos y las plantas fueron analizados por la técnica de PCR; resultando positivas al fitoplasma del AL los insectos y una de las palmas (CICY 2010, no publicado).



Figura 10. Ensayo de transmisión *in vitro*

HIPÓTESIS

Haplaxius crudus puede ser el vector de los fitoplasmas del grupo 16Sr-IV a la palma *Pritchardia pacífica*.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar si el insecto *Haplaxius crudus* puede transmitir el fitoplasma relacionado con el amarillamiento letal a la palma *Pritchardia pacífica*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Monitorear la aparición de síntomas relacionados con el AL en las palmas que se encuentran en las jaulas expuestas al insecto vector *H. crudus*.

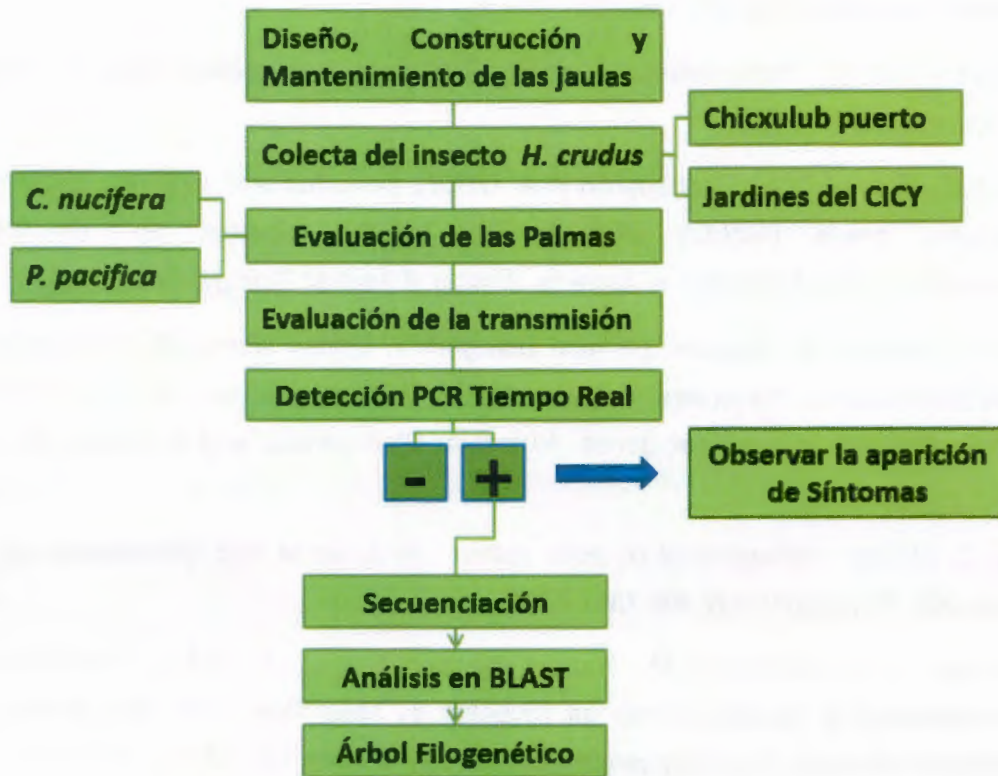
Confirmar la presencia de fitoplasmas empleando las herramientas moleculares de detección.

Aislar, secuenciar e identificar el ADN ribosomal de los fitoplasmas encontrados en las palmas de los ensayos de transmisión.

JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad, los análisis moleculares indican que el insecto *Haplaxius crudus* puede contener los fitoplasmas del amarillamiento letal (AL) en sus tejidos, aunque en condiciones de campo es bajo el porcentaje de insectos que son positivos a este fitoplasma. Es muy limitado el entendimiento del mecanismo de transmisión de fitoplasmas del AL de este insecto a las diversas palmas que pueden ser hospederas del patógeno. Los ensayos de transmisión realizados en Florida brindan la primera evidencia de que el vector de esta enfermedad en E.U.A. es el insecto *H. crudus*; y por otra parte en Yucatán se ha logrado la transmisión de fitoplasmas en ensayos *in vitro* empleando plántulas de cocotero, esto abre la posibilidad de que este insecto es el vector del AL en México. Por lo tanto se debe realizar un estudio de transmisión del AL con el método de jaulas para evaluar palmas susceptibles a la enfermedad y coleccionar insectos en zonas donde está presente el patógeno.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BIBLIOGRAFÍA

- Batugal P., Rao R., and Oliver J. (2005). Coconut genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute. Malaysia. 349 p.
- Bertaccini A. (2007). Phytoplasmas: Diversity, Taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*. 12: 673-689.
- Brown S.E., Been B.O. and McLaughlin W.A. (2006). Detection and variability of the lethal yellowing group (16SrIV) phytoplasmas in the *Cedusa* Sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Annals of Applied Biology*. 149: 53-62.
- Ceotto P., Kergoat G., Rasplus J-Y. and Bourgoin T. (2008). Molecular phylogenetic of cixiid planthoppers (Hemiptera: Fulgoromorpha): New insights from combined analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 48: 667-678.
- Chang C. (1998). Pathogenicity of aster yellow phytoplasma and spiroplasma citri on periwinkle. *Phytopathology*. 88: 1347-1350.
- Christensen N.M., Nicolaisen M., Hansen M. and Schulz, A. (2004). Distribution of Phytoplasmas in infected plants as revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Technical Advance. The American Phytopathology Society*. Vol. 17(11): 1175-1184
- Christensen N.M., Axelsen K., Nicolaisen M. and Schulz A. (2005). Phytoplasma and their interactions whit host. *Trends in plant science*. 10: 526 – 535.
- Cordova I., Jones, P., Harrison, N.A. and Oropeza C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*. 4 (2), 99-108
- Davis R. and Sinclair W. (1998). Phytoplasma and disease etiology. *Phytopathology*. 88:1372-1376
- Deng S. and Hiruki C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*. 53-61.
- Dollet M., Quaicoe R. and Pilet, F. (2009). Review of coconut “Lethal Yellowing” type diseases Diversity, variability and diagnosis. *Agronomie-Environnement. OCL*. 16(02): 97-101

-
- Fletcher J., Wayadande A. Melcher U. and Ye F. (1998). The Phytopathogenic mollicute-insect vector interface: Closer look. *Phytopathology*. 88: 1351- 1358.
- Harrison N.A., Narváez M., Almeyda H., Cordoba I., Carpio M.L. and Oropeza C. (2002b). First report of group 16SrIV Phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *Plant Pathology*. 51, 808.
- Harrison N.A. and Elliott M.L. (2007). Lethal Yellowing (LY) of palm. Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. PP-222
- Harrison N.A. and Oropeza C. (1995). Recent studies on detection of lethal yellowing disease Phytoplasmas in the Americas. International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina, Ghana, November 1995.
- Harrison N.A. and Oropeza C. (2008). Coconut Lethal Yellowing. Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Texas, USA. Pp. 219-248.
- Harrison N.A., Womack M., Carpio M.L. (2002). Detection and Characterization of a Lethal Yellowing (16SrIV) Group Phytoplasma in Canary Island Date Palms Affected by Lethal Decline in Texas. The American Phytopathological Society. *Plant Disease*. Vol. 86(6): 676-681.
- Henson J. and Frech R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytophanol*. 31:81 – 109.
- Hogenhout S., Oshima K., Ammar E., Kakisawa S., Kingdom H. and Namba S. (2008). Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol*. 9: 1-21.
- Howard F.W. (1987). *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae), a vector of Lethal Yellowing of Palms. Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of economic Importance. Pp. 117-129
- Howard F.W. (2006). American Palm Cixiid, *Myndus crudus* Van Duzee (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha: Fulgoroidea: Cixiidae). Featured Creatures from Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. EENY-389

