



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DEL  
AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO EN  
YUCATÁN**

Tesis que presenta:

**PABLO JOSÉ PALMA CANCINO**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Marzo de 2016



---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

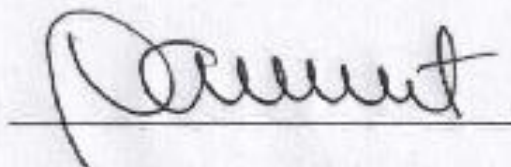
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Pablo Palma Cancino** titulado "**Evaluación de la incidencia del Amarillamiento Letal del Cocotero en Yucatán**" 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 Mariano Oropeza Salín**, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este centro.

Atentamente,



Dr. Manuel Martínez Estévez

\* Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

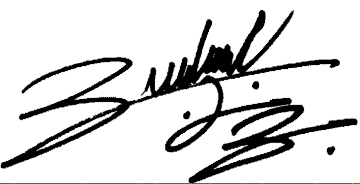
Mérida, Yucatán, México, a 10 de febrero de 2016



Mérida, Yucatán, México; a 10 de febrero de 2016

## 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, 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: Pablo José Palma Cancino



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Estudios sobre los mecanismos de defensa del cocotero a fitoplasmas del amarillamiento letal” (CONACYT-Ciencia Básica), con clave 0129717, bajo la dirección del Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín.





## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a los principales responsables de este logro: mis padres David Jesús y Judith Argelia, seres humanos maravillosos y ejemplos vivientes de amor incondicional. Las palabras nunca serán suficientes.

A mis hermanos David Julián y Davira Yolanda, por inspirarme el gusto por el estudio de la vida y por todo el cariño mostrado. Por convertirse en modelos de superación profesional y de unidad fraternal.

A mi familia, porque sólo hay una. Su amor continúa engrandeciéndome día a día.

Al Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín, por haberme otorgado su apoyo, confianza y amistad. Por haber contribuido con su amplia experiencia en la realización del presente trabajo. Por todos sus años de dedicación y aportaciones.

Al Dr. Carlos Fredy Ortiz García, por haber sido desde la infancia un ejemplo a seguir, un exponente cercano del maravilloso mundo de la investigación científica y, por encima de todo, un gran amigo. Por todos sus consejos, enseñanzas y contribuciones durante la realización de esta tesis.

A los Drs. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Jorge Manuel Santamaría Fernández y Julián Everardo García Rejón, por sus valiosas aportaciones durante el proceso de revisión y por el apoyo desinteresado que me ofrecieron en las etapas finales de mi formación.

A los Maestros en Ciencias María Narváez Cab, Yajima Yahosca Osorno Borst y Rafael César Sánchez Borges, compañeros de muestreo, invaluableles consejeros, entrañables amigos. Conocer gran parte de Yucatán en compañía vuestra fue una aventura sumamente enriquecedora.

A la IBQ Ana María Collí Rodríguez, por todas sus enseñanzas, imposibles de enumerar en estas cortas líneas. Por su preciada amistad. Porque este trabajo no hubiera sido posible sin ella.



A todos mis profesores de posgrado, por ser grandes intérpretes del lenguaje de la ciencia, por su interés en la docencia y por transmitirme tan hermosos ideales.

A los Drs. Manuel Luis Robert Díaz, Jorge Humberto Ramírez Prado y Rodrigo Duno de Stefano, por haberme recordado lo amplia y diversa que puede ser nuestra ciencia, por impartir cátedras tan completas e inspiradoras y por su constante lucha en contra de la ignorancia humana en las aulas. Por su capacidad inaudita de expandir la mente en tan poco tiempo.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por todas las oportunidades de crecimiento personal y profesional procuradas.

A la Maestra en Ciencias Amaranta Girón Ramírez, por enseñarme lo mucho que puede amarse una sonrisa. Por haber sido mi primera amistad en Mérida. Por ser la depositaria de mi ternura, artífice de mis sueños, triunfadora de mis flores y de mis versos. Por toda la felicidad provocada.

Al Maestro en Ciencias Víctor Jesús Cancino García, por haberme brindado su sincera amistad. Por su calidad de compañero. Por las pláticas y consejos inolvidables. Por todo lo que está por venir.

A los también Maestros Edgar Gamaliel, Ana Guadalupe, Gerardo y Mario Manuel, por haber facilitado con su compañía la realización de esta meta. Por todo su apoyo. Por lo mucho que significa para mí su amistad.

A mis amistades del CICY: Alfredo, Max, Mickel, Ileana, Felipe, Gustavo, Raymundo, Wendy, Landy, Daniela, Miguel Ángel, Jaqueline, Irina, Carlos, Jorge, Santiago, Lilia, Arantxa, Fátima y Rosa. Por todos los momentos compartidos.

A mi queridísima amiga, la Maestra en Ciencias Andrea Carolina Elizondo Salas, por su confianza, su apoyo, su paciencia y su amor. Por inspirarme al nunca rendirse. Por conservar la cercanía todos estos años.



Al Biol. Omar Olivares Mora, por inspirarme una y otra vez con su humildad característica, por su extraordinario deseo de siempre acompañarme con una copa (a pesar de la distancia) y por demostrarme la verdadera utilidad del Skype. Porque no hay mejores y más sinceras pláticas que las suyas.

Al también Biol. Francisco Javier Magaña Pérez, por su gigantesca nobleza, su desmedida bondad y su genuina persona. Por el orgullo de contarle entre mis mejores amigos.

A mis amigos de Xalapa: Rayenari, Octavio, Alfonso, Isis, Bruno y “Doctor”, porque siempre estarán ligados a mi recuerdo de aquellos hermosos años.

Al IQI Jorge Miguel Adrián Mendiola, por la grandeza de una amistad que se remonta a los años perdidos de la adolescencia cardenense. Por la felicidad que me trajo nuestro agradable reencuentro.

A mis compañeros de laboratorio: Iván, Gabriela, Carlos, Germán, Nallely, Damaris, Sharon, Luis, Celso, Gustavo y Manuel. Por haber creado un entorno favorable para el crecimiento científico y personal de todos los involucrados en la ciencia del Amarillamiento Letal del Cocotero en el CICY. Por todos los pasteles y la legendaria “chicharra”.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca autorizada con número de registro 288968 y los fondos otorgados al proyecto “Estudios sobre los mecanismos de defensa del cocotero a fitoplasmas del amarillamiento letal”, con clave 0129717.



*A mi familia:*

*David Jesús, Judith Argelia,*

*David Julián y Davira Yolanda.*

*A todos los profesores que me han inspirado.*

*A la memoria de Celia Izquierdo Romo,*

*por haber marcado positivamente*

*la vida de muchos seres queridos.*





“This is so remarkable I want to stress it again. Quantum fluctuations, which otherwise would have been completely invisible, get frozen by inflation and emerge afterward as density fluctuations that produce everything we can see! If we are all stardust, as I have written, it is also true, if inflation happened, that we all, literally, emerged from quantum nothingness.”

Lawrence M. Krauss

*A Universe from Nothing: Why There Is Something Rather than Nothing*



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Fitoplasmas: Características generales, filogenia, taxonomía y clasificación .....	<b>7</b>
1.2.2 Fitoplasmas: vectores y transmisión .....	<b>14</b>
1.2.3 Amarillamiento Letal del Cocotero: agentes causales, zona de influencia e insecto vector .....	<b>15</b>
1.2.4 Amarillamiento Letal del Cocotero: síntomas, ciclo de infección y manejo de la enfermedad .....	<b>22</b>
1.2.5 Historia del ALC en América: Incidencia en México y Yucatán.....	<b>26</b>
<b>1.3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>30</b>
1.4.1 Objetivos particulares .....	<b>30</b>
<b>1.5 REFERENCIAS</b> .....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>49</b>
2.1.1 Fitoplasmas y sus vectores.....	<b>49</b>
2.1.2 <i>Haplaxius crudus</i> : características generales .....	<b>50</b>

2.1.3 <i>H. crudus</i> como vector del ALC.....	52
2.1.4 Porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en <i>H. crudus</i> .....	53
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
2.2.1 Sitios de colecta para la captura de insectos <i>H. crudus</i> .....	54
2.2.2 Método para la captura de insectos <i>H. crudus</i> .....	57
2.2.3 Extracción de ácidos nucleicos de insectos <i>H. crudus</i> .....	59
2.2.4 Análisis de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en insectos <i>H. crudus</i> por reacciones de PCR en tiempo real.....	60
<b>2.3 RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
2.3.1 Captura de insectos <i>H. crudus</i> .....	61
2.3.2 Extracción de ácidos nucleicos de insectos <i>H. crudus</i> .....	62
2.3.3 Detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en insectos <i>H. crudus</i> por reacciones de PCR en tiempo real .....	63
<b>2.4 DISCUSIÓN</b> .....	<b>66</b>
<b>2.5 REFERENCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>75</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>75</b>
3.1.1 Amarrillamiento Letal del Cocotero .....	75
3.1.2 <i>Pritchardia pacifica</i> : origen y su relación con fitoplasmas del grupo del ALC ...	75
3.1.3 Mortandad de <i>P. pacifica</i> observada en el CICY en forma natural y en ensayos de transmisión en jaulas realizados con insectos <i>H. crudus</i> .....	77

3.1.4 Empleo de <i>P. pacifica</i> para determinar la persistencia local de fitoplasmas del grupo del ALC en el ambiente de los jardines del CICY .....	79
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>80</b>
3.2.1 Experimento de infección natural con fitoplasmas del grupo del ALC en <i>P. pacifica</i> .....	80
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	<b>83</b>
3.3.1 Detección de fitoplasmas del grupo del ALC en <i>P. pacifica</i> por PCR en tiempo real .....	83
<b>3.4 DISCUSIÓN</b> .....	<b>84</b>
<b>3.5 REFERENCIAS</b> .....	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>89</b>
<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>89</b>
4.1.1 Amarillamiento Letal del Cocotero .....	89
4.1.2 Historia del ALC en América, México y Yucatán .....	90
4.1.3 Previos brotes de ALC y síndromes relacionados en palmas del estado de Yucatán .....	91
4.1.4 Estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en Yucatán	93
<b>4.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>94</b>
4.2.1 Colecta de palmas sintomáticas: procedimiento y sitios de muestreo .....	94
4.2.2 Extracción de ácidos nucleicos de las palmas colectadas y análisis de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC mediante PCR en tiempo real.....	96
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	<b>96</b>

4.3.1 Colecta del material vegetal de las palmas sintomáticas.....	96
4.3.2 Detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en las palmas muestreadas por reacciones de PCR en tiempo real .....	97
<b>4.4 DISCUSIÓN .....</b>	<b>102</b>
<b>4.5 REFERENCIAS.....</b>	<b>107</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>111</b>
<b>5.1 DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>111</b>
<b>5.2 CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>115</b>
<b>5.3 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>116</b>
<b>5.4 REFERENCIAS.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>121</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Cocos nucifera</i> L. ....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Fitoplasmas del ALC en <i>C. nucifera</i> , <i>Pritchardia pacifica</i> y <i>Adonidia merrillii</i> vistos por microscopía electrónica.....	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Fotografías en placa de agar de colonias de fitoplasmas de distintas variedades .....	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b> Área general de influencia del ALC y síndromes relacionados en el continente así como países e islas en los que se han detectado fitoplasmas del grupo 16SrIV.....	<b>18</b>
<b>Figura 5.</b> Individuo adulto de la especie <i>Haplaxius crudus</i> .....	<b>19</b>
<b>Figura 6.</b> Insectos adultos de <i>H. crudus</i> de ambos sexos vistos a través de un microscopio estereoscópico .....	<b>21</b>
<b>Figura 7.</b> Los cinco ínstares ninfales de <i>H. crudus</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del ciclo de infección de un fitoplasma.....	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b> Sintomatología seriada del ALC en cocoteros enfermos .....	<b>25</b>
<b>Figura 10.</b> Individuos macho y hembra de <i>H. crudus</i> copulando sobre una hoja de palma de la especie <i>P. pacifica</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 11.</b> Sitio de colecta jardines del CICY, para la captura de insectos <i>H. crudus</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 12.</b> Sitio de colecta localidad de Chicxulub Puerto, para la captura de insectos <i>H. crudus</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 13.</b> Diseño de colecta y método de captura de insectos <i>H. crudus</i> en las plantas donde se alimentan.....	<b>58</b>
<b>Figura 14.</b> Visualización de DNA de <i>H. crudus</i> en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de los primeros 40 insectos para la prueba del porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en el sitio de captura jardines del CICY.....	<b>62</b>