- IRPCM (2004). "*Candidatus phytoplasma*", a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1243-1255
- Lee I., Davis R. and Gundersen-Rindal D. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology.* 54: 221-255.
- Myrie W., Oropeza C., Sáenz L., Harrison N., Roca M., Cordoba I., Ku S. and Douglas L. (2011). Reliable improved molecular detection of coconut lethal yellowing phytoplasma and reduction of associated disease through field management strategies. *Bulletin of Insectology.* 64: 203-204.
- Oropeza C., Zizumbo D., Sáenz L., Narváez M., Cordoba I., Harrison N., Roca M.M., Myrie W., Dollet M., Dzido J-L., Castillo R. and Ortiz C.F. (2010). Interacciones planta-patógeno-vector-ambiente en el amarillamiento letal del cocotero. *PALMAS.* 31: 388-402
- Oshima K., Kakisawa S., Nishiyama H., Jung H. Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M. and Namba S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of plant-pathogenic phytoplasma. *Nature generics.* 36: 27-29.
- Razin S., Yoger K. and Naot Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of micoplasmas. *Microbiol. Mol. Review.* 62: 1094-1156.
- Sambrook J. and Russel D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.
- Torres E., Bertolini E., Cambra M., Montón C. and Martín M.P. (2005). Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine Phytoplasmas from Apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19, pp. 334-340
- Triplehorn C.A. and Johnson N.F. (2005). *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects.* 7th Edition. Thomson – Brooks/Cole.
- Vázquez-Euan R.C. Harrison N., Narváez M. and Oropeza C. (2010). Occurrence of a lethal yellowing group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *The American Phytopathological Society. Plant Disease.* 95: 256-262.

- Wei W., Davis R.E., Lee I-M. and Zhao, Y. (2007). Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1855-1867.
- Welliver R. (1999). Diseases caused by Phytoplasmas. *Plant pathology*. 25: 17-22
- Weintraub P.G. and Beanland L. (2006). Insect vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. 51: 91-111.
- Wilson M.R. (1986). The Auchenorrhyncha (Homoptera) Associated with Palms. *Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of economic Importance*. Pp. 327-342
- Woese C. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology review*. 51: 221-271.

CAPÍTULO II**ENSAYO DE TRANSMISIÓN DEL FITOPLASMA 16SrIV EN LA PALMA
*Pritchardia pacifica*****2.1. INTRODUCCIÓN.**

El amarillamiento letal del cocotero es una enfermedad que afecta a una gran variedad de palmas, entre ellas la palma abanico *Pritchardia pacifica*. El agente causal de esta enfermedad es una bacteria de la clase Mollicutes conocidas por ser un grupo inusual de bacterias que carecen de pared celular y no pueden ser cultivados *in vitro* lo cual dificulta su estudio (Deng y Hiruki, 1991; Harrison *et al* 2008). Estos microorganismos denominados como fitoplasmas del amarillamiento letal, son conocidos por ser parásitos obligados del floema que causan síntomas como amarillamientos en las hojas así como caída de frutos en casos severos (Harrison *et al*, 2007). Específicamente están asociados al grupo 16SrIV y a su vez están divididos en seis subgrupos clasificados por diferencias en su secuencia y en la región en donde han sido reportadas, siendo el subgrupo 16SrIV-A de mayor distribución e importancia por afectar a una gran variedad de palmas de cocotero a lo largo del Caribe (Dollet *et al*, 2009) (Harrison *et al*, 2002).

La dificultad del estudio de este patógeno está ligado a su incapacidad de cultivarse *in vitro* (Deng y Hiruki, 1991; Harrison *et al* 2008). Howard (1987) realizó estudios de transmisión de este fitoplasma, empleando palmas jóvenes encerradas en jaulas a prueba de insectos, en la cual se incorporó al vector sospechoso conocido hasta la fecha como *Haplaxius (Myndus) crudus* (Triplehorn y Johnson, 2005); en dichos experimentos se logró transmitir a las palmas dicho patógeno, en el cual generaron síntomas típicos al amarillamiento letal; posteriormente dichos resultados fueron corroborados con microscopía electrónica. Este fue el primer hecho que confirmó que *H. crudus* es el vector de la enfermedad del AL (Howard, 2006).

Se realizaron otros experimentos de transmisión realizados en Ghana, África; en este trabajo se empleó el método de jaula a prueba de insectos, en este caso emplearon a otro vector que fue el caso de *Myndus adiopodoumeensis*, para corroborar la transmisión emplearon el método de detección por PCR. Al final de los experimentos mostraron que las palmas no fueron positivas. En México se realizaron estudios de transmisión en Pailebot, Tabasco en la cual se emplearon palmas de cocotero provenientes de Sánchez

Magallanes (zona donde no hay presencia del AL), en dicho trabajo se siguió la metodología de Howard (1987) en la cual se colectó al vector *H. crudus* y fueron colocados en las jaulas a prueba de insectos. La duración del experimento fue de dos años y al final no se encontró detección positiva.

Debido a la problemática de los estudios de transmisión realizados en tabasco, en el presente trabajo se planeó repetir los ensayos empleando palmas de *Pritchardia pacifica*, las cuales se saben que son susceptibles a la enfermedad. Por otra parte se colectaron insectos en el interior del estado de Yucatán que sabemos que el inóculo de fitoplasmas tanto en palmas como en insectos es mayor en comparación de Tabasco.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1. Diseño y Características de la jaula

La jaula que se empleó para aislar a los insectos con las palmas que deseamos inocular con fitoplasmas, consto de un armazón metálico que estuvo anclado en el suelo (Figura 11), y dividido en dos áreas, la primera fue la entrada con una altura de 3.5 metros y las paredes de 1 metro, y la segunda en donde estuvieron las palmas y los insectos evaluados en el ensayo de transmisión, con 3.5 metro de altura y las paredes de 3 metros.

Las paredes se cubrieron con malla anti-afidos blanca y el techo con malla verde para dar sombra a las palmas. Las puertas se forraron con la misma malla provista con una cremallera en la entrada y otra en la entrada al área de la jaula. El diseño es diferente al empleado en los experimentos realizados en florida por Howard en 1987.