<b>Figura 15.</b> Visualización de DNA de <i>H. crudus</i> en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de 39 insectos para la prueba del porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en el sitio de captura Chicxulub Puerto .....	<b>63</b>
<b>Figura 16.</b> <i>P. pacifica</i> Seem. & H.Wendl. ....	<b>76</b>
<b>Figura 17.</b> Individuos de <i>P. pacifica</i> con síntomas de ALC, sembrados en los jardines del CICY .....	<b>77</b>
<b>Figura 18.</b> Ejemplares jóvenes de <i>P. pacifica</i> empleados en un experimento previo de exposición natural al vector en el sitio de jardines del CICY.....	<b>78</b>
<b>Figura 19.</b> Ejemplares de <i>P. pacifica</i> utilizados en el experimento de infección con fitoplasmas del grupo del ALC.....	<b>81</b>
<b>Figura 20.</b> Visualización de DNA de <i>P. pacifica</i> en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de las 20 palmas incluidas en el experimento de infección con fitoplasmas del grupo del ALC, con material extraído el 8 de diciembre de 2014 .....	<b>83</b>
<b>Figura 21.</b> Sintomatologías producidas por fitoplasmas del grupo del ALC en tres especies de palmas presentes en la península de Yucatán .....	<b>90</b>
<b>Figura 22.</b> Síntomas sugestivos de ALC y síndromes relacionados en las especies <i>Thrinax radiata</i> y <i>C. nucifera</i> .....	<b>95</b>
<b>Figura 23.</b> Visualización de DNA de palmas de distintas especies en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de las palmas colectadas en los fraccionamientos Real Montejo y Francisco de Montejo, en la ciudad de Mérida .....	<b>98</b>
<b>Figura 24.</b> Sitios del estado de Yucatán en los que se determinó la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en palmas sintomáticas de distintas especies durante los periodos 2005-2013 y 2015.....	<b>102</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Listado de los diez países con mayor producción de coco en el año 2013 .....	<b>6</b>
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de los distintos subgrupos de fitoplasmas basada en lo establecido por Lee <i>et al.</i> (1998).....	<b>12</b>
<b>Cuadro 3.</b> “ <i>Candidatus Phytoplasma palmae</i> ” y otras cepas filogenéticamente relacionadas y sus enfermedades.....	<b>16</b>
<b>Cuadro 4.</b> Especies de palmeras en las que se ha detectado positiva la presencia del fitoplasma “ <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> ” en plantas sintomáticas.....	<b>17</b>
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación taxonómica de la especie <i>Haplaxius crudus</i> .....	<b>20</b>
<b>Cuadro 6.</b> Porcentajes de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres del insecto <i>H. crudus</i> de dos sitios distintos del estado: jardines del CICY y localidad de Chicxulub Puerto.....	<b>53</b>
<b>Cuadro 7.</b> Mezcla de reacción empleada en los procesos de detección por PCR en tiempo real.....	<b>60</b>
<b>Cuadro 8.</b> Resultados del análisis de detección por PCR en tiempo real de la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en el cuerpo de 52 insectos capturados en el sitio de colecta jardines del CICY durante noviembre de 2013.....	<b>64</b>
<b>Cuadro 9.</b> Resultados en grupos de cinco del análisis de detección por PCR en tiempo real de la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en el cuerpo de los primeros 310 insectos capturados en el sitio de colecta Chicxulub Puerto durante el periodo de febrero-abril de 2014 .....	<b>65</b>
<b>Cuadro 10.</b> Resultados del análisis de detección por PCR en tiempo real de la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en el cuerpo de los últimos 26 insectos capturados en el sitio de colecta Chicxulub Puerto durante febrero de 2015 .....	<b>65</b>

<b>Cuadro 11.</b> Resultados obtenidos de las reacciones de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas del grupo del ALC en las 20 palmas <i>Pritchardia pacifica</i> incluidas en el experimento de infección .....	<b>84</b>
<b>Cuadro 12.</b> Análisis de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en palmas de <i>Cocos nucifera</i> con síntomas sugestivos de ALC, muestreadas en distintas localidades del estado de Yucatán, durante el periodo 2005-2009.....	<b>92</b>
<b>Cuadro 13.</b> Datos de colecta de los individuos muestreados para la evaluación de la incidencia actual del ALC y síndromes relacionados en las palmas del estado de Yucatán. ....	<b>97</b>
<b>Cuadro 14.</b> Resultados obtenidos de las reacciones de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en las palmas sintomáticas que fueron muestreadas en distintos puntos del estado.....	<b>99</b>
<b>Cuadro 15.</b> Casos positivos y sintomáticos de ALC en palmas de <i>C. nucifera</i> muestreadas en distintos sitios del estado de Yucatán, durante el periodo 2005-2009 y el año 2015.	<b>101</b>

## RESUMEN

En el continente americano, el cocotero y muchas otras especies de palmas se encuentran amenazadas por enfermedades causadas por fitoplasmas del grupo 16SrIV. Entre tales enfermedades destaca el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), misma que es transmitida por el hemíptero *Haplaxius crudus* Van Duzee. En la presente investigación, inicialmente se buscó determinar el número de individuos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres de *H. crudus*, no obstante, resultados preliminares mostraron una aparente reducción en el número de infectados en comparación con años anteriores, fenómeno que sugería una disminución proporcional en la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de sus respectivos ambientes. El ALC ha estado presente en la península de Yucatán por más de 35 años, sin embargo, su incidencia ha variado geográficamente y a través del tiempo. Debido a lo anterior se realizó un estudio sobre el estado actual de la incidencia de las enfermedades del grupo del ALC en Yucatán, tanto en palmas como en poblaciones silvestres de *H. crudus*. A partir de los resultados obtenidos, se determinó que el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de la entidad muestra una disminución a nivel general y una baja en el número de casos positivos de esta enfermedad en las localidades de Ticul, Chelem, Celestún, Sisal, Santa Clara, Chicxulub Puerto y la ciudad de Mérida, permaneciendo constante en San Crisanto y aumentando en las poblaciones de Chabihau y Telchac Puerto. Estos resultados concuerdan con los análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC realizados en las poblaciones silvestres de *H. crudus*, en los cuales no se encontraron individuos infectados.



## ABSTRACT

In the Americas, coconut and many other palm species are currently threatened by diseases caused by group 16SrIV phytoplasmas, most notably by Lethal Yellowing (LY), which in turn is transmitted by the planthopper *Haplaxius crudus* Van Duzee. The present study initially sought to determine the number of individuals carrying LY group phytoplasmas in wild populations of *H. crudus*, however, preliminary results showed an apparent reduction in the number of insect carriers in comparison with previous years, a phenomenon that suggested a corresponding decrease in the incidence of LY and related diseases in the palms of their respective environments. LY has been present in the Yucatán Peninsula for over 35 years, however, its incidence has fluctuated both geographically and over the course of time. Because of this, a diagnosis of the current state of the incidence of LY in the state of Yucatán was conducted in the present study, in which both palms and wild populations of *H. crudus* were sampled. Based on the obtained results, it was concluded that the current state of the incidence of LY and related diseases in the palms of Yucatán shows an overall decrease and a similar drop in the number of positive LY cases in the communities of Ticul, Chelem, Celestún, Sisal, Santa Clara, Chicxulub Puerto and the city of Mérida, remaining constant in San Crisanto and increasing only in the towns of Chabihau and Telchac Puerto. This is consistent with the results obtained for the detection analysis of LY group phytoplasmas made in the populations of *H. crudus* that were sampled, in which no positive insects were found.



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES

#### 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El cocotero (Fig. 1), *Cocos nucifera* L., es una planta perteneciente a la familia Arecaceae y la única especie del género *Cocos*. Llamado también árbol de la vida o árbol de los mil usos, el cocotero es mundialmente reconocido y apreciado debido al número amplio de productos que pueden aprovecharse de él, siendo éste uno de los cultivos más representativos de las zonas costeras tropicales.



Figura 1. *C. nucifera* L. (Köhler, 1898).

El fruto del cocotero, denominado universalmente como “coco”, es considerado el recurso más importante de este vegetal; se emplea principalmente como fuente de alimento (en forma de pulpa o agua, para consumo directo o para la elaboración de dulces y leche). También es utilizado para la obtención de copra y fibra. En 2013 la producción mundial de coco ascendió a un total de 62,450,192 toneladas; México produjo 1,064,400 toneladas, ocupando el octavo lugar a nivel mundial (FAO, 2013a). El cuadro 1 muestra los diez países con mayor producción actual de coco. En México, las entidades productoras de coco son, por orden alfabético: Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán.

**Cuadro 1.** Listado de los diez países con mayor producción de coco en el año 2013 (FAO, 2013a).

<b>País.</b>	<b>Producción anual de coco en toneladas.</b>	<b>Porcentaje aportado de la producción mundial total.</b>
Indonesia	18,300,000.00	29.30%
Filipinas	15,353,200.00	24.58%
India	11,930,000.00	19.10%
Brasil	2,890,286.00	4.62%
Sri Lanka	2,513,000.00	4.02%
Vietnam	1,303,825.00	2.08%
Papúa Nueva Guinea	1,200,000.00	1.92%
México	1,064,400.00	1.70%
Tailandia	1,010,000.00	1.61%
Malasia	646,932.00	1.03%
<b>Mundial</b>	<b>62,450,192.00</b>	<b>100.00%</b>

La industria del cocotero, con sus diferentes productos derivados, cuenta con un mercado cada vez más amplio; esto representa un gran potencial económico para los países productores de cocotero. En el caso del agua de coco envasada, el país más exitoso actualmente es Brasil, donde el mercado ha crecido más de diez veces en los últimos 15 años, con PepsiCo como una de las principales empresas en este rubro. El mismo fenómeno ocurre en Estados Unidos y Europa, con productos como O.N.E.™ (PepsiCo), ZICO® (The Coca-Cola Company) y Vita Coco® (Dr Pepper Snapple Group). Otros derivados con mercados similares en crecimiento son el aceite virgen, el azúcar y la leche de coco. Todos ellos están orientados al mercado de productos benéficos para la salud humana, por lo que la expectativa es que su demanda aumente, sin embargo, para aprovechar este crecimiento es necesario incrementar la producción actual de este



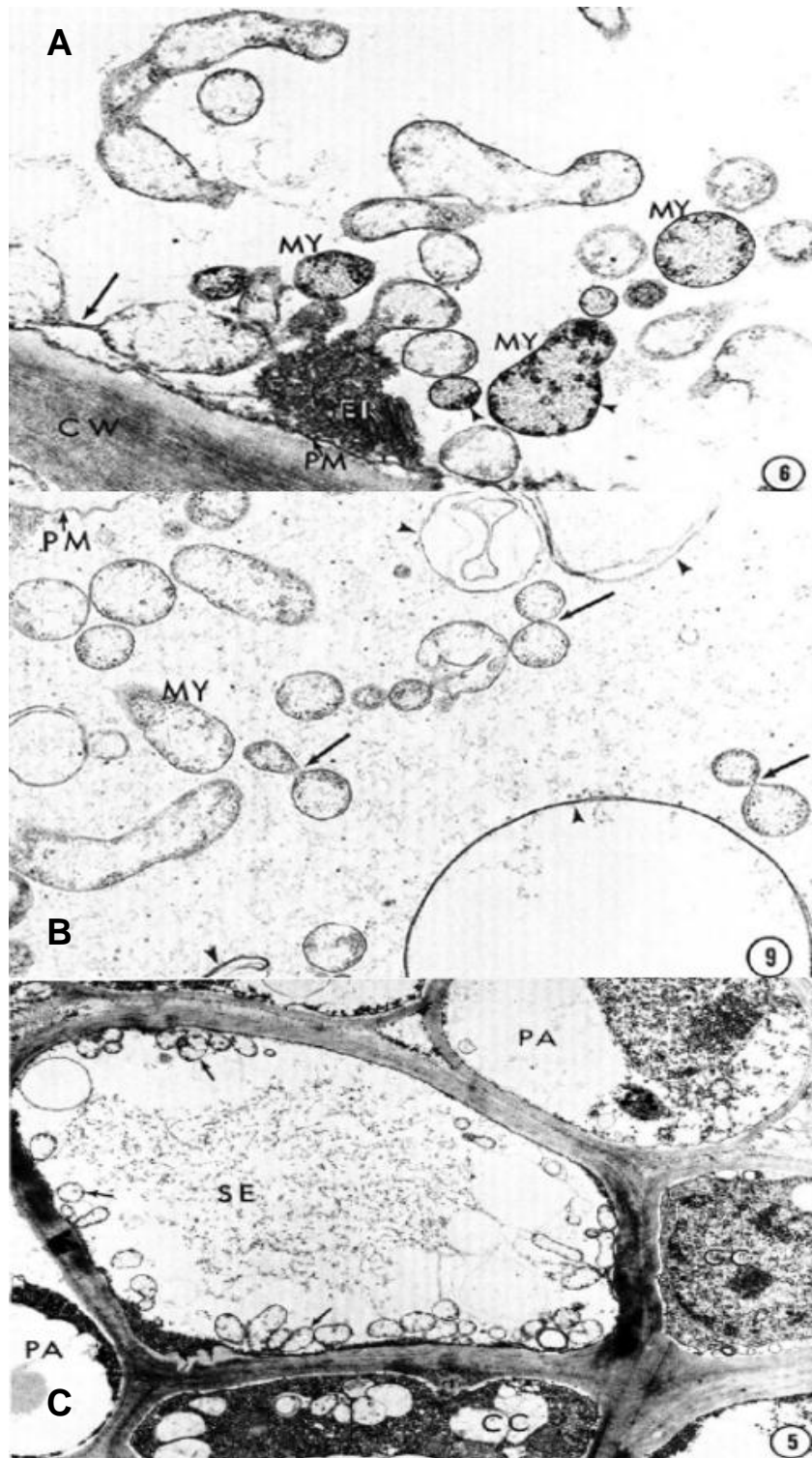
cultivo, hecho que presenta dificultades debido a la elevada edad de las plantaciones de los principales países productores asiáticos como Indonesia y Filipinas (FAO, 2013b) y a los severos problemas fitosanitarios que afectan a los cocoteros alrededor del mundo.

Entre las enfermedades que afectan a la especie destacan el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) y sus síndromes relacionados, causados por fitoplasmas (Ntushelo *et al.*, 2013; McCoy *et al.*, 1983), los cuales han destruido millones de palmas de coco en el Caribe, América latina y África, principalmente. El ALC ha estado presente en la península de Yucatán desde 1977 (McCoy *et al.*, 1982) y hasta la fecha continúa afectando a los cocoteros y a otras palmas nativas. Sin embargo, durante este periodo, su incidencia ha variado tanto a nivel de las especies afectadas como geográficamente, hechos que demuestran la existencia de distintos niveles de riesgo para la producción de coco a nivel regional.

## 1.2 ANTECEDENTES GENERALES

### 1.2.1 Fitoplasmas: Características generales, filogenia, taxonomía y clasificación

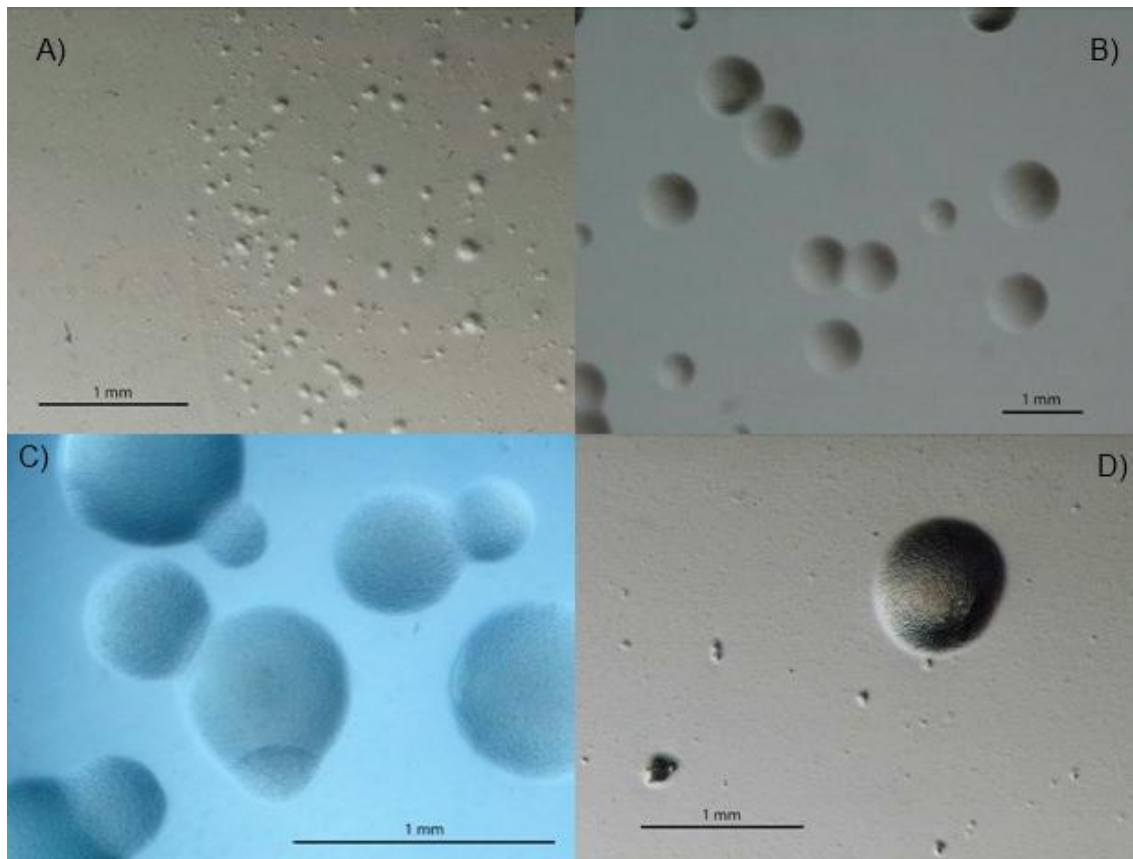
Los fitoplasmas son un grupo particular de bacterias especializadas que colonizan el floema de sus plantas hospederas (Fig. 2). Estos fitoparásitos obligados fueron reportados por primera vez en 1967 y descritos como “Organismos Tipo Micoplasma” o MLOs (por las siglas de su nomenclatura en inglés: *Mycoplasma-like organisms* (Doi *et al.*, 1967)). De manera general, los fitoplasmas son procariontes de formas pleomórficas que carecen de pared celular, con diámetros usualmente menores a 1  $\mu\text{m}$  (Lee *et al.*, 2000). El tamaño de sus genomas oscila entre 530,000 y 1350 pb (Marccone *et al.*, 1999; Neimark y Kirkpatrick, 1993), con un contenido de G+C aproximado de 23-29% (Kollar y Seemüller, 1989; Sears *et al.*, 1989).



**Figura 2.** Fitoplasmas del ALC en: A.- *C. nucifera* (X 49,000); B.- *Pritchardia pacifica* (X 40, 000) y C.- *Adonidia merrillii* (X 14,000) vistos por microscopía electrónica. Tomado de Parthasarathy (1974).

Como patógenos los fitoplasmas llegan a provocar serias pérdidas a nivel mundial a una amplia gama de cultivos de importancia económica como el coco, la colza, el trigo, la uva, varias hortalizas y frutas de hueso, entre otros (Sugio *et al.*, 2011). Los síntomas ocasionados varían en los distintos hospederos, observándose desde aclaramientos de nervaduras, amarillamientos de las hojas hasta la muerte de las plantas infectadas, además de reducciones de tamaño y la formación de escobas de bruja (Duduk y Bertaccini, 2011).

Para transmitirse de una planta a otra, los fitoplasmas requieren de insectos vectores, siendo los más comunes aquellos que se alimentan de savia como las chicharritas, dentro de las cuales los fitoplasmas también son capaces de sobrevivir y reproducirse. Los insectos conocidos como vectores de fitoplasmas pertenecen a las familias Cicadellidae, Cixiidae, Psyllidae, Delphacidae y Derbidae (Weintraub y Beanland, 2006). No obstante, muchos aspectos de biología básica, interacciones planta-patógeno-vector, así como los distintos mecanismos de patogenicidad de los fitoplasmas se desconocen debido a que la investigación está limitada técnicamente por la dificultad de obtener cultivos *in vitro* de estos microorganismos, al igual que de insectos infectados con fitoplasmas a voluntad. Como los fitoplasmas son parásitos intracelulares obligados, durante más de 40 años se les consideró imposibles de cultivar en medio axénico, por lo que se utilizaron métodos de detección y clasificación distintos a los acostumbrados para otros tipos de microorganismos (Seemüller *et al.*, 1998), principalmente, aquellos basados en análisis de tipo molecular. No obstante, cabe mencionar la publicación reciente de metodologías que permiten el aislamiento y cultivo axénico de algunos fitoplasmas en medios sólidos y líquidos (Contaldo *et al.*, 2012; Poghosyan, 2004), abriéndose la posibilidad de lograr lo mismo con los fitoplasmas causantes del ALC y de infectar insectos vectores a voluntad para facilitar el avance en el estudio de esta enfermedad. En la figura 3 se muestra la morfología de distintas colonias de fitoplasmas aisladas en medios sólidos.



**Figura 3.** Fotografías en placa de agar de: A).- Colonias de fitoplasmas de la variedad denominada como “Chrysanthemum yellows” (CY-TO), perteneciente al subgrupo 16SrI-B, después de 2 días de incubación; B).- Subcultivo de colonias del fitoplasma “Stolbur” (STOL), subgrupo 16SrXII-A, obtenidas después de 5 días de incubación; C).- Subcultivo de colonias del fitoplasma “Pear decline” (PD), subgrupo 16SrX-C, obtenidas después de 5 días de incubación y D).- Colonia aislada del fitoplasma CY-TO tras 10 días de incubación. Tomado de Contaldo *et al.* (2012).

La secuenciación de genes de RNAr aportó pruebas suficientes para establecer que aquellos organismos procariotas sin pared celular que colonizan el floema de plantas así como tejidos de insectos, constituyen un grupo grande y monofilético dentro de la clase Mollicutes (Sears y Kirkpatrick, 1994; Kuske y Kirkpatrick, 1992; Lim y Sears, 1989). Posteriormente, la taxonomía y filogenia de este grupo fue esclarecida mediante análisis de RFLPs (por las siglas de su nomenclatura en inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de las secuencias del gen que codifica para el RNAr 16S (Firrao *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1998).

Los fitoplasmas habían sido clasificados tradicionalmente dentro del phylum Firmicutes (Garrity *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2004; Woese *et al.*, 1980), pero con base en

recientes revisiones taxonómicas se les ha reubicado dentro del phylum Tenericutes, clase Mollicutes, junto a los géneros *Mycoplasma*, *Spiroplasma* y *Acholeplasma* (Ludwig *et al.*, 2009; Ludwig y Schleifer, 2005), mismos organismos que juntos constituyen el orden monofilético Acholeplasmatales (Lee *et al.*, 2000). Todos los fitoplasmas y tres especies de spiroplasmas (*Spiroplasma kunkelii*, *S. citri* y *S. phoeniceum*) son patógenos de plantas y dependen de insectos vectores para su transmisión (Hogenhout *et al.*, 2008; Ammar y Hogenhout, 2006). Aunque los fitoplasmas y las especies fitopatógenas de spiroplasmas comparten hábitats y nichos ecológicos similares, estas bacterias sólo están emparentadas de forma lejana dentro de las Mollicutes (Lee *et al.*, 2000). Todas las especies de fitoplasmas conocidas se ubican provisionalmente dentro del género “*Candidatus Phytoplasma*”, por la dificultad de poder realizar descripciones formales de estos microorganismos (Firrao *et al.*, 2004). El cuadro 2 muestra la clasificación actual del género basada en el análisis de las secuencias del gen que codifica para el RNAr 16S (véase Cuadro 3 para la clasificación del grupo 16SrIV).

**Cuadro 2.** Clasificación de los distintos subgrupos de fitoplasmas (excluyendo el grupo 16SrIV y otros subgrupos asociados con el ALC) basada en lo establecido por Lee *et al.* (1998). Se incluyen los códigos de acceso de GenBank para las secuencias del gen que codifica para el rRNA 16S en caso de estar disponibles, al igual que la referencia original de la clasificación de dicho organismo. Modificado de Duduk y Bertaccini (2011).

Subgrupo 16Sr	Variedad del fitoplasma	Accession Number (GenBank)	Referencia
I-A	Aster yellows witches' broom (AYWB)	NC_007716	Bai <i>et al.</i> (2006)
I-A	Tomato big bud (BB)	L33760	Lee <i>et al.</i> (1992)
I-B	Onion yellows mild strain (OY-M)	NC_005303	Oshima <i>et al.</i> (2004)
I-C	Clover phyllody (CPh)	AF222065	Lee <i>et al.</i> (2004a)
I-D	Paulownia witches' broom (PaWB)	AY265206	
I-E	Blueberry stunt (BBS3)	AY265213	
I-F	Aster yellows from apricot (A-AY)	AY265211	
I-I	Strawberry witches' broom (Strawb1)	U96614	Jomantiene <i>et al.</i> (1998a,b)
I-K	Strawberry witches' broom (strawb2)	U96616	
I-L	Aster yellows (AV2192)	AY180957	Lee <i>et al.</i> (2003)
I-M	Aster yellows (AVUT)	AY265209	Lee <i>et al.</i> (2004a)
I-N	Aster yellows (IoWB)	AY265205	
I-O	Soybean purple stem (SPS)	AF268405	Lee <i>et al.</i> (2002)
I-P	Aster yellows from <i>Populus</i>	AF503568	Šeruga <i>et al.</i> (2003)
I-Q	Cherry little leaf (ChLL)	-	Valiunas <i>et al.</i> (2005)
I-R	Strawberry phylloid fruit (StrawbPhF)	AY102275	Jomantiene <i>et al.</i> (2002a)
II-A	Peanut witches' broom (PnWB)	L33765	Gundersen-Rindal <i>et al.</i> (1994)
II-C	Faba bean phyllody (FBP)	X83432	Schneider <i>et al.</i> (1995)
II-D	Sweet potato little leaf (SPLL)	AJ289193	Gibb <i>et al.</i> (1995)
II-E	<i>Pichris echioides</i> phyllody (PEY)	Y16393	Seemüller <i>et al.</i> (1998)
II-F	Cotton phyllody (CoP)	EF186827	Khan <i>et al.</i> (2002)
III-A " <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma pruni</i> "*	Western X-disease (WX)	AF533231	Liefting y Kirkpatrick, (2003)
III-B	Clover yellow edge (CYE)	L33766	Gundersen-Rindal <i>et al.</i> (1994)
III-C	Pecan bunch (PB)	EF186807	Martini <i>et al.</i> (2007)
III-D	Goldenrod yellows (GR1)	EF186810	
III-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228	Lee <i>et al.</i> (1998)

III-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724	Lee <i>et al.</i> (1998)
III-G	Walnut witches' broom (WWB)	AF190226, AF190227	
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223	Lee <i>et al.</i> (1997a)
III-I	Virginia grapevine yellows (VGYIII)	AF060875	Davis <i>et al.</i> (1998)
III-J	Chayote witches' broom (ChWBIII)	AF147706, AF1477067	Montano <i>et al.</i> (2000)
III-K	Strawberry leafy fruit	AF274876	Jomantiene y Davis (2000) (aportación a GenBank)
III-L	Cassava frog skin disease	EU346761	Alvarez <i>et al.</i> (2009)
III-P	Dandelion virescence	AF370119, AF370120	Jomantiene y Davis (2001) (aportación a GenBank)
III-Q	Black raspberry witches' broom (BRWB7)	AF302841	Davis <i>et al.</i> (2001)
III-T	Sweet and sour cherry (ChD)	FJ231728	Valiunas <i>et al.</i> (2009)
III-U	Cirsium white leaf (CWL)	AF373106, AF373105	Mello <i>et al.</i> (2011)
IV-(A-F)	Véase cuadro 3		
V-C	Alder yellows (ALY882)	AY197642	Lee <i>et al.</i> (2004b)
V-C "Ca. P. vitis"*	Flavescence dorée (FD-C)	X76560	Daire <i>et al.</i> (1992)
V-D "Ca. P. vitis"*	Flavescence dorée (FD-D)	AJ548787	Torres <i>et al.</i> (2005); Martini <i>et al.</i> (1999)
VI-B	<i>Fragaria multicipita</i>	AF036354	Jomantiene <i>et al.</i> (1998a)
VI-C	Illinois Elm Yellows (ILEY)	AF268895 AF409069 AF409070	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
VII-B	Erigeron witches' broom	AY034608	Barros <i>et al.</i> (2002)
VIII-A "Ca. P. luffae"*	Loofah witches' broom	AF086621	Ho <i>et al.</i> (2001)
IX-A	Pigeon pea witches' broom	AF248957	Lee <i>et al.</i> (1998)
IX-C	Naxos periwinkle virescence	-	Heinrich <i>et al.</i> (2001)
XI-B	Sugarcane white leaf SCWL	X76432	Lee <i>et al.</i> (1997b)
XI-C	Leafhopper-borne BVK	X76429	Seemüller <i>et al.</i> (1994)
XII-A "Ca. P. solani"*	Stolbur STOL ( <i>Capsicum annum</i> )	X76427	
XIII-A	Mexican periwinkle virescence (MPV)	AF248960	Lee <i>et al.</i> (1998)
XIII-B	Strawberry green petal	U96616	Jomantiene <i>et al.</i> (1998b)

\*Nombres "Candidatus" propuestos en el X Congreso Internacional de la Organización Internacional de Micoplasmología (1994), llevado a cabo en Bordeaux, Francia, pero aún no formalizados de acuerdo a lo establecido por el Subcomité de Taxonomía de Mollicutes de dicha organización.