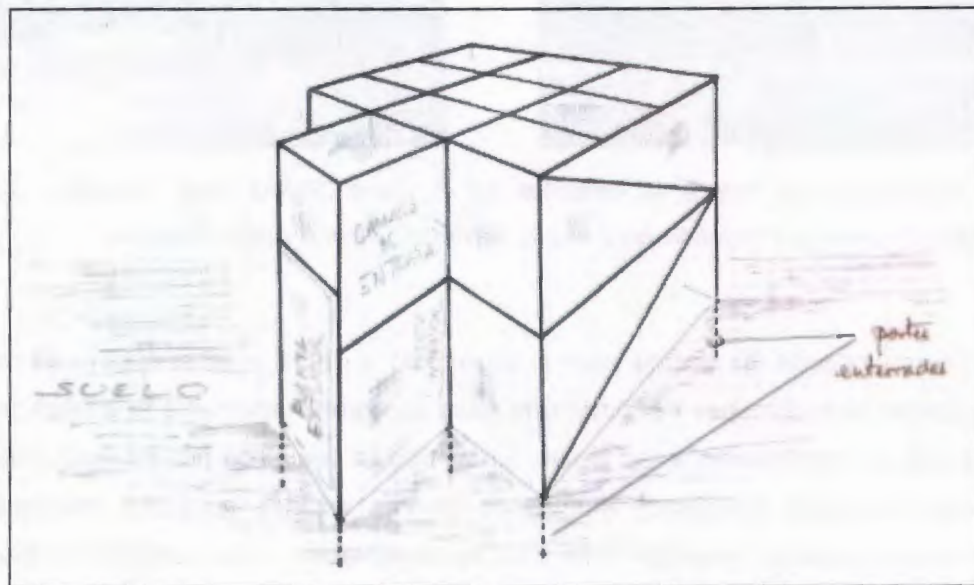


Figura 11. Esquema del diseño de la jaula a prueba de insectos para evaluar la transmisión de fitoplasmas.

2.2.2. Obtención del material vegetal

El material vegetal empleado para el siguiente estudio fue obtenido de los viveros "Palmeral" y "Palma Real" pero este último se descartó debido a que las palmas encontradas en el sitio manifestaban síntomas de infección por fitoplasmas (Figura 12, Izquierda) lo cual se corroboró con su detección positiva a fitoplasmas por PCR. Por otra parte, las palmas del vivero "Palmeral" se encontraban visiblemente sanas (Figura 12, Derecha) y la detección por PCR fueron negativas; por lo cual se obtuvieron las palmas de *P. pacífica* de este vivero.



Figura 12. Palmas de *Pritchardia* enfermas en el vivero "Palma Real" Temozón, Yucatán (Izquierda) y Palmas de *Pritchardia* en el vivero "Palmeral" Tekat, Yucatán Derecha.

Se obtuvieron más de 10 plantas para el ensayo #1 y de 16 para el ensayo #2, dichas palmas fueron seleccionadas por tener una edad de aproximadamente tres años para su fácil manejo e incorporación a las jaulas. En el trabajo realizado por Howard (1987) se obtuvieron resultados favorables empleando palmas jóvenes para sus ensayos. Las palmas fueron aisladas temporalmente para su observación y se realizaron análisis por PCR tiempo real para descartar que estén infectadas por fitoplasmas del amarillamiento letal.

2.2.3. Colecta de *Haplaxius crudus*

Los insectos se colectaron en sitios donde se encuentra presencia de fitoplasmas en las palmas. El primer sitio fue en los jardines del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en la cual se tiene reporte de palmas *Cocos nucifera* y en *Sabal* sp. con síntomas iniciales a infección por fitoplasmas y confirmados por PCR convencional (Vázquez-Euán *et al*, 2010) (Figura 13).

El segundo sitio fue en la localidad de Chicxulub puerto (Yucatán), en este puerto se encuentra un importante brote de la enfermedad del amarillamiento letal, se han encontrado palmas de *Cocos nucifera* y *Thrinax radiata* con presencia del patógeno (Figura 14); el sitio está en constante vigilancia debido a que se encuentran palmas con síntomas típicos a fitoplasmas y los análisis de detección lo confirman.



Figura 13. CICY, Palma de *Pritchardia pacifica* con síntomas de las enfermedades causadas por fitoplasmas.



Figura 14. Chicxulub puerto, palmas de *Thrinax radiata* con síntomas de las enfermedades causadas por fitoplasmas.

CAPÍTULO II

Para la colecta de *Haplaxius crudus* se emplearon unos tubos Falcon modificados (Figura 15) que consisten en dos tubos, uno de 50 ml fusionado con un tubo de 15 ml que tiene un orificio en la parte inferior, en el cual el insecto entra en el tubo más pequeño y luego pasa al grande impidiendo que este se escape fácilmente lo cual nos da la posibilidad de coleccionar de 10 a 15 individuos por tubo. En total se capturaron entre 100 a 200 insectos por semana en cada sitio.



Figura 15. Alimentación de *H. crudus* de *Thrinax radiata* en Chicxulub Puerto (Izquierda) colectados en tubos Falcon modificados para su captura y transporte (Derecha).

2.2.4. Análisis Moleculares

El proceso de detección de fitoplasmas relacionados con el amarillamiento letal en cocotero se realizó en tres fases: Extracción del ADN total de la muestra, amplificación por la técnica de PCR y análisis bioinformático de las regiones amplificadas.

2.2.4.1. Extracción de ADN total

La extracción de ADN total de las palmas, se realizó a partir de un gramo de tejido de la hoja espada (Christensen *et al*, 2004), el tejido fue pesado y conservado en ultracongelación (-80 °C). Se emplea el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) para obtener el ADN total de la muestra; inicia con la maceración del tejido empleando nitrógeno líquido; a la muestra triturada se le agrega 5ml del buffers de extracción CTAB con antioxidante, seguidamente se adiciona 1ml de la muestra en un tubo eppendorf de 2 ml y es calentado durante una hora en baño maría a 65°C. La muestra se deja enfriar y se mezcla vigorosamente con 1ml de Fenol-Cloroformo; teniendo la mezcla se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min. Se recupera el precipitado, se coloca en un nuevo tubo eppendorf de 2ml, ahora se coloca 100 µl de Acetato de sodio y 800 µl de Isopropanol, la mezcla resultante es refrigerada a -20°C durante una hora para el precipitado de la pastilla. Después de la hora de precipitación la muestra es centrifugada a 14000 rpm durante 10 min, se desecha el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar la pastilla, seguidamente se le adiciona 500 µl de Etanol al 70% y se vuelve a centrifugar en esta ocasión a 7000 rpm durante 5 min; se desecha el sobrenadante y se deja secar la pastilla, una vez completamente seca se le adiciona de 40 a 50 µl (dependiendo del tamaño de la pastilla) de agua ultrapura estéril. El ADN obtenido fue visualizado en un gel de agarosa al 1% por electroforesis.

2.2.4.2. Detección de Fitoplasmas

La detección de fitoplasmas en las muestras se realizó empleando la técnica de PCR Tiempo-Real en la cual se emplea la sonda Taqman LY16S, que es altamente sensible a las secuencias de fitoplasmas del grupo 16SrIV que están relacionadas con el Amarillamiento Letal del cocotero, esta PCR detecta y cuantifica los fitoplasmas presentes en la muestra. El volumen total de la mezcla de reacción de PCR fue de 20 μ l conteniendo: 10.7 μ l de H₂O ultrapura, 5 μ l de buffer, 1 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de DNTP's, 0.3 μ l de Taq polimerasa, 0.5 μ l de sonda Taqman LY16S y 2 μ l de ADN (Torres *et al*, 2005; Myrie *et al*, 2011).

2.2.4.4. Clonación de los segmentos amplificados, secuenciación, análisis por RFLP's y análisis filogenético

Para obtener la secuencia de ADN de los fitoplasmas del grupo 16SrIV y con ello determinar al subgrupo al cual pertenece, se amplificó la muestra por la técnica de PCR NESTED que consiste en dos rondas de amplificación iniciando con los cebadores universales P1 y P7 seguidamente por una segunda ronda de amplificación empleando los cebadores específicos LY16Sr y LY16Sf que son específicos a fitoplasmas del grupo 16SrIV (Henson y Frech 1993; Cordova *et al*, 2003).

El producto de PCR es fraccionado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, el amplicon es cortado del gel y purificando con el kit "QIAquick Gel Extraction"; posteriormente el producto fue ligado al vector "PGEMT easy vector"; el producto de ligación fue clonado en la bacteria *E. coli* empleando el protocolo de transformación por choque térmico, las bacterias fueron colocadas en una placa de agar con X-gal para seleccionar las colonias, se seleccionaron las colonias blancas ya que el vector introducido en las bacterias carece del gen que degrada el X-gal mientras que las células no transformadas se tornaran de color azul. Las bacterias transformadas se dejaron crecer en medio de agar líquido con antibiotico y posteriormente se empleó para la extracción del plásmido el kit "QIAprep spin miniprep kit and microcentrifuge"; para corroborar que se obtuvo el plásmido se realizó una electroforesis en agarosa al 0.8%.

Los plásmidos fueron enviados a la empresa *Davis sequencing* para obtener las secuencias del ADN amplificado.

Para los análisis de restricción, se empleó el Software online iphyclassifier en la cual se emplearon digestiones con las enzimas AluI, BamHI, BfaI, BstUI, DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Sau3AI, MseI, RsaI, SspI y TaqI. Las Secuencias de fitoplasmas del segmento 16S ADNr fueron sometidas en el software el cual nos arrojó los geles virtuales.

A su vez, las secuencias fueron analizadas en la base datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para ver su porcentaje de similitud a secuencias reportadas anteriormente, y con ello se determinará al subgrupo de fitoplasmas al cual pertenece la muestra. El análisis filogenético se realizó con el software MEGA 5.2 usando el método neighbour-joining con 1000 repeticiones en la prueba Bootstrap (Hodgetts *et al*, 2008).

2.3. RESULTADOS.

2.3.1. ENSAYO #1

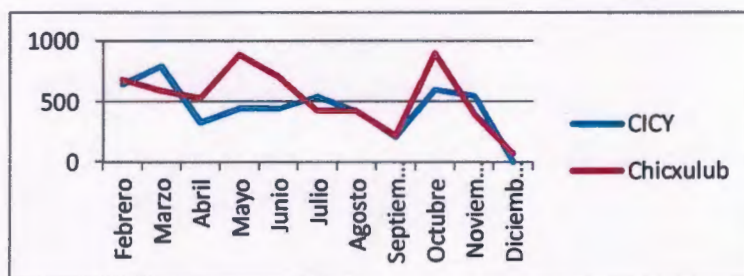
El ensayo de transmisión tuvo duración de un año; este inicio en Enero de 2011 y finalizo en Enero del siguiente año. Durante ese periodo se dio mantenimiento y riego de las plantas evaluadas.



Figura 16. Ensayos de transmisión: Jaula control y jaula de transmisión.

2.3.1.1. Colecta de *H. crudus*

Para este ensayo se colectaron insectos de *H. crudus* mayormente en las localidades de Chicxulub puerto y en el CICY (Mérida) de manera semanal. El numero insectos colectados dependían de la abundancia del insecto en los sitios (Cuadro 3). En este experimento se colectaron alrededor de 11 381 insectos.



Cuadro 3. Abundancia de las poblaciones de *H. crudus* en 2011

2.3.1.2. Detección por PCR-TR

Se realizó el análisis control del ensayo en el mes de enero (2011). Al cabo de 6 meses, las palmas empezaron a mostrar síntomas típicos a infección por fitoplasmas que consiste en un necrosamiento en la hoja espada. Los análisis por PCR-TR en las palmas que presentaron necrosamiento mostraron que ser positivas a fitoplasmas del grupo 16SrIV (Cuadro 4). Los controles del ensayo permanecieron ausentes de fitoplasmas.

Cuadro 4. Detección por PCR-TR de las palmas en el ensayo de transmisión #1

Jaula	Palma		Ene 2011			Jul 2011			Marzo 2012 Supervivencia de las palmas
			Ct	Detección	Síntomas	Ct	Detección	Síntomas	
1 Control	<i>Pritchardia Pacifica</i>	1-01	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
		1-02	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
		1-03	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
		1-04	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
2 introducción de insectos	<i>Pritchardia Pacifica</i>	2-01	NA	[-]	No	17.82	[+]	Si	Muerta
		2-02	NA	[-]	No	16.60	[+]	Si	Muerta
		2-03	NA	[-]	No	15.73	[+]	Si	Muerta
		2-04	NA	[-]	No	18.11	[+]	Si	Muerta
Control DNA	[+]	-	18. 18	[+]	-	15.60	[+]	-	
	[-]	-	NA	[-]	-	NA	[-]	-	

La detección nos indica que las palmas se infectaron con fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrIV empleando al insecto *Haplaxius crudus*. Posteriormente se les dio seguimiento a las palmas con síntomas, las cuales murieron en el mes de enero de 2012. Para Corroborar el experimento se planteó un segundo ensayo de transmisión para ver la reproducibilidad de la transmisión y dividir los dos sitios de colecta más importantes del insecto

2.3.2. ENSAYO #2

La duración de este ensayo fue de enero de 2012 a diciembre de 2012. Se consideraron dos sitios importantes de captura, mencionados previamente (Figura 17). Las palmas fueron regadas y se removieron las hojas viejas.