### 1.2.2 Fitoplasmas: vectores y transmisión

Los fitoplasmas se distinguen de las demás bacterias fitopatógenas debido a que requieren diversos hospederos para completar su ciclo biológico; además, son de los pocos patógenos capaces de multiplicarse en los tejidos de organismos de distintos reinos: plantas y animales (Hogenhout *et al.*, 2008; Bertaccini, 2007). También se han detectado en hongos del género *Ramaria* (Martín *et al.*, 2003).

Es importante mencionar que, en términos generales, la capacidad de un artrópodo vector para transmitir un fitopatógeno puede variar a lo largo de un espectro que va desde la completa ineficiencia hasta la alta efectividad (Purcell, 1982). En el caso de los fitoplasmas, también existe variación respecto a la especificidad y la efectividad de transmisión de sus insectos vectores.

Debido a que los fitoplasmas son transmitidos por insectos de forma persistente propagativa, sin que hasta la fecha se hayan reportado casos de otras modalidades de transmisión (Bosco y Tedeschi, 2013), la sobrevivencia de éstos en sus vectores sigue procesos complejos con distintas etapas secuenciales para que al final lleguen a ser transmitidos a otras plantas. Empezando con la adquisición mediante la alimentación del insecto de un tejido enfermo, los fitoplasmas pasan a colonizar y a multiplicarse en el estómago y el hemocele de sus hospederos, iniciando el periodo de latencia del patógeno. El estómago representa la primera barrera significativa en el proceso de adquisición, ya que si el fitoplasma no es capaz de superarla, el insecto jamás podrá inocularse con éste alimentándose de plantas infectadas (Fletcher *et al.*, 1998). Como paso final, estos patógenos penetran las glándulas salivales de su hospedero, siendo este el principal requisito para una transmisión insecto-planta (Lefol *et al.*, 1994; Boudon-Padieu *et al.*, 1989; Lherminier *et al.*, 1989).

Debido a lo anterior, la detección directa de fitoplasmas en insectos usando métodos como la microscopía electrónica o la amplificación de DNA por medio de PCR, se considera como buen indicio a la hora de identificar nuevos vectores, más no es evidencia irrefutable de su capacidad para transmitir la enfermedad (Tanne *et al.*, 2001). Es por ello que los ensayos de transmisión representan la forma más confiable de asegurar la transmisibilidad de un fitoplasma, sin embargo, para realizarlos se requiere de



una gran cantidad de insectos y variedades de plantas susceptibles a la infección, por lo que muchas veces resultan imprácticos para estudios epidemiológicos a gran escala (Tanne *et al.*, 2001). Cabe mencionar que en los últimos años se han desarrollado protocolos alternativos que permiten evaluar la capacidad de transmisión de insectos vectores de manera *in vitro* y a gran escala, en los cuales se combina el desarrollo de sistemas y dietas artificiales para la crianza de dichos insectos con las técnicas más actuales de detección de fitoplasmas, las cuales son aplicadas directamente al medio de alimentación para comprobar si el presunto vector tiene la capacidad de inocular el fitoplasma en el medio al momento de alimentarse (Pinzauti *et al.*, 2008; Bressan *et al.*, 2006; Tanne *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1998).

### **1.2.3 Amarillamiento Letal del Cocotero: agentes causales, zona de influencia e insecto vector**

El cultivo de cocotero a nivel mundial en distintas áreas se enfrenta a graves enfermedades causadas por fitoplasmas del grupo 16SrIV (Cuadro 3), informalmente referido como el grupo del ALC (Ntushelo *et al.*, 2013), especialmente por la especie “*Candidatus Phytoplasma palmae*”, agente causal del ALC, misma que afecta a por lo menos otras 36 especies de palmeras (Harrison y Oropeza, 2008). En el cuadro 4 se muestran las especies en las que se han documentado casos sintomáticos de ALC, no obstante, las especies *Thrinax radiata* y *Coccothrinax readii* también han sido confirmadas como hospederos asintomáticos del patógeno (Narvaez *et al.*, 2006). Aunque se desconoce el grado de susceptibilidad de muchas de las especies listadas en el cuadro 4, el cocotero, *Adonidia merrillii* (anteriormente conocida como *Veitchia merrillii* (Moore, 1957) pero reclasificada con base en análisis cladísticos recientes (Zona *et al.*, 2011; Zona, 1999)), *Phoenix dactylifera*, y *Pritchardia* spp. son, hasta la fecha, los casos de alta susceptibilidad mejor documentados para el ALC y síndromes relacionados (Elliot y Harrison, 2007); asimismo, *C. nucifera*, *A. merrillii*, *Ph. canariensis*, *Pritchardia pacifica*, *P. thurstonii* y *Trachycarpus fortunei* son las únicas arecáceas que han logrado infectarse con fitoplasmas del grupo del ALC en ensayos de transmisión en jaulas confinadas (Sánchez-Borges, 2014; Howard *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1983; Howard y Thomas, 1980).

**Cuadro 3.** “Ca. Phytoplasma palmae” y otras cepas filogenéticamente relacionadas (grupo 16SrIV con excepción del subgrupo C) y sus enfermedades. También se incluyen cepas de fitoplasmas pertenecientes a otros grupos y con relaciones filogenéticas lejanas causantes de enfermedades que a menudo se asocian con el ALC y se denominan como “enfermedades de tipo ALC”. Se incluyen referencias dentro de lo posible. Modificado de Sullivan y Harrison (2013).

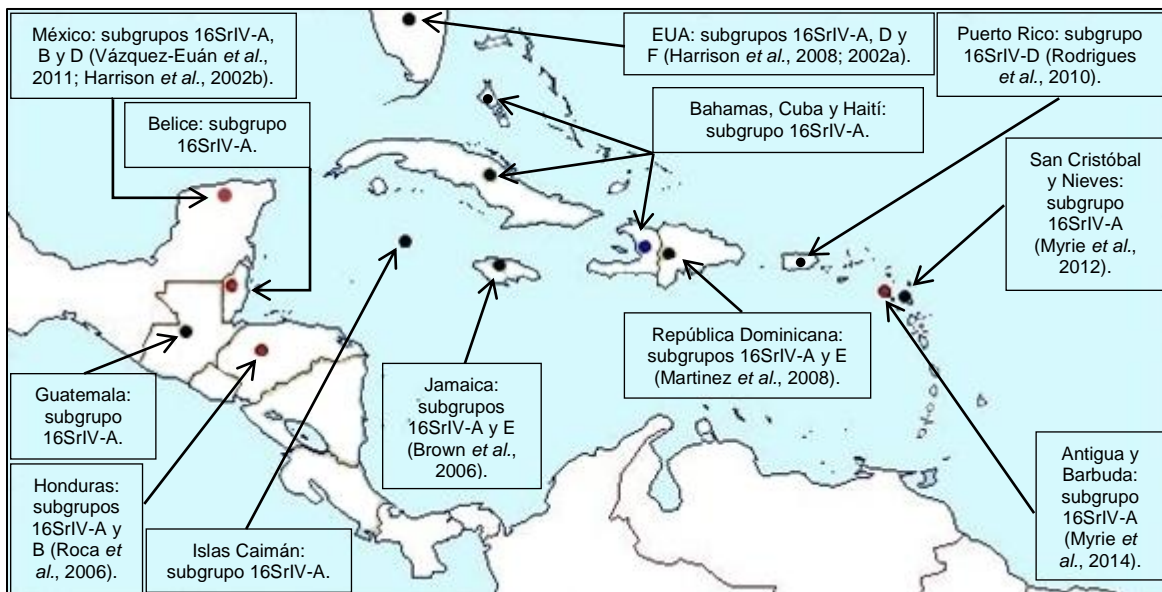
Subgrupo de fitoplasma	Nombre común de la enfermedad	Especies de palma afectadas	Otros hospederos
16SrIV-A “Ca. Phytoplasma palmae”	Palm lethal yellowing, Coconut lethal yellowing (ALC ó LY, en inglés).	Véase cuadro 4.	<i>Pandanus utilis</i> (Thomas y Donselman, 1979).
16SrIV-B	Yucatan coconut lethal decline, Coyol palm decline.	<i>Acrocomia aculeata</i> , <i>C. nucifera</i> (Roca <i>et al.</i> , 2006).	-
16SrIV-C “Ca. Phytoplasma cocostanzaniae”	Coconut lethal disease	<i>C. nucifera</i> (Firrao <i>et al.</i> , 2004)	-
16SrIV-D	<i>Carludovica palmata</i> yellows, <i>Sabal mexicana</i> & <i>Pseudophoenix sargentii</i> decline; Texas Phoenix decline, Texas Phoenix palm decline, date palm lethal decline.	<i>Caryota urens</i> , <i>Ph. canariensis</i> , <i>Ph. dactylifera</i> , <i>Ph. reclinata</i> , <i>Ph. roebelenii</i> , <i>Ph. sylvestris</i> , <i>P. pacifica</i> , <i>Pseudophoenix sargentii</i> , <i>Sabal mexicana</i> , <i>S. palmetto</i> , <i>Syagrus romanzoffiana</i> , <i>Washingtonia robusta</i> (Sánchez-Borges, 2014; Vázquez-Euán <i>et al.</i> , 2011; Rodrigues <i>et al.</i> , 2010; Harrison <i>et al.</i> , 2009; 2008).	<i>Carludovica palmata</i> (Cordova <i>et al.</i> , 2000).
16SrIV-E	Coconut lethal decline.	<i>C. nucifera</i> (Martinez <i>et al.</i> , 2008).	<i>Cleome rutidosperma</i> , <i>Cyanthillium cinereum</i> , <i>Macroptilium lathyroides</i> , <i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (Brown y McLaughlin, 2011; Brown <i>et al.</i> , 2008).
16SrIV-F	<i>Washingtonia robusta</i> decline.	<i>W. robusta</i> , <i>Ph. dactylifera</i> (Harrison <i>et al.</i> , 2008).	-
16SrXI-B	Indian yellow leaf disease	<i>Areca catechu</i> (Ramaswamy <i>et al.</i> , 2013).	-
16SrXXII-A “Ca. Phytoplasma cocosnigeriae”, “Ca. Phytoplasma palmicola”	Nigerian Awka wilt disease.	<i>C. nucifera</i> (Harrison <i>et al.</i> , 2014).	-
16SrXXII-B	Cape St. Paul wilt	<i>C. nucifera</i> (Harrison <i>et al.</i> , 2014).	-
16SrXXXII-B	Malayan yellow dwarf disease.	<i>C. nucifera</i> (Nejat <i>et al.</i> , 2009).	-
16SrXXXII-C	Malayan oil palm disease.	<i>Elaeis guineensis</i> (Nejat <i>et al.</i> , 2009).	-

**Cuadro 4.** Especies de palmeras en las que se ha detectado positiva la presencia del fitoplasma “Ca. Phytoplasma palmae” en plantas sintomáticas (Harrison y Elliott, 2008).

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>
<i>A. merrillii</i>	Kerpis, Palma de Manila, Palma de Navidad.
<i>Aiphanes lindeniana</i>	Cuaro, Cuvaro, Mararai.
<i>Allagoptera arenaria</i>	Coco de playa, palma de playa.
<i>Arenga engleri</i>	Palmera de Formosa.
<i>Borassus flabellifer</i>	Boraso, Palma de Palmira.
<i>Caryota mitis</i>	Palma cola de pescado.
<i>Ca. rumphiana</i>	Palma cola de pescado australiana, Palma de Alberto.
<i>Chelyocarpus chuco</i>	Palma hoja redonda.
<i>C. nucifera</i>	Cocotero.
<i>Copernicia alba</i>	Caranday, Ananachicari.
<i>Corypha taliera</i>	Palma tali, Palma buri.
<i>Cryosophila warscewiczii</i>	Palma de escoba.
<i>Cyphophoenix nucele</i>	Palma de Lifou.
<i>Dictyosperma album</i>	Palmera princesa, palmera huracán.
<i>Dypsis cabadae</i>	Palma cabada.
<i>Dy. decaryi</i>	Palma triangular.
<i>Gaussia attenuata</i>	Palma de lluvia, Palma de sierra, Palma flaca.
<i>Howea belmoreana</i>	Palmera centinela, Palmera rizada.
<i>H. forsteriana</i>	Kentia, Palma del Paraíso.
<i>Hyophorbe verschaffeltii</i>	Palma botella, Palma ahusada.
<i>Latania lontaroides</i>	Latania roja, Mambetari.
<i>Livistona chinensis</i>	Palmera de abanico china.
<i>Li. rotundifolia</i>	Palmera de Australia, palmera australiana.
<i>Nannorrhops ritchiana</i>	Palmera mazari.
<i>Ph. canariensis</i>	Palma de las Canarias, palma canaria.
<i>Ph. dactylifera</i>	Datilero, Támara, Palma datilera.
<i>Ph. reclinata</i>	Palma reclinada, Palma del Senegal, Datilera enana.
<i>Ph. rupicola</i>	Palma de las rocas, Datilera de las rocas.
<i>Ph. sylvestris</i>	Datilera plateada, Datilera Silvestre, Fénix de la India.
<i>P. maideniana</i>	Palma de abanico de Kona.
<i>P. pacifica</i>	Palma de Fiyi, Palma de abanico de Fiyi.
<i>P. remota</i>	Palma de abanico de Nihoa.
<i>P. thurstonii</i>	Palma de Thurston, Palma de abanico de Lau.
<i>Ravenea hildebrandtii</i>	Palma majestuosa enana.
<i>Syagrus schizophylla</i>	Coquitos de Brasil.
<i>T. fortunei</i>	Palmera excelsa, Palma de Fortune, Palmito elevado.
<i>Veitchia arecina</i>	Palma de Montgomery.

En el caso del continente americano, el ALC se ha dispersado, desde que fue detectado por primera vez en Islas Caimán y Jamaica (McCoy *et al.*, 1983), a lo largo de la región tropical y subtropical, afectando a los países e islas mostrados en la figura 4,

donde también puede apreciarse, en conjunto, el avance de los distintos fitoplasmas del grupo del ALC por Centroamérica, actualmente detenido en Honduras (Roca *et al.*, 2006) y los países del mar Caribe, con los últimos reportes en la isla de Antigua y en San Cristóbal y Nieves (Myrie *et al.*, 2014; Myrie *et al.*, 2012; Myrie *et al.*, 2006). Cabe mencionar la creciente amenaza al cultivo de cocotero en Sudamérica debido a la inminente llegada del ALC y síndromes relacionados; especialmente en Brasil, que es el mayor productor de cocotero del continente y cuarto a nivel mundial (véase Cuadro 1).



**Figura 4.** Área general de influencia del ALC y síndromes relacionados en el continente así como países e islas en los que se han detectado fitoplasmas del grupo 16SrIV. Sólo se incluyen algunas de las referencias más recientes. Modificado de CABI (2014).

En México, se han detectado distintas poblaciones de fitoplasmas del grupo del ALC en *C. nucifera*: en la región del Caribe mexicano se identificó el subgrupo 16SrIV-A, exclusivamente, mientras que en las costas del golfo de México se detectaron los subgrupos 16SrIV-A y B; en cambio, en las costas del océano Pacífico se detectó el subgrupo 16SrIV-D (Harrison *et al.*, 2002c). No obstante, cabe mencionar que el subgrupo 16SrIV-B sólo se ha detectado en algunos cocoteros enfermos del estado de Tabasco, siendo en comparación mucho más abundantes los subgrupos 16SrIV-A y D en el territorio nacional (Vázquez-Euán *et al.*, 2011).

En la península de Yucatán, el ALC asociado con el fitoplasma del subgrupo 16SrIV-A ha estado presente por más de 35 años (Oropeza y Zizumbo, 1997) y ha matado a la mayoría de los cocoteros de plantaciones del ecotipo Alto del Atlántico, al igual que afectado a otras palmas propias de la región como *T. radiata* y *C. readii* (Nic-Matos, 2007; Narvaez *et al.*, 2006). En cambio, las enfermedades asociadas con fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-D, también presentes en la península, han sido detectadas en poblaciones nativas de la especie *Sabal mexicana* y en la planta endémica *Pseudophoenix sargentii* (Vázquez-Euán *et al.*, 2011), no así en *C. nucifera*.

Ambos fitoplasmas son transmitidos por el insecto del orden Hemiptera *Haplaxius crudus* Van Duzee (Sánchez-Borges, 2014; Vázquez-Euán, 2010), conocido comúnmente como “chicharrita pálida” (Fig. 5). No obstante, la posibilidad de que otras especies de insectos también puedan transmitirlos no se descarta del todo; por ejemplo, especies del género *Cedusa* (Derbidae) en Jamaica (Brown *et al.*, 2006) y las especies *Ormenaria rufifascia* (Flatidae) y *Omolicna joi* (Derbidae) en Florida, en las que se han detectado fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-D en repetidas ocasiones (Powell *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Individuo adulto de la especie *H. crudus*. Fotografía de Jean-Luc Dzido.

*H. crudus* es un insecto miembro de la familia Cixiidae ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano. Específicamente, el nicho de la especie abarca desde las regiones subtropicales del este de Estados Unidos (el sur de Florida y Texas), pasando por México y Centroamérica, hasta el norte de Sudamérica, además de estar presente en Cuba, Islas Caimán, Jamaica e Isla Trinidad (Howard, 1983; Kramer, 1979). Su enorme importancia ecológica y económica recae en el papel que juega en la transmisión del ALC.

Este insecto fue descrito por primera vez en 1907 como *Myndus crudus* por Van Duzee a partir de adultos colectados en Hope Bay y en Troja, Jamaica (Van Duzee, 1907). Asimismo, otros investigadores describieron la especie de manera independiente a partir de especímenes colectados en otras regiones; Fennah la llamó *Paramyndus cocois* tras sus colectas en Isla Trinidad (Fennah, 1945) y Caldwell hizo lo propio usando *H. pallidus* para individuos colectados en Miami, en 1934 (Caldwell, 1946); sin embargo, en este último estudio, las especies del género *Myndus* (Stål) del continente americano fueron reclasificadas dentro del género *Haplaxius* (Fowler), por lo que el nombre sistemáticamente correcto para la especie, tomando en cuenta los lineamientos del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, es *Haplaxius crudus* Van Duzee. Su información taxonómica detallada se muestra en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Clasificación taxonómica completa de la especie *H. crudus*.

Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Superclase:	Hexapoda
Clase:	Insecta
Orden:	Hemiptera
Suborden:	Auchenorrhyncha
Familia:	Cixiidae
Género:	<i>Haplaxius</i>
Especie:	<i>Haplaxius crudus</i> Van Duzee, 1907

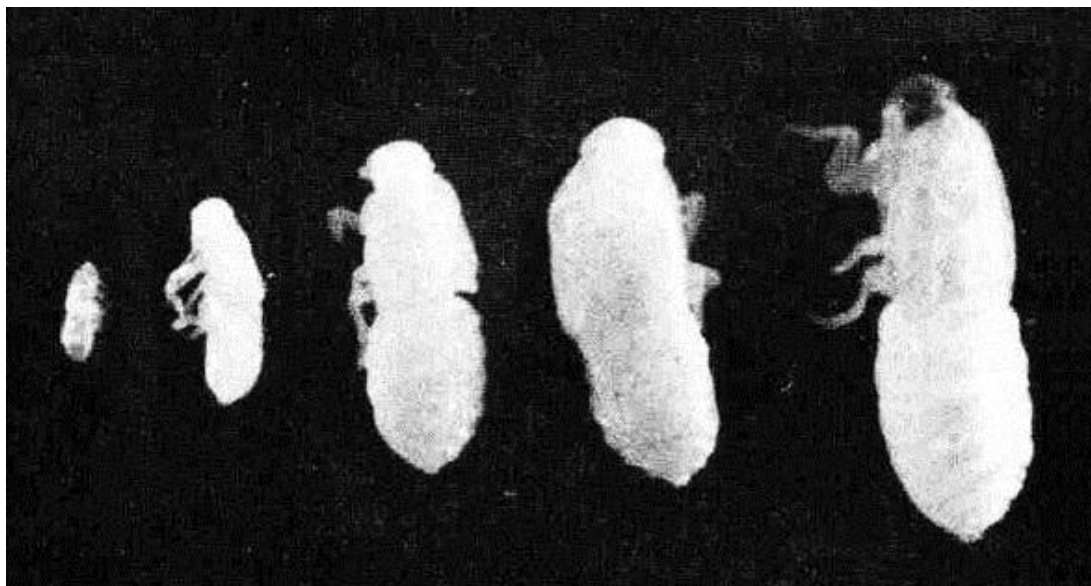
Las características físicas de la especie son las siguientes (Fig. 6): los adultos miden entre 4.2 y 5.2 mm de largo, aproximadamente; las hembras tienden a ser un poco más largas que los machos. Su color es café ligero, las hembras tienden a ser un poco más oscuras y de apariencia más robusta que los machos; éstos tienen el abdomen un

poco más verde. Las alas de los individuos de ambos sexos son translúcidas con venas café ligero (Kramer, 1979).



**Figura 6.** Insectos adultos de *H. crudus* de ambos sexos: hembra (izquierda) y macho (derecha), vistos a través de un microscopio estereoscópico. Nótase el mayor tamaño de las hembras y la diferencia física de ambos genitales. Fotografía del autor.

El ciclo de vida de *H. crudus* transcurre de la siguiente manera: los huevecillos son depositados ya sea individualmente o en hileras de cinco en las vainas de las hojas inferiores de algunas hierbas de la familia Poaceae. Después de la eclosión, las ninfas (Fig. 7) migran al suelo y se alimentan de las raíces de sus plantas hospederas, pasando por un total de 5 instares ninfales (Zenner de Polanía y López, 1977). El tiempo promedio transcurrido entre la eclosión y la última muda de las ninfas ha sido reportado como 61.3 días a 24 °C y 41.5 días a 30 °C (Tsai y Kirsch, 1978). Los adultos permanecen unas cuantas horas en las hierbas tras la última muda, acto seguido vuelan a las palmas más cercanas para completar su ciclo de vida. La cópula se lleva a cabo en las palmas y luego las hembras vuelan nuevamente a los pastos para ovipositar (Zenner de Polanía y López, 1977).



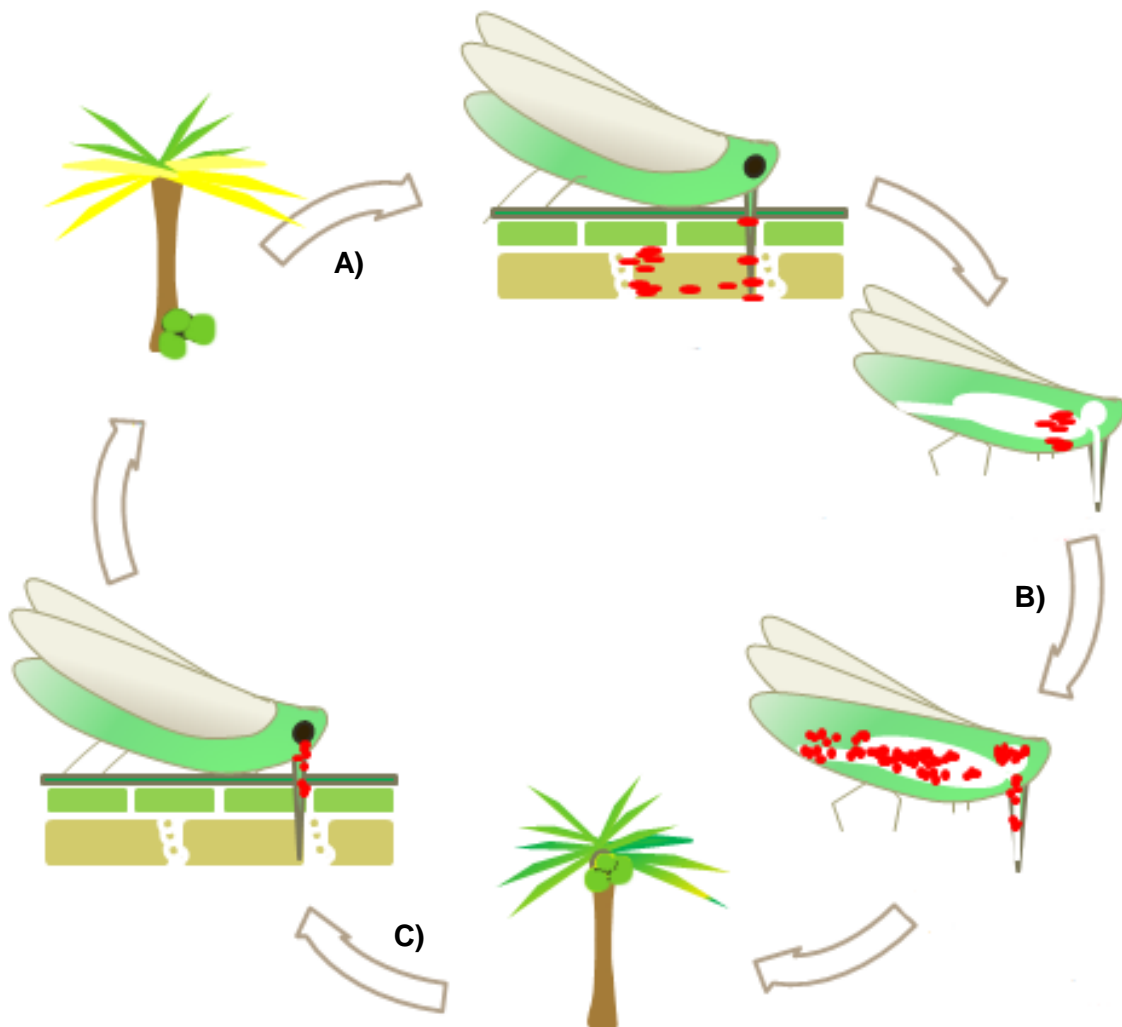
**Figura 7.** Los cinco ínstares ninfales de *H. crudus*. En el último puede observarse un notable aumento en tamaño corporal así como en el diámetro de la mancha ocular. Tamaño promedio de los ínstares: I.- 0.99 mm; II.- 1.63 mm; III.- 2. 22 mm; IV.- 3.08 mm; V.- 3.41 mm. Modificado de Zenner de Polanía y López (1977).

Los adultos llegan a vivir hasta 50 días sobre las palmas (Tsai y Kirsch, 1978). La proporción de sexos se ha reportado como 1♀:1♂ (Tsai y Kirsch, 1978) y 1.7♀:1♂ (Reinert, 1980); no obstante, también se ha reportado que las hembras son más longevas que los machos (Zenner de Polanía y López, 1977), por lo que esto podría contribuir a la distorsión en dicha proporción.