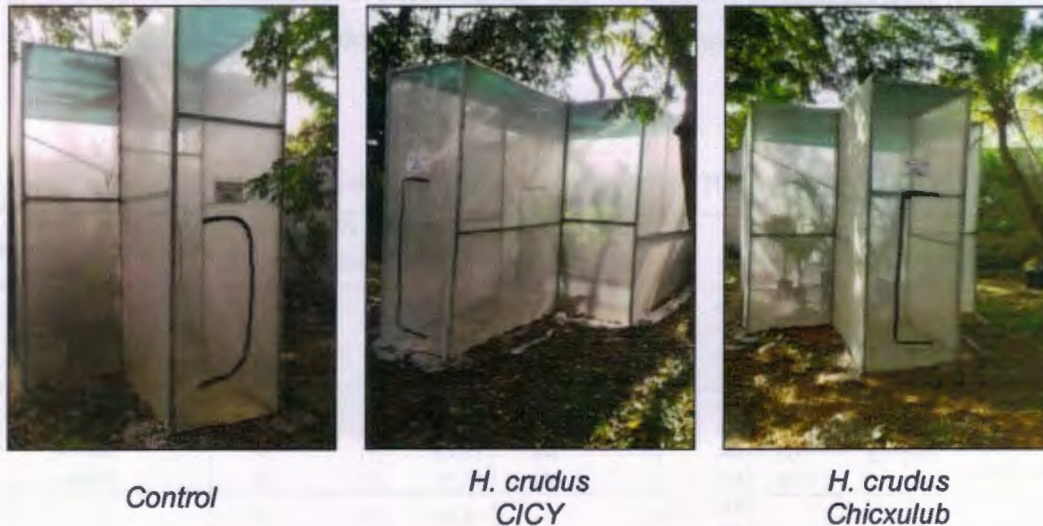
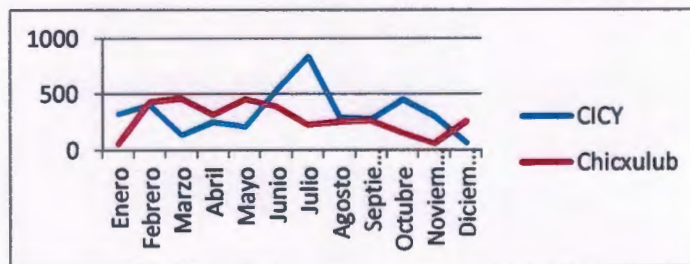


Figura 17. Jaulas donde se evaluó la transmisión de fitoplasmas.

2.3.2.1. Colecta de *H. crudus*

Se colectó de manera semanal *H. crudus* y fueron introducidos un total 9,600 insectos durante el periodo que duro el ensayo. En el cuadro 5 se muestra la abundancia de las poblaciones del insecto durante el año 2012.



Cuadro 5. Abundancia de las poblaciones de *H. crudus* en el año 2012.

2.3.2.2. Detección por PCR-TR

Se realizaron diferentes análisis de detección de fitoplasmas para la evaluación de la transmisión de este ensayo. El primer análisis se realizó para determinar la ausencia de fitoplasmas en las palmas para los ensayos. Los siguientes análisis se realizaron periódicamente para determinar si se logró la transmisión de fitoplasmas (Cuadro 6).

En el mes de mayo en la jaula "CICY" se empezaron a observar síntomas por necrosamiento en la hoja espada de las palmas *P. pacifica* (Figura 18) y los análisis fueron positivas a fitoplasmas (Cuadro 6); se decidió sustituir las palmas enfermas con tres nuevas palmas sanas para transmitir los fitoplasmas en la jaula "CICY", estas fueron analizadas he introducidas a finales del mes de Mayo. Por otra parte la detección del mes de Mayo en la jaula "Chicxulub p." mostró que una palma *P. pacifica* fue positiva a fitoplasmas y esta no presentó síntomas (Cuadro 6).



Pritchardia 3-01

Pritchardia 3-03

Figura 18. Pritchardia 3-01 y 3-03 con un necrosamiento en la hoja espada.

CAPÍTULO II

Posteriormente en los análisis del mes de Diciembre de la jaula "CICY" se observó que las nuevas palmas introducidas dieron detección positiva a fitoplasmas y solo en una se pudieron observar síntomas típicos de la infección (Cuadro 6).

Cuadro 6. Detección por PCR-TR de las palmas evaluadas en el ensayo #2

Jaula	Palma	Ene 2012			May 2012			Dic 2012			Mayo 2013 Supervivencia de las palmas	
		Ct	Detección	Síntomas	Ct	Detección	Síntomas	Ct	Detección	Síntomas		
Control	<i>Pritchardia</i>	1-01	NA	[-]	No	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
	<i>Pacifica</i>	1-02	NA	[-]	No	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
		1-03	NA	[-]	No	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
Introducción <i>H. crudus</i> CICY (Mérida)	<i>Pritchardia</i> <i>Pacifica</i> ^A	3-01	NA	[-]	No	14.26	[+]	Si	-	-	-	Muerta
		3-02	NA	[-]	No	18.91	[+]	Si	-	-	-	Muerta
		3-03	NA	[-]	No	15.72	[+]	Si	-	-	-	Muerta
	3-04	-	-	-	NA ^B	[-]	No	21.02	[+]	No	Muerta	
	3-05	-	-	-	NA ^B	[-]	No	21.25	[+]	Si	Muerta	
	3-06	-	-	-	NA ^B	[-]	No	26.30	[+]	No	Muerta	
Introducción <i>H. crudus</i> Chicxulub P.	<i>Pritchardia</i> <i>Pacifica</i>	4-01	NA	[-]	No	26.93	[+]	No	12.24	[+]	Si	Muerta
		4-02	NA	[-]	No	NA	[-]	No	22.67	[+]	No	Viva
		4-03	NA	[-]	No	NA	[-]	No	NA	[-]	No	Viva
Control DNA	[+]	-	18. 18	[+]	-	23.46	[+]	-	23.31	[+]	-	
	[-]	-	NA	[-]	-	NA	[-]	-	NA	[-]	-	

(A) Las palmas *P. pacifica* 3-01 a la 3-03 de la jaula 3 murieron después del mes de Mayo durante la prueba, y las palmas 3-04 a la 3-06 fueron introducidas en Julio para realizar una evaluación adicional durante este experimento.

(B) Primer análisis de PCR-TR en las palmas 3-04 a la 3-06 introducidas en Julio.

En la Jaula "Chicxulub p." se detectaron dos palmas positivas (Cuadro 6) y solo una de ellas presentaba manchas pequeñas en la hoja espada, En el mes de Mayo (2013) la palma se encontraba deteriorada, con un amarillamiento en las hojas y ya no generaba hojas espada. Mientras que en la palma que carecía de síntomas no se volvió a detectar fitoplasmas por PCR-TR.

2.3.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

2.3.3.1. Secuenciación y Análisis por RFLP's

Los productos de PCR fueron clonados y secuenciados; posteriormente se realizó análisis bioinformático en el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el primer ensayo se observó un porcentaje de identidad alto a fitoplasmas del grupo 16SrIV y específicamente con el subgrupo D (Cuadro 7). Este subgrupo fue reportado en palmas del genero *Sabal* sp. por Vázquez-Euán *et al* (2010) en los jardines del CICY.

Cuadro 7. Resultados de los análisis BLAST en las secuencias obtenidas de las palmas *Pritchardia pacifica* que tuvieron detección positiva en el ensayo de transmisión #1.