#### **1.2.4 Amarillamiento Letal del Cocotero: síntomas, ciclo de infección y manejo de la enfermedad**

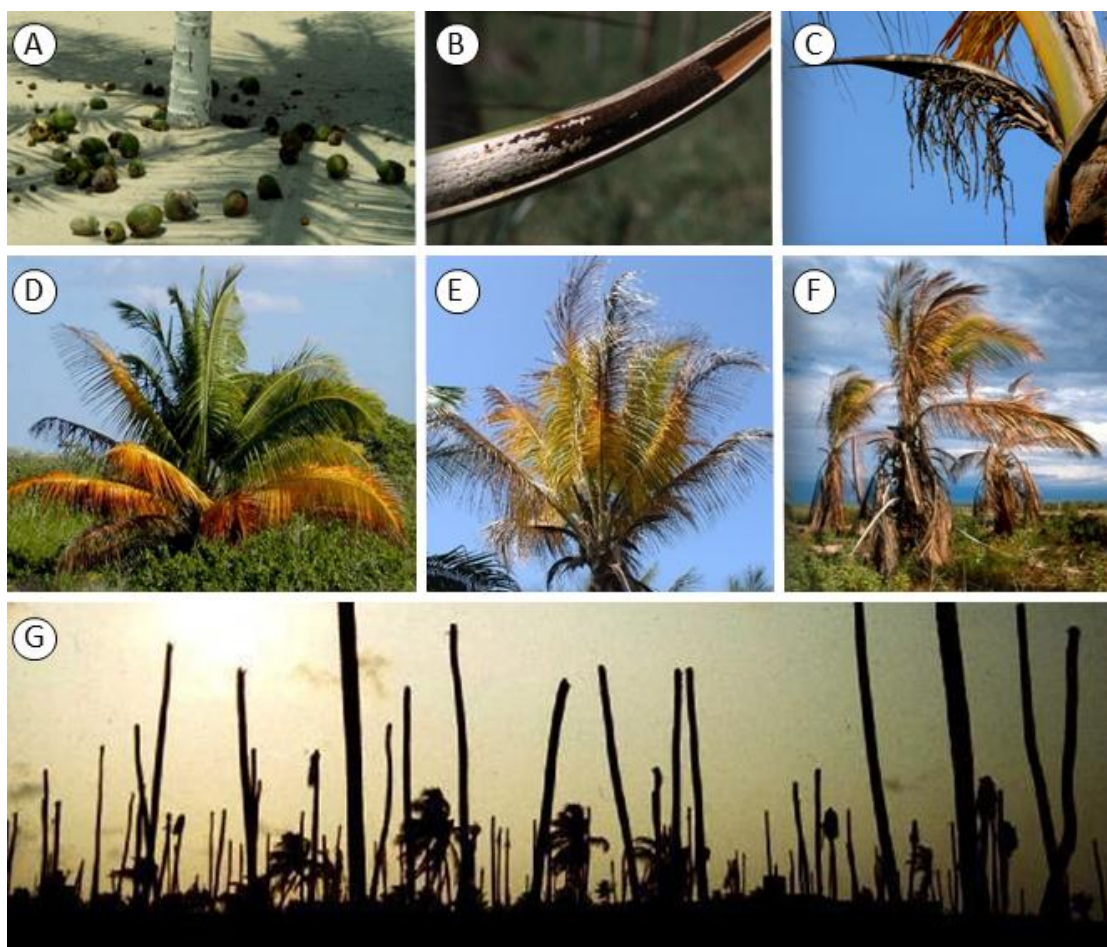
El fitoplasma del ALC es un parásito obligado que se localiza en el floema de sus plantas hospederas. Como *H. crudus* perfora y succiona los tejidos del sistema vascular de la planta de la cual se alimenta, el insecto adquiere el fitoplasma y lo mueve de palma en palma a medida que avanza en su ciclo de alimentación (Harrison y Elliott, 2008). En la figura 8 puede apreciarse, de manera general, el ciclo de infección de un fitoplasma en su palma hospedera y su insecto vector. Cabe mencionar que las distintas etapas presentadas en la figura son de naturaleza especulativa para el caso del ALC, ya que hasta la fecha no han podido realizarse estudios en *H. crudus* que demuestren su validez ni su duración aproximada.





**Figura 8.** Representación esquemática del ciclo de infección de un fitoplasma en general, pudiendo tratarse de un fenómeno similar para el caso del fitoplasma causante del ALC: **A) Adquisición del fitoplasma.**- Partiendo de una planta enferma (*C. nucifera* en la figura), un individuo vector se posa sobre la hoja, la perfora e introduce su aparato bucal hasta llegar a los tubos cribosos para succionar su alimento, no obstante, fitoplasmas que se encuentran presentes dentro de las células del floema (representados como puntos rojos en la figura) son también absorbidos por el insecto, abriéndose la posibilidad de que algunos puedan llegar con vida a su estómago. **B) Período de latencia.**- En esta etapa los fitoplasmas pasan del estómago a la hemolinfa del insecto, se multiplican e invaden prácticamente todos los tejidos de su hospedero, hasta que finalmente colonizan las glándulas salivales. **C) Etapa infectiva o inoculativa.**- El insecto adquiere la capacidad de “liberar” los fitoplasmas al alimentarse del floema de las plantas que forman parte de su dieta, llegando, en algunos casos, a transmitir el patógeno a plantas sanas, reiniciando nuevamente el ciclo. Modificado de un diseño realizado por Sharon Velázquez.

Los cocoteros infectados por el fitoplasma del ALC presentan síntomas primarios como: caída de la mayoría de los frutos, necrosamiento de las inflorescencias y muerte de las flores masculinas. Los síntomas secundarios son los que dan el nombre a la enfermedad, ya que las hojas más viejas de la planta empiezan a amarillarse, seguidas de las hojas medias hasta el eventual amarillamiento de las hojas más jóvenes de la parte superior de la copa. Las hojas pasan después a tener un color café, se secan y mueren, aunque permanecen colgando por algunos días hasta que finalmente caen, quedando únicamente el tronco “desnudo” de la palma (Harrison y Oropeza, 2008; McCoy, 1982). Esta serie de síntomas se presenta en la figura 9. Adicionalmente, se ha detectado la presencia de fitoplasmas del ALC en embriones de cocotero obtenidos a partir de palmas enfermas (Cordova *et al.*, 2003), lo que sugiere la posibilidad de que, al menos en algunos casos, esta enfermedad pueda transmitirse por vía de semilla.



**Figura 9.** Sintomatología seriada del ALC en cocoteros enfermos: A.- Caída prematura de frutos; B.- Necrosis de inflorescencias; C.- Muerte de flores y ausencia de nuevos frutos; D.- Amarillamiento de las hojas viejas; E.- Amarillamiento de las hojas nuevas; F.- Secamiento y pudrición de las hojas afectadas; G.- Troncos “desnudos” de palmas muertas por el ALC. Diseñado por Carlos Oropeza Salín.

Para mitigar los efectos nocivos a causa del ALC en plantaciones de cocotero se debe destruir e incinerar las palmas enfermas, eliminar posibles hospederos silvestres, evitar trasladar material vegetal de una región contaminada a otra, sustituir la plantación original susceptible por una con mayor grado de resistencia, etcétera (Harrison y Elliot, 2008). También existe un plan de contingencia sólido que puede usarse como guía ante la aparición de un nuevo brote de ALC para el manejo de dicha enfermedad (Oropeza *et al.*, 2010). Asimismo, otro de los tratamientos aplicados para aminorar su impacto consiste en reducir las poblaciones de *H. crudus* por medio del uso de insecticidas (Arellano y Oropeza, 1995; Howard *et al.*, 1983). Aunque en la actualidad no existen tratamientos terapéuticos que puedan curar por completo la enfermedad, las plantas afectadas pueden

mantenerse vivas por largos periodos de tiempo si son inyectadas directamente en el tronco cada tres o cuatro meses con oxitetraciclina (McCoy, 1982).

### **1.2.5 Historia del ALC en América: Incidencia en México y Yucatán**

Actualmente se considera que el ALC fue descubierto en las Islas Caimán en 1834 (McCoy *et al.*, 1983), para después aparecer, luego de 50 años, en la costa occidental de Jamaica, donde fue propiamente descrito como una nueva enfermedad del cocotero (Fawcett, 1891). El ALC luego se propagó a otras islas en la región del Caribe incluyendo Haití, Bahamas, República Dominicana y Cuba (McCoy *et al.*, 1983; Carter, 1964; Bruner y Boucle, 1943). En los Estados Unidos apareció en 1955, detectándose por primera vez en Key West, Florida (Corbett, 1959).

En México, el ALC se observó inicialmente en las costas caribeñas de Quintana Roo, en 1977 (McCoy *et al.*, 1982), y en la costa norte de Yucatán, en 1985 (Cardeña *et al.*, 1991). Durante este periodo, la enfermedad continuó propagándose a lo largo del golfo de México, invadiendo las costas de Campeche y Tabasco (Oropeza y Zizumbo, 1997). El ALC también ha sido detectado en los estados de Veracruz, Oaxaca y Guerrero, no obstante, como ya se mencionó anteriormente, se sabe que los fitoplasmas que afectan a los cocoteros de la región del Pacífico son genéticamente distintos a los presentes en las regiones del golfo de México y el mar Caribe (Harrison *et al.*, 2002c). Igualmente, las poblaciones de cocotero que existen naturalmente en el país son fenotípicamente distintas unas de otras, así como también lo son sus grados de susceptibilidad ante el ALC (Zizumbo *et al.*, 1999). En el territorio nacional pueden distinguirse cinco grupos fenotípicamente distintos o ecotipos de *C. nucifera* (Zizumbo, 1997). En el golfo de México, estados de Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Tabasco y Veracruz, el ecotipo predominante es el Alto del Atlántico, mientras que en la región del Pacífico pueden distinguirse tres clases distintas de Altos del Pacífico; adicionalmente, el ecotipo Enano Malayo, de reciente introducción, puede observarse en ambas costas, principalmente en los estados de Guerrero, Colima, Tabasco y Yucatán (Zizumbo, 1997).

La dispersión del ALC en el territorio mexicano trajo como consecuencia la devastación de las zonas productoras de coco y la transformación drástica del paisaje costero (véase la figura 9-G), debido a la alta susceptibilidad de los ecotipos

predominantes en las zonas afectadas (Oropeza y Zizumbo, 1997). En la península de Yucatán, esto significó la inicial destrucción de la mayoría de las palmas locales del ecotipo Alto del Atlántico, conocido por su alto grado de susceptibilidad ante el ALC (Zizumbo *et al.*, 1999). Este periodo de alta incidencia de la enfermedad en la región fue sucedido por el eventual reemplazo del material susceptible, en algunas de las áreas afectadas, con individuos del ecotipo Enano Malayo, con un mayor grado de resistencia ante la enfermedad, permaneciendo también poblaciones de Alto del Atlántico a lo largo del estado, así como cultivares híbridos (Zizumbo *et al.*, 1999). Sin embargo, reportes recientes de grandes pérdidas de material resistente (del ecotipo Enano Malayo y del cultivar híbrido “MayPan” (Enano Malayo x Alto de Panamá)) en algunos sitios en Jamaica y Florida (Lebrun *et al.*, 2008; Broschat *et al.*, 2002) han puesto en duda si dicha resistencia se mantiene a largo plazo, aunque la evidencia más reciente apunta a la contaminación genética sufrida por estas variedades como una de las causas detonantes de esta supuesta pérdida de resistencia (Baudouin *et al.*, 2008).

Asimismo, en Yucatán se han registrado una serie de brotes de ALC y síndromes relacionados en especies de palmas distintas a *C. nucifera*, mismos que se mencionan a continuación: a) en *T. radiata* y *C. readii*, tanto en la ciudad de Mérida como en la localidad de Chicxulub Puerto (Nic-Matos, 2007; Narvaez *et al.*, 2006); b) en *S. mexicana* y *P. sargentii*, en Mérida, Chicxulub Puerto y ciudad de Ticul (Vázquez-Euán *et al.*, 2011); c) en *A. merrillii*, en varios puntos de Mérida (Mota-Narvaez, 2015) y d) en *Roystonea regia* y *Acrocomia aculeata*, muestreadas en distintos sitios del estado (Narvaez *et al.*, 2015).

Finalmente, la presencia de insectos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres de *H. crudus* también ha sido reportada para el estado (Vázquez-Euán, 2010), sin embargo, resultados preliminares obtenidos en la presente investigación (véase Capítulo II) mostraron una aparente reducción en la proporción de individuos infectados en las mismas áreas en comparación con fechas anteriores, fenómeno que sugiere a la vez un cambio en los porcentajes de incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de sus respectivos ambientes. Igualmente, aún se desconoce el estado actual de la proporción de insectos infectados con estos fitoplasmas

en las poblaciones de *H. crudus* de la mayoría de las zonas impactadas por el ALC en el estado así como su evolución con el paso del tiempo.

Debido a lo anterior, es importante conocer el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en la entidad de Yucatán, tanto en *C. nucifera* como en otras palmas importantes de la zona como *T. radiata*, *C. readii*, *S. mexicana*, *P. sargentii*, *A. merrillii* y *P. pacifica*, así como en las poblaciones silvestres de *H. crudus* de las zonas afectadas por estas enfermedades, con el fin de poder estimar su persistencia en la región y con ello valorar el grado de riesgo que los distintos fitoplasmas del grupo del ALC representan para el cultivo de cocotero a nivel local.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

El cocotero es un cultivo de importancia económica, agronómica y ornamental, ya que es una de las plantas más representativas de las costas de México y de todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo. La planta es apreciada por su versatilidad, ya que puede emplearse para el aprovechamiento de madera, copra, fibra, agua y pulpa, entre otros. Al igual que muchos otros cultivos de interés económico, el cocotero presenta problemas fitosanitarios que disminuyen su producción y rendimiento, entre los que destacan el ALC y sus síndromes relacionados, causados por fitoplasmas del grupo 16SrIV, mismos que representan una amenaza severa para el cultivo de cocotero a nivel mundial; en Florida (EUA) y en Yucatán (México), se ha obtenido evidencia que indica que estos fitoplasmas son transmitidas por el hemíptero *H. crudus*, sin que hasta la fecha se hayan confirmado vectores alternos.

El ALC ha estado presente en la península de Yucatán desde 1977 y hasta la fecha continúa afectando a los cocotereros y a muchas otras palmas locales, sin embargo, durante este periodo su incidencia ha variado, desde los altos niveles de mortandad registrados a finales de la década de los setenta y a lo largo de los ochenta hasta los bajos niveles observados en la década pasada durante la realización de un programa de monitoreo. Asimismo, el ALC ha presentado variación a nivel de especies de palmas afectadas, al igual que en el número de individuos infectados con el patógeno en las poblaciones naturales del vector. Debido a lo anterior y con el propósito de realizar un estudio sobre el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en

México, en el presente trabajo se llevó a cabo una evaluación limitada solamente al estado de Yucatán, en la cual se investigó la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en palmas de cocotero y otras especies así como en poblaciones naturales del insecto *H. crudus*. Igualmente se realizó un bioensayo utilizando a la especie *P. pacifica* como indicadora de la presencia de insectos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en un sitio en el que se observaron altos niveles de incidencia de ALC y síndromes relacionados en esta especie en fechas anteriores.

## 1.4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la incidencia del Amarillamiento Letal del Cocotero en el estado de Yucatán.

### 1.4.1 Objetivos particulares

Determinar el porcentaje de *H. crudus* infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres.

Determinar si ocurre infección por fitoplasmas del grupo del ALC en individuos sanos de la especie susceptible al ALC *P. pacífica* a partir de su exposición a la población silvestre de insectos presente en el ambiente de los jardines del CICY.

Determinar el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en palmas de diferentes especies presentes en Yucatán.



## 1.5 REFERENCIAS

- Alvarez, E., Mejía, J.F., Llano, G.A., Loke, J.B., Calari, A., Duduk, B., Bertaccini, A. (2009). Characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. *Plant Dis.* 93(11), 1139-1145.
- Ammar, E.D., Hogenhout, S.A. (2006). Mollicutes associated with arthropods and plants. En: *Insect Symbiosis Vol. 2: Contemporary Topics in Entomology* (K. Bourtzis, T.A. Miller, Eds.). CRC Press. Boca Raton, USA. 304 pp.
- Arellano, J., Oropeza, C. (1995). Lethal yellowing. En: *Lethal Yellowing Research and Practical Aspects* (C. Oropeza, F.W. Howard, G.R. Ashburner, Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Nederland. 250 pp.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Hogenhout, S.A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.* 188(10), 3682–3696.
- Barros, T.S.L., Davis, R.E., Resende, R.O., Dally, E.L. (2002). Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Dis.* 86(10), 1142-1148.
- Baudouin, L., Lebrun, P., Berger, A., Myrie, W., Been, B., Dollet, M. (2008). The Panama Tall and the Maypan hybrid coconut in Jamaica: did genetic contamination cause a loss of resistance to lethal yellowing? *Euphytica.* 161(3), 353-360.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Front. Biosci.* 12, 673-689.
- Bosco, D., Tedeschi, R. (2013). Insect vector transmission assays. En: *Phytoplasma: Methods and Protocols* (M. Dickinson, J. Hodgetts, Eds.). *Methods in Molecular Biology*, vol. 938. Humana Press. Clifton, USA. 421 pp.

- Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Caudwell, A. (1989). ELISA and dotblot detection of Flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Curr. Microbiol.* 19, 357-364.
- Bressan, A., Clair, D., Sémétey, O., Boudon-Padieu, E. (2006). Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of Flavescence dorée phytoplasma. *Phytopathology.* 96(7), 790-796.
- Broschat, T.K., Harrison, N.A., Donselman, H. (2002). Losses to lethal yellowing cast doubt on coconut cultivar resistance. *Palms.* 46(4), 185-189.
- Brown, S.E., Been, B.O., McLaughlin, W.A. (2006). Detection and variability of the lethal yellowing group 16SrIV phytoplasmas in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Ann. Appl. Biol.* 149, 53-62.
- Brown, S.E., Been, B.O., McLaughlin, W.A. (2008). First report of lethal yellowing group (16SrIV) of phytoplasmas in *Vernonia cinerea* in Jamaica. *Plant Dis.* 92(7), 1132.
- Brown, S.E., McLaughlin, W.A. (2011). Identification of lethal yellowing group (16SrIV) of phytoplasmas in the weeds *Stachytarpheta jamaicensis*, *Macroptilium lathyroides*, and *Cleome rutidosperma* in Jamaica. *Phytopathogenic Mollicutes.* 1(1), 27-34.
- Bruner, S.C., Boucle, L. (1943). La enfermedad conocida por “pudrición del cogollo del cocotero en Cuba”. *Rev. Agric. (La Habana).* 26, 132-141.
- Caldwell, J.S. (1946). Notes on *Haplaxius* (Fowler) with description of new species. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 48(8), 203-206.
- Cardeña, R., Villanueva, M.A., Santamaría J.M., Oropeza, C. (1991). Presence in Yucatan of mycoplasma-like organisms in *Cocos nucifera* palms showing lethal yellowing disease symptoms. *Can. J. Plant Pathol.* 13, 135-138.
- Carter, W. (1964). Present status of research on lethal yellowing disease of coconut palm in Jamaica. *FAO Plant Protect. Bull.* 12, 67-69.

- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2014. Datasheets. Candidatus *Phytoplasma palmae* (lethal yellowing of coconut). [Online] Disponible en: <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=38647&loadmodule=datasheet&page=481&site=144> [Consulta: 21/01/2014].
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H.M., Windsor, G.D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathol. Mediterr.* 51(3), 607-617.
- Corbett, M.K. (1959). Diseases of the coconut palm. I. Lethal yellowing or unknown disease. *Principles.* 3, 6-13.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2003). *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.* 4(2), 99-108.
- Cordova, I., Oropeza, C., Almeyda, H., Harrison, N.A. (2000). First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern México. *Plant Dis.* 84(7), 807.
- Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., Caudwell, A. (1992). Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Ann. Appl. Biol.* 121(1), 95-103.
- Davis, R.E., Dally, E.L., Converse, R.H. (2001). Molecular identification of a phytoplasma associated with witches' broom disease of black raspberry in Oregon and its classification in group 16SrIII, new subgroup Q. *Plant Dis.* 85(10), 1121.
- Davis, R.E., Jomantiene, R., Dally, E.L., Wolf, T.K. (1998). Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. *Vitis.* 37(3), 131-137.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967). *Mycoplasma*- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33(4), 259-266.

- Duduk, B., Bertaccini, A. (2011). Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene is it enough? *Phytopatogenic Mollicutes*. 1(1), 3-13.
- Elliot, M.L., Harrison, N.A. (2007). Palm diseases caused by phytoplasmas: Lethal yellowing and Texas phoenix palm decline. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. [Online] Disponible en: <https://www.freshfromflorida.com/content/download/9785/134978/Palm%20Diseases%20Caused%20by%20Phytoplasmas.pdf> [Consulta: 06/11/2014].
- Fawcett, W. (1891). Report on the coconut disease at Montego Bay. *Bull. Bot. Dep. Jamaica*. 23, 2.
- Fennah, R.G. (1945). Fulgoroidea, or lanternflies, of Trinidad and adjacent parts of South America. *Proc. US. Natl.Mus.* 95, 411-520.
- Firrao, G., Andersen, M., Bertaccini, A., Boudon, E., Bove, J.M., Daire, X., Davis, R.E., Fletcher, J., Garnier, M., Gibb, K.S., Gundersen-Rindal, D.E., Harrison, N.A., Hiruki, C., Kirkpatrick, B.C., Jones, P., Kuske, C.R., Lee, I.M., Liefting, L., Marcone, C., Namba, S., Schneider, B., Sears, B.B., Seemuller, E., Smart, C.D., Streten, C., Wang, K. (2004). “*Candidatus* Phytoplasma,” a taxon for the wall-less, nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(4), 1243–1255.
- Fletcher, J., Wayadande, A.C., Melcher, U., Ye, F. (1998). The phytopathogenic mollicute–insect vector interface: a closer look. *Phytopathology*. 88, 1351-1358.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013a. Statistics Division. [Online] Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/> [Consulta: 18/05/2015].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013b. Regional Office for Asia and the Pacific. Asia-Pacific’s “aging population” of coconut trees threatens economies and livelihoods. [Online] Disponible en: <http://www.fao.org/archive/from-the-field/detail/en/c/204136/> [Consulta: 14/01/2016].
- Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzéby, J., Tindall, B.J. (2007). Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007. Part 8-

- The *Bacteria*: Phylum “*Firmicutes*”: Class *Mollicutes*. [Online] Disponible en: <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/185/217.pdf> [Consulta: 05/12/2013].
- Gibb, K.S., Padovan, A.C., Mogen, B.D. (1995). Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology*. 85(2), 169-174.
- Gundersen-Rindal, D.E., Lee, I.M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176(17), 5244-5254.
- Harrison, N.A., Davis, R.E., Oropeza, C., Helmick, E. E., Narvaez, M., Eden-Green, S., Dollet, M., Dickinson, M. (2014). “*Candidatus* Phytoplasma palmicola”, associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1890-1899.
- Harrison, N.A., Elliott, M.L. (2008). Lethal yellowing (LY) of palm. [Online] Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pp146> [Consulta: 02/05/2013].
- Harrison, N.A., Helmick, E.E., Elliott, M.L. (2008). Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Ann. Appl. Biol.* 153, 85-94.
- Harrison, N.A., Helmick, E.E., Elliott, M.L. (2009). First report of a phytoplasma-associated lethal decline of *Sabal palmetto* in Florida, USA. *Plant Pathol.* 58(4), 792.
- Harrison, N.A., Myrie, W., Jones, P., Carpio, M.L., Castillo, M., Doyle, M.M., Oropeza, C. (2002b). 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann. App. Biol.* 114(2), 183-193.
- Harrison, N.A., Narvaez, M., Almeyda, H., Cordova, I., Carpio, M.L., Oropeza, C. (2002c). First report of grupo 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *New Dis. Rep.* 51, 808.

- Harrison, N.A., Oropeza, C. (1997). Recent studies on detection of lethal yellowing disease phytoplasmas in the Americas. En: Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina Ghana, November 1995 (S.J. Eden-Green, F. Ofori, Eds.). Natural Resources Institute. Chatham, UK. 308 pp.
- Harrison, N.A., Oropeza, C. (2008). Coconut lethal yellowing. En: Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas (N.A. Harrison, G.P. Rao, C. Marcone, Eds.). Studium Press LLC. Houston, USA. 422pp.
- Harrison, N.A., Womack, M., Carpio, M.L. (2002a). Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis.* 86(6), 676-681.
- Heinrich, M., Botti, S., Caprara, L., Arthofer, W., Strommer, S., Hanzer, V., Katinger, H., Laimer da Câmara Machado, M., Bertaccini, A. (2001). Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19(2), 169-179.
- Ho, K., Tsai, C., Chung, T. (2001). Organization of ribosomal RNA genes from a loofah witches' broom phytoplasma. *DNA Cell Biol.* 20(2), 115-122.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar el, D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N., Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9(4), 403-423.
- Howard, F.W. (1983). World distribution and possible geographic origin of lethal yellowing and its vectors. *FAO Plant Protect. Bull.* 31, 101-113.
- Howard, F.W. (1987). *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae), a vector of lethal yellowing of palms. En: Proceedings of 2nd International Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of Economic Importance: Brigham Young University, Provo, Utah, USA, 28th July-1st August 1986 (M.R. Wilson, L.R. Nault, Eds.). CAB International Institute of Entomology. London, UK. 386 pp.

- Howard, F.W., Norris, R.C., Thomas, D.L. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera, Cixiidae). *Trop. Agr.* (Trinidad). 60(3), 168-171.
- Howard, F.W., Thomas, D.L. (1980). Transmission of palm lethal decline to *Veitchia merrillii* by a planthopper *Myndus crudus*. *J. Econ. Entomol.* 73(5), 715-717.
- Howard, F.W., Williams, D.S., Norris, R.C. (1984). Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int. J. Entomol.* 26(4), 331-338.
- Jacobs, K.A., Lee, I.M., Griffiths, H.M., Miller, F.D.Jr., Bottner, K.D. (2003). A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Dis.* 87(3), 241-246.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J., Dally, E.L. (1998a). Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(1), 269-277.
- Jomantiene, R., Maas, J.L., Takeda, F., Davis, R.E. (2002a). Molecular identification and classification of strawberry phylloid fruit phytoplasma in group 16SrI, new subgroup. *Plant Dis.* 86(8), 920.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Dally, E.L., Maas, J.L. (1998b). The distinctive morphology of *Fragaria multicapita* is due to phytoplasma. *HortScience.* 33(6), 1069-1072.
- Khan, A.J., Botti, S., Al-Subhi, A.M., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A. (2002). Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches' broom in Oman. *Phytopathology.* 92(10), 1038-1047.
- Köhler, H.A. (1898). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. III. (Ergänzungs-) Band. Gera-Untermhaus. Druck und Verlag von Fr. Eugen Köhler. Berlin, Deutschland. 240 pp.