Prueba	Palma	Parentesco	Query Cover	Identity %	Grupo	Subgrupo	
Ensayo #1	<i>Pritchardia Pacifica</i>	2-01	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	98.34%	16Sr-IV	D
		2-02	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.77%	16Sr-IV	D
		2-03	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.82%	16Sr-IV	D
		2-04	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.59%	16Sr-IV	D

En análisis bioinformático del segundo ensayo mostro que los fitoplasmas hallados en la jaula CICY pertenecen grupo 16SrIV del subgrupo D. Por otra parte los fitoplasmas de la jaula Chicxulub puerto fueron afines al grupo 16SrIV del subgrupo A (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de los análisis BLAST en las secuencias obtenidas de las palmas *Pritchardia pacifica* que tuvieron detección positiva en el ensayo de transmisión #2 en la jaula CICY y en la Jaula Chicxulub p.

Prueba	Palma	Parentesco	Query Cover	Identity %	Grupo	Subgrupo		
Ensayo #2	<i>P. pacifica</i>	CICY	3-01	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.54%	16Sr-IV	D
			3-02	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.81%	16Sr-IV	D
			3-03	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	98.67%	16Sr-IV	D
			3-04	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.68%	16Sr-IV	D
			3-05	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.81%	16Sr-IV	D
			3-06	'Sabal palmetto' decline phytoplasma	100%	99.79%	16Sr-IV	D
	Chicxulub p		4-01	Coconut lethal yellowing phytoplasma	100%	99.46%	16Sr-IV	A
			4-02	Coconut lethal yellowing phytoplasma	99%	99.27%	16Sr-IV	A

Para apoyar los análisis bioinformático se realizaron análisis RFLP's virtuales, Empleando el programa online iphyclassifier con las secuencias de fitoplasmas de los ensayos, (plantpathology.ba.ars.usda.gov). Se manejó dos controles: Secuencia del gen 16S ADNr *Texas Phoenix* palm Phytoplasma (EF042899.1) como Subgrupo D y Coconut Lethal Yellowing Phytoplasma (HQ613874.1) como subgrupo A. Los geles virtuales nos muestran que los patrones de los fitoplasmas de la jaula CICY están relacionadas con el subgrupo 16SrIV D y las secuencias de fitoplasmas de la jaula Chicxulub muestra el mismo patrón con el subgrupo 16SrIV A.

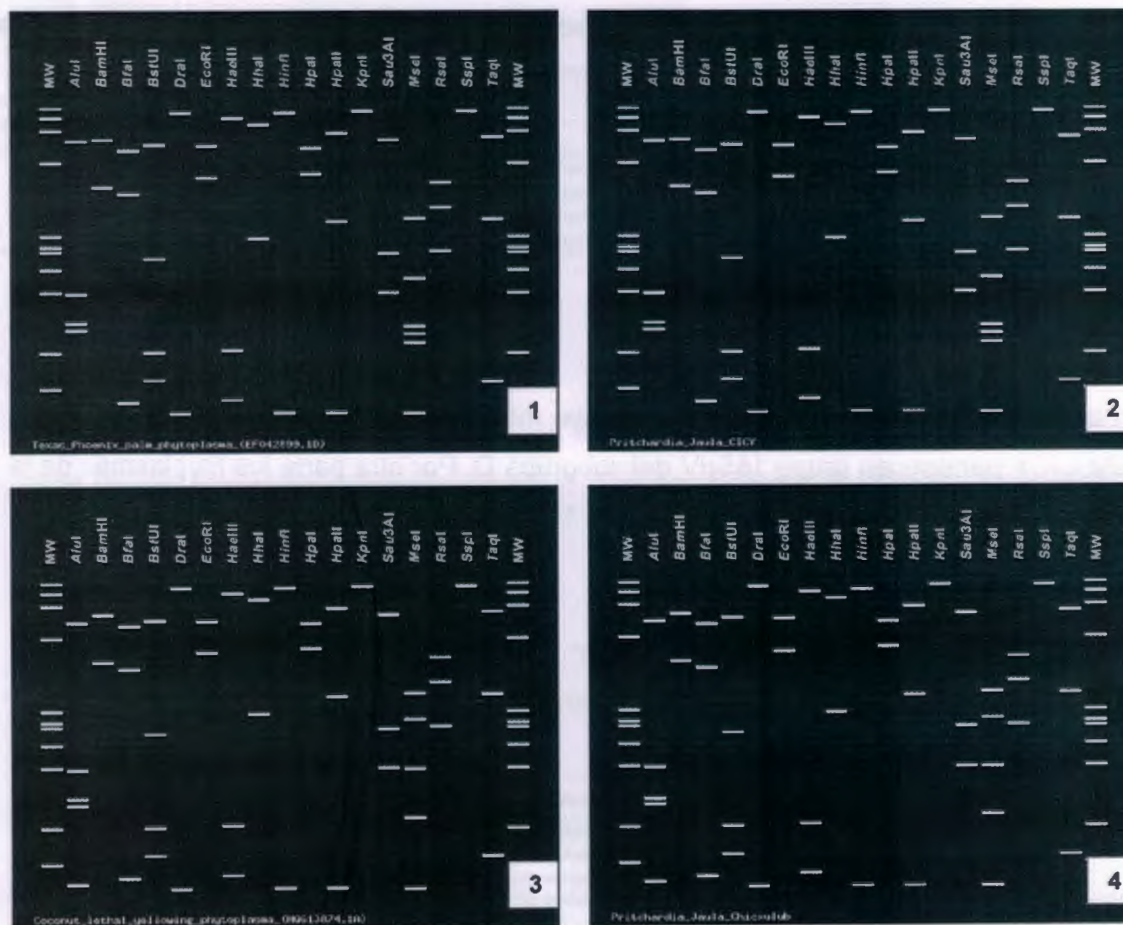


Figura 19. Análisis RFLP del gen 16S ADNr Ribosomal virtual del iphyclassifier. 1, Control *Texas Phoenix* (Subgrupo D); 2, *Pritchardia* Jaula CICY; 3, Control *Cocos nucifera* (Subgrupo A) y 4, *Pritchardia* Jaula Chicxulub.

2.3.3.2. Análisis Filogenético

Para el análisis filogenético se compararon con secuencias de fitoplasmas obtenidas en el GenBank: Subgrupo A, Florida (U18747.1), Jamaica (AF498307.1), Sabal Mexicano (GU473589.1); Subgrupo B, Yucatán (U18753.1), Oaxaca (AF500334.1), Guerrero (AF500329.1), Republica Dominicana (DQ318243.1 Y DQ631639.1); Subgrupo C, Tanzania GU952098.1, GU952117.1, FJ217385.1, X80117.1; Subgrupo D, *Texas Phoenix* (AF434989.1 Y JF91815.1), *Sabal Palmeto* (HQ613895.1), *Sabal Mexicano* (GU473585.1), *Carludovica Palmata* (AF237615.1); Subgrupo E, *Ca. Phytoplasma castaneae* (AB054986.1) y por último como grupo externo *Acholeplasma palmae* (L33734).

El análisis filogenético dio como resultado un árbol con secuencias obtenidas en este trabajo, donde quedaron dentro del grupo 16SrIV, se observa que las muestras de la jaula CICY se agrupan con las secuencias de fitoplasmas del grupo 16SrIV subgrupo D; por otra parte se observa la agrupación de las muestras de la jaula Chicxulub con las secuencias fitoplasmas del grupo 16SrIV subgrupo A (Figura 20).

Las ramas que conforman los subgrupos A, B, C y D muestras que son mayor a 60% que según el análisis neighbor-joining indica que estos grupos tienen un alto porcentaje de agrupación entre ellos el cual las muestras tienen una similitud entre el subgrupo "D" (Jaula CICY) y el subgrupo "A" (Jaula Chicxulub) respectivamente.

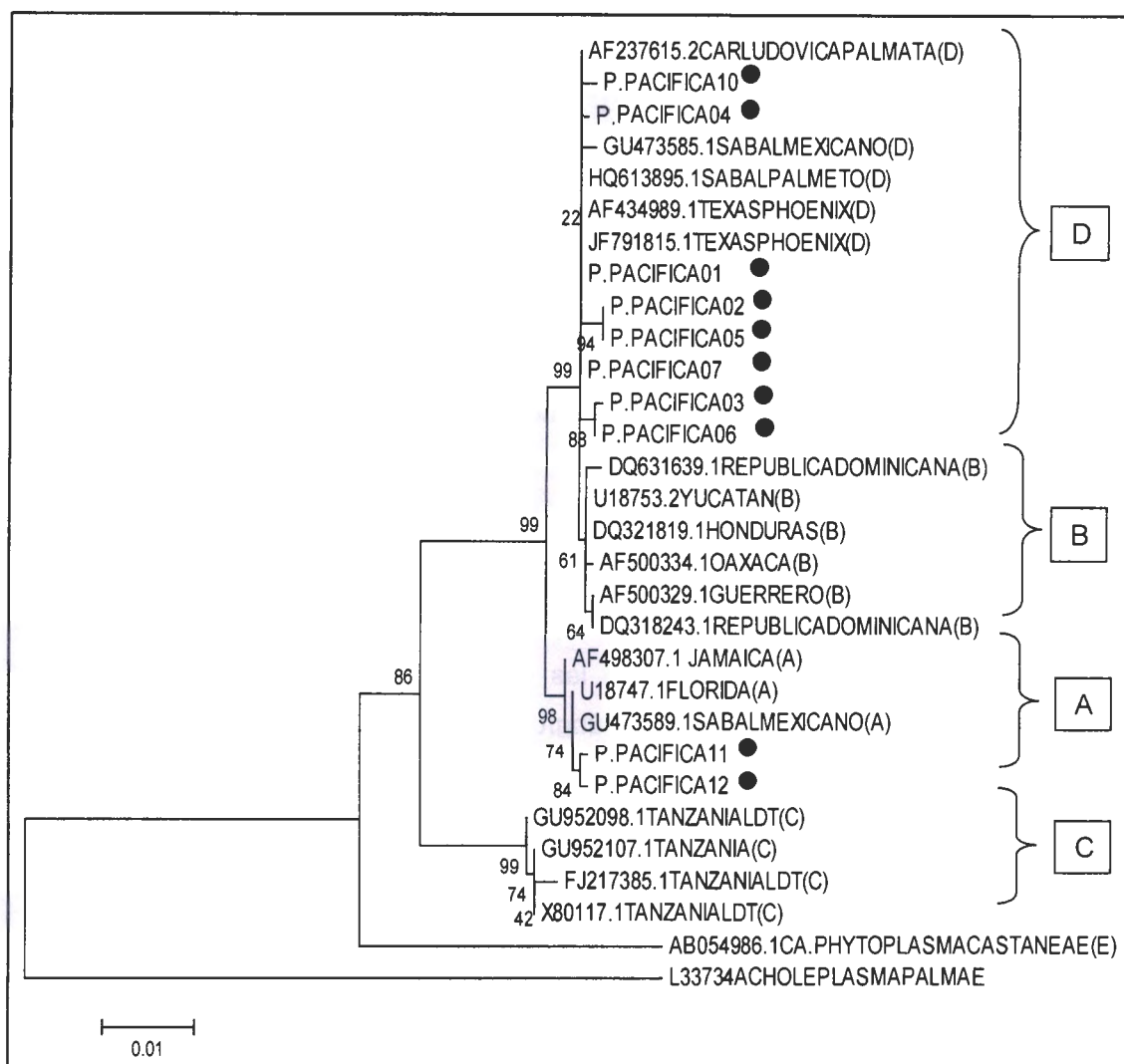


Figura 20. Árbol filogenético construido usando el método neighbor-joining (1000 repeticiones) con las secuencias del gen 16S ADNR ribosomal de 28 secuencias de fitoplasmas y *Acholeplasma palmae* como grupo externo.

2.4. DISCUSIÓN.

Experimentos de transmisión realizados en Florida (E.U.A.) demostraron por primera vez que el vector del amarillamiento letal es *Haplaxius* (antes *Myndus*) *crudus* (Howard, 1987). El insecto pertenece al suborden Auchenorrhyncha (Hemiptera) grupo de insectos conocidos por ser transmisores de fitoplasmas (Phyllis y Phil, 2010). Las especies de plantas evaluadas en aquel entonces fueron *C. nucifera*, *Veitchia merrillii* y *Pritchardia Thurstonii*, y dichas palmas presentaron síntomas al cabo de varios meses de ser sometidas a los ensayos de transmisión. Dicho experimento fue la primera y única evidencia de la transmisión del fitoplasma del AL empleando al insecto y hasta la fecha no se había logrado reproducir (Howard, 1987).

Una de las palmas evaluadas en los ensayos de Florida fue del genero *Pritchardia*, de importancia ornamental. Esta palma es muy susceptible a la infección de fitoplasmas y al cabo de unos meses la palma muere (Howard, 1987) lo cual la hace candidata a evaluar en la transmisión de fitoplasmas en Yucatán.

La primera evaluación de transmisión se detectó fitoplasmas del grupo 16SrIV por medio de PCR-TR. En este ensayo se colectaron de poblaciones *H. crudus* en diferentes sitios (Jardines del CICY, en Chicxulub puerto, en viveros y fraccionamientos). En los primeros seis meses del experimento se observó necrosamiento de la hoja espada y posteriormente las hojas presentaron un amarillamiento típico por la infección de fitoplasmas y los análisis *in silico* determinaron que pertenecen al subgrupo "D", el cual fue reportado en palmas del genero *Phoenix* y *Sabal* en Florida, mientras que en Mérida, Yucatán fue reportado por Vázquez-Euán *et al* (2010) en palmas de *Sabal Mexicana*. Con anterioridad se reportó en *Pritchardia* se infectaba con el grupo 16SrIV subgrupo A (Harrison y Elliot, 2007), pero se observó en este trabajo que las palmas son altamente susceptibles a fitoplasmas del subgrupo "D" y fue letal en todas las plantas.

El segundo experimento de transmisión se identificaron dos sitios importantes de colecta de *H. crudus*: Chicxulub puerto reportado la presencia del fitoplasma 16SrIV subgrupo "A" y en los jardines del CICY donde se ha reportado el subgrupo "D" en *Sabal* sp. y el "A" en *Thrinax radiata* (Vázquez-Euán *et al*, 2010).

Todas las palmas evaluadas en la jaula CICY fueron positivas a fitoplasmas por PCR-TR y los análisis *in silico* indicaron que son fitoplasmas del subgrupo "D". Estos datos nos indica que las *Pritchardia* son altamente susceptibles a este subgrupo de fitoplasmas, que también fue encontrado en palmas del genero *Sabal* (Vázquez-Euán *et al*, 2010). Los análisis moleculares nos indicaron la presencia de fitoplasmas desde al cuarto mes del ensayo y estos carecían de síntomas (necrosamiento); pero al sexto mes la planta empezó a mostrar un necrosamiento en la hoja espada como sucedió en el ensayo #1, lo cual nos hace pensar que este síntoma está relacionado con este subgrupo en especial.

Por otra parte, en la jaula Chicxulub p. al quinto mes se detectó una planta positiva a fitoplasmas por PCR-TR y esta carecía de síntomas. Hasta el doceavo mes se volvió a detectar fitoplasmas y esta presento amarillamiento en las hojas, mientras que otra de las palmas de esta jaula solo se detectó fitoplasmas por PCR-TR sin síntomas. Los análisis *in silico* mostraron que los fitoplasmas de las palmas pertenecen al subgrupo "A" corroborando lo reportado por Harrison y Elliot (2007). La palma que presento síntomas del AL pereció al tres meses después de finalizado el ensayo mientras que la palma asintomática permaneció sana y no volvió a detectarse presencia de fitoplasmas.

El presente estudio demostró la transmisión de dos cepas de fitoplasmas en la palma *P. pacifica* una perteneciente al subgrupo "D" y otra al subgrupo "A", por lo cual, es posible que el insecto *H. crudus* sea el vector potencial de estas dos cepas en la palma *P. pacifica* así como otras especies de palmas (incluyendo *Cocos nucifera*), y este resultado se apoya con lo reportado por Vázquez-Euán (2010) que concluyo que el insecto es capaz de tener una de las dos cepas antes mencionadas. Cabe mencionar que no se encontraron dos cepas en una misma planta, e inclusive se denoto que la presencia del subgrupo "D" es altamente letal en todos los casos mientras que el subgrupo A es menos agresivo en estas plantas, por lo cual se puede a llegar a pensar que la palma posee cierta resistencia al subgrupo "A" que es letal en una gran variedad de palmas.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Ceotto P., Kergoat G., Rasplus J-Y and Bourgoïn T. (2008). Molecular phylogenetic of cixiid planthoppers (Hemiptera: Fulgoromorpha): New insights from combined analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetic and Evol.* 48: 667-678.
- Christensen N.M., Nicolaisen M., Hansen M. and Schulz A. (2004). Distribution of Phytoplasmas in infected plants as revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Technical Advance. The American Phytopathology Society.* 17(11) 1175-1184
- Cordova I., Jones P., Harrison N.A. and Oropeza C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology.* 4 (2), 99-108
- Deng S. and Hiruki C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods.* 53-61.
- Dollet M., Quaiçoe R. and Pilet F. (2009). Review of coconut "Lethal Yellowing" type diseases Diversity, variability and diagnosis. *Agronomie-Environnement. OCL.* 16(02): 97-101
- Doyle J.J. and Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Foc.* 12: 13-15.
- Harrison N.A., Narváez M., Almeyda H., Cordoba I., Carpio M.L. and Oropeza C. (2002). First report of group 16SrIV Phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *Plant Pathology.* 51, 808
- Harrison N.A. and Elliott M.L. (2007). Lethal Yellowing (LY) of palm. *Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.* 222p
- Harrison N.A. and Oropeza C. (2008). Coconut Lethal Yellowing. *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Texas, USA.* Pp. 219-248.
- Harrison N.A., Womack M., Carpio M.L. (2002). Detection and Characterization of a Lethal Yellowing (16SrIV) Group Phytoplasma in Canary Island Date Palms Affected by Lethal Decline in Texas. *The American Phytopathological Society. Plant Disease.* 86(6): 676-681.
- Henson J. and Frech R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytophanol.* 31:81 – 109.

- Hodgetts J., Boonham N., Munford R., Harrison N. and Dickinson M. (2008). Phytoplasmas phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of "*Candidatus* Phytoplasma". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1826-1837.
- Howard F.W. (1987). *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae), a vector of Lethal Yellowing of Palms. Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of economic Importance. Pp. 117-129
- Howard F.W. (2006). American Palm Cixiid, *Myndus crudus* Van Duzee (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha: Fulgoroidea: Cixiidae). Featured Creatures from Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. EENY-389
- Myrie W., Oropeza C., Sáenz L., Harrison N., Roca M., Cordoba I., Ku S. and Douglas L. (2011). Reliable improved molecular detection of coconut lethal yellowing phytoplasma and reduction of associated disease through field management strategies. *Bulletin of Insectology*. 64: 203-204.
- Phyllis G. and Phil J. (2010). Phytoplasmas, Genomes, plant host and vectors. CABI. Mixed Sources. 1, 293 p.
- Torres E., Bertolini E., Cambra M., Montón C. and Martín M.P. (2005). Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine Phytoplasmas from Apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19, pp. 334-340
- Triplehorn C.A. and Johnson N.F. (2005). Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. 7th Edition. Thomson – Brooks/Cole.
- Vázquez-Euán R.C. Harrison N., Narvaez M. and Oropeza C. (2010). Occurrence of a lethal yellowing group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *The American Phytopathological Society. Plant Disease*. 95:256-262.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1. CONCLUSIONES

El insecto *Haplaxius crudus* es capaz de transmitir al fitoplasma relacionado con el amarillamiento letal a la palma *Pritchardia pacifica*.

El monitoreo de la palma *P. pacifica* nos muestra que presenta síntomas de amarillamiento en las hojas y pudrición de la hoja espada causados por la infección de fitoplasmas.

Por medio de análisis moleculares se confirmó la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrIV presentes en las palmas infectadas en los ensayos de transmisión.

Los estudios demostraron la presencia de fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D en las palmas de *Pritchardia pacifica* evaluadas en los ensayos.

3.2. PERSPECTIVAS

Para poder iniciar ensayos de transmisión de cocotero, se deberán realizar estudios de Microsatélites, en la cual se deberá encontrar material susceptible al AL fuera del Estado de Yucatán, ya que las variedades de cocotero de la entidad es una mezcla de material resistente al amarillamiento letal. Con el nuevo material vegetal colectado y analizado, se espera poder realizar un estudio de transmisión en cocotero en óptimas condiciones para obtener resultados alentadores.

A su vez, este trabajo de transmisión puede servir para evaluar las diferentes variedades de cocotero y otras palmas de carácter ornamental que podrían ser susceptibles o resistentes a la enfermedad y así corroborarlo por análisis moleculares.