- Kollar, A., Seemüller, E. (1989). Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J. Phytopathol.* 127(3), 177–186.
- Kramer, J.P. (1979). Taxonomic study of the planthopper genus *Myndus* in the Americas (Homoptera:Fulgoroidea:Cixiidae). *T. Am. Entomol. Soc.* 105, 301-389.
- Kuske, C.R., Kirkpatrick, B.C. (1992). Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(2), 226–233.
- Lebrun, P., Baudouin, L., Myrie, W., Berger, A., Dollet, M. (2008). Recent lethal yellowing outbreak: why is the Malayan Yellow Dwarf coconut no longer resistant in Jamaica? *Tree Genet. Genomes.* 4, 125-131.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., Schaff, D.A. (1992). A genotype-base system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology.* 82(9), 977-986.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 221–255.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D., Davis, R.E., Bottner, K.D., Marcone, C. Seemüller, E. (2004a). 'Candidate Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.* 54(4), 1037-1048.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(4), 1153-1169.
- Lee, I.M., Klopmeier, M., Bartoszyk, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Chou, T., Thomson, K.L., Eisenreich, R. (1997a). Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nat. Biotechnol.* 15(2), 178-182.
- Lee, I.M., Martini, M., Bottner, K.D., Dane, R.A., Black, M.C., Troxclair, N. (2003). Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an



- aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*. 93(11), 1368-1377.
- Lee, I.M., Martini, M., Marcone, C., Zhu, S.F. (2004b). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(2), 337-347.
- Lee, I.M., Pastore, M., Vibio, M., Danielli, A., Attathom, S., Davis, R.E., Bertaccini, A. (1997b). Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poa annua*) white leaf disease in southern Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 103(3), 251-254.
- Lee, M.E., Grau, C.R., Lukaesko, L.A., Lee I.M. (2002). Identification of aster yellows phytoplasmas in soybean in Wisconsin based on RFLP analysis of PCR-amplified products (16S rDNAs). *Can. J. Plant Pathol.* 24, 125–130.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Louis, C., Caudwell, A. (1994). Propagation of Flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J. Invert. Pathol.* 63(3),285-293.
- Lherminier, J., Terwisscha van Scheltinga, T., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A. (1989). Rapid immuno-fluorescence detection of the grapevine Flavescence dorée in the salivary glands of the leafhopper *Euscelidius variegatus* Kbm. *Phytopath. Z.* 125, 353-360.
- Liefting, L.W., Kirkpatrick, B.C. (2003). Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 221(2), 203–211.
- Lim, P.O., Sears, B.B. (1989). 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171(11), 5901–5906.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. (2005). Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. En: *Microbial Phylogeny and Evolution*:

Concepts and Controversies (J. Sapp, Ed.). Oxford University Press. New York, USA. 352 pp.

Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 3: The Firmicutes (P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, W.B. Whitman, Eds.). 2<sup>nd</sup> Edition. Springer-Verlag New York Incorporated [Originalmente Williams & Wilkins, 1984]. New York, USA. 1476 pp.

Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*. 89(9), 805–810.

Martín, M.P., Daniëls, P.P., Torres, E., Tellería, M.T. (2003). Detection and identification of phytoplasma DNA in symptomatic mushrooms of the genus *Ramaria* (O. Gomphales). *Anales Jard. Bot. Madrid*. 60(1), 11-18.

Martinez, R.T., Narvaez, M., Fabre, S., Harrison, N.A., Oropeza, C., Dollet, M., Hichez, E. (2008). Coconut lethal yellowing on the southern coast of the Dominican Republic is associated with a new 16SrIV group phytoplasma. *Plant Pathol*. 57(2), 366-366.

Martini, M., Lee, I.M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J., Osler, R. (2007). Ribosomal protein gene-based filogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 57(9), 2037-2051.

Martini, M., Murari, E., Mori, N., Bertaccini, A. (1999). Identification and epidemic distribution of two Flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Dis*. 83(10), 925-930.

McCoy, R.E. (1982). Use of tetracycline antibiotics to control yellows diseases. *Plant Dis*. 66(7), 539-542.

McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt, L., Collins, M.E. (1983). Lethal yellowing of palms. En: *Bulletin-University of Florida, Agricultural Experiment Stations* (McCoy, R.E.,

Ed.). Agricultural Experiment Stations, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, USA.

McCoy, R.E., Norris, R.C., Vieyra, G., Delgado, S. (1982). Mexico: Lethal yellowing disease of coconut palms. *FAO Plant Protect. Bull.* 30, 79-80.

Mello, A.P.D.O.A., Eckstein, B., Flores, D., Kreycki, P.F., Bedendo, I.P. (2011). Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(6), 1454-1461.

Montano, H.G., Davis, R.E., Dally, E.L., Pimentel, J.P., Brioso, P.S.T. (2000). Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Dis.* 84(4), 429-436.

Moore, H.E.Jr. (1957). Veitchia. *Gentes Herb.* 8, 483-536.

Mota-Narvaez, L. (2015). *Detección e identificación de fitoplasmas en palmas kerpis (Adonidia merrillii L.) con síntomas asociados al Amarillamiento Letal del Cocotero en Mérida, Yucatán*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México.

Myrie, W.A., Douglas, L., Harrison, N.A., McLaughlin, W., James, M. (2012). First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16SrIV, a phytoplasma on St. Kitts in the Lesser Antilles. *New Dis. Rep.* 26, 25.

Myrie, W.A., Harrison, N.A., Douglas, L., Helmick, E., Gore-Francis, J., Oropeza, C., McLaughlin, W.A. (2014). First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16SrIV-A phytoplasmas in Antigua, West Indies. *New Dis. Rep.* 29, 12.

Myrie, W.A., Paulraj, L., Dollet, M., Wray, D., Been, B.O., McLaughlin, W. (2006). First report of lethal yellowing disease of coconut palms caused by phytoplasmas on Nevis Island. *Plant Dis.* 90, 834.

Narvaez, M., Cordova, I., Orellana, R., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2006). First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Plant Pathol.* 55, 292.

- Narvaez, M., Cordova, I., Reyes, C., Puch-Hau, C., Mota-Narvaez, L., Collí-Rodríguez, A., Caamal, G., Harrison, N.A., Sáenz, L., Oropeza, C. (2015). Occurrence of 16SrIV subgroup A phytoplasmas in *Roystonea regia* and *Acrocomia mexicana* palms with Lethal Yellowing-like syndromes in Yucatán, Mexico. *J. Phytopathol.* (En prensa). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12464/pdf> [Consulta: 15/01/2016].
- Neimark, H., Kirkpatrick, B.C. (1993). Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.* 7(1), 21–28.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S.N.A., Vadamalai, G., Dickinson, M. (2009). Phytoplasmas associated with disease of coconut in Malaysia: phylogenetic groups and host plant species. *Plant Pathol.* 58, 1152–1160.
- Nic-Matos, J.G. (2007). *Estudio sobre la sobrevivencia de Thrinax radiata al amarillamiento letal (AL)*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. México.
- Ntushelo, K., Harrison, N.A., Elliott, M.L. (2013). Palm phytoplasmas in the Caribbean Basin. *Palms.* 57(2), 93-100.
- Oropeza, C., Zizumbo, D. (1997). The history of lethal yellowing in Mexico. En: Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina Ghana, November 1995 (S.J. Eden-Green, F. Ofori, Eds.). Natural Resources Institute. Chatham, UK. 308 pp.
- Oropeza, S., Narvaez, M., Echegoyén-Ramos, P.E., Rodas, R. (2010). Plan de Contingencia Ante un Brote de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en un País de la Región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria- OIRSA. San Salvador, El Salvador. 149pp.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested

from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* 36(1), 27-29.

Parthasarathy, M.V. (1974). Mycoplasma-like organisms associated with Lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology.* 64, 667-674.

Pinzauti, F., Trivellone, V., Bagnoli, B. (2008). Ability of *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae) to inoculate stolbur phytoplasma to artificial feeding medium. *Ann. Appl. Biol.* 153, 299–305.

Poghosyan, A. (2004). Aislamiento y estudio ultraestructural de tres cepas de fitoplasmas causantes de enfermedades tipo “stolbur” en Solanaceae. *Fitopatol. Colomb.* 28(1), 21-30.

Powell, C.M., Hail, D., Potocnjak, J., Hanson, J.D., Halbert, S.H., Bextine, B.R. (2015). Bacterial community composition of three candidate insect vectors of palm phytoplasma (Texas Phoenix Palm Decline and Lethal Yellowing). *Curr. Microbiol.* 70, 240-245.

Purcell, A.H. (1982). Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20, 397-417.

Ramaswamy, M., Nair, S., Soumya, V.P., Thomas, G.V. (2013). Phylogenetic analysis identifies a ‘Candidatus Phytoplasma oryzae’-related strain associated with yellow leaf disease of areca palm (*Areca catechu* L.) in India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1376–1382.

Reinert, J.A. (1980). Phenology and density of *Haplaxius crudus* (Homoptera:Cixiidae) on three southern turfgrasses. *Environ. Entomol.* 9, 13-15.

Roca, M.M., Castillo, M.G., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2006). First report of a 16SrIV group phytoplasma associated with declining coyol palms in Honduras. *Plant Dis.* 90(4), 526.

- Rodrigues, J.V., Vitoreli, A.M., Ramirez, A.L. (2010). Association of a phytoplasma with dieback in palms in Puerto Rico confirmed by nested-PCR assays. *Phytopathology*. 100(6), S110.
- Sánchez-Borges, R. (2014). *Evaluación de Haplaxius crudus como posible transmisor de fitoplasmas del grupo 16SrIV-A a la palma Pritchardia pacifica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. En: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* Vol. I (S. Razin, J.G. Tully, Eds.). Academic Press. San Diego, USA. 483 pp.
- Sears, B.B., Kirkpatrick, B.C. (1994). Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News*. 60, 307–312.
- Sears, B.B., Lim, P.O., Holland, N., Kirkpatrick, B.C., Klomparens, K.L. (1989). Isolation and characterization of DNA from a mycoplasma-like organism. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 2, 175–180.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80(1), 3-26.
- Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B., Stackebrandt, E. (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3), 440-446.
- Šeruga, M., Škorić, D., Botti, S., Paltrinieri, S., Juretić, N., Bertaccini, A. (2003). Molecular characterization of a phytoplasma from the Aster Yellow (16SrI) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. *Forest Pathol.* 33(2), 113-125.
- Sugio, A., MacLean, A.M., Kingdom, H.N., Grieve, V.M., Manimekalai, R., Hogenhout, S.A. (2011). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 175–195.

- Sullivan, M., Harrison, N.A. (2013). CPHST Pest Datasheet for 'Candidatus Phytoplasma palmae' and related strains. USDA-APHIS-PPQ-CPHST. [Online] Disponible en: [http://caps.ceris.purdue.edu/webfm\\_send/1910](http://caps.ceris.purdue.edu/webfm_send/1910) [Consulta: 22/01/14].
- Tanne, E., Boudon-Padieu, E., Clair, D., Davidovich, M., Melamed, S., Klein, M. (2001). Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Phytopathology*. 91(8), 741-746.
- Thomas, D.L., Donselman, H.M. (1979). Mycoplasma-like bodies and phloem degeneration associated with declining Pandanus in Florida. *Plant Dis. Rep.* 63(11), 911-916.
- Torres, E., Botti, S., Rahola, J., Martín, M.P., Bertaccini, A. (2005). Grapevine yellows diseases in Spain: eight years survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasmas involved. *Anales Jard. Bot. Madrid*. 62(2), 127-133.
- Tsai, J.H., Kirsch, O.H. (1978). Bionomics of *Haplaxius crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Environ. Entomol.* 7, 305, 308.
- Valiunas, D., Jomantiene, R., Ivanauskas, A., Abraitis, R., Staniene, G., Zhao, Y., Davis, R.E. (2009). First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania. *Plant Dis.* 93(5), 550.
- Valiunas, D., Staniulis, J., Davis, R.E. (2006). 'Candidatus Phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(1), 27-281.
- Van Duzee, E.P. (1907). Notes on Jamaican Hemiptera: A report on a collection of Hemiptera made on the Island of Jamaica in the spring of 1906. *Bull. Buffalo Soc. Natur. Sci.* 8, 3-79.
- Vázquez-Euán, R. (2010). *Detección y caracterización de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

- Vázquez-Euán, R., Harrison, N.A., Narvaez, M., Oropeza, C. (2011). Occurrence of a 16SrIV group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *Plant Dis.* 95, 256-262.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.M., Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16s rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(8), 1855-1867.
- Weintraub, P.G., Beanland, L.A. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Ann. Rev. Entomol.* 51, 91-111.
- Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77(1), 494–498.
- Wolf, M., Müller, T., Dandekar, T., Pollack, J.D. (2004). Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(3), 871–875.
- Zenner de Polanía, I., López, A. (1977). Apuntes sobre la biología y hábitos del *Haplaxius pallidus*, transmisor de la “marchitez sorpresiva” en palma africana. *Rev. Colomb. Entomol.* 3, 49-62.
- Zhang, J., Miller, S., Hoy, C., Zhou, X., Nault, L. (1998). A rapid method for detection and differentiation of aster-yellows phytoplasma-infected and inoculative leafhoppers (Abstr.). *Phytopathology.* 88(Suppl.), S84.
- Zizumbo, D. (1997). *El cocotero en México: Historia, variación morfofisiológica y diversidad genética*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Zizumbo, D., Fernandez, M., Torres, N., Cardeña, R. (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. En: Current Advances in Coconut Biotechnology (C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña, J.M. Santamaría, Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Nederland. 440 pp.



Zona, S. (1999). New perspectives on generic limits and relationships in the Ptychospermatinae (Palmae: Arecoideae). *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 83, 255-263.

Zona, S., Francisco-Ortega, J., Jestrow, B., Baker, W.J., Lewis, C.E. (2011). Molecular phylogenetics of the palm subtribe Ptychospermatinae (Arecaceae). *Am. J. Bot.* 98(10), 1716-1726.



## CAPÍTULO II

### EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FITOPLASMAS DEL GRUPO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO EN POBLACIONES SILVESTRES DEL INSECTO *Haplaxius crudus* Van Duzee

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

##### 2.1.1 Fitoplasmas y sus vectores

Los fitoplasmas son procariontes parásitos endocelulares obligados que colonizan principalmente dos tipos de ambientes: los elementos cribosos del floema de plantas hospederas y el estómago, la hemolinfa y las glándulas salivales, entre otros órganos, de sus insectos vectores (Firrao *et al.*, 2004). Hasta la fecha, la gran mayoría de las especies de fitoplasmas conocidas son imposibles de cultivar *in vitro* (Contaldo *et al.*, 2012).

En el caso de los insectos, solamente aquellos que se alimentan del floema de las plantas pueden, potencialmente, adquirir y transmitir a estos patógenos (Firrao *et al.*, 2004). En la actualidad, todos los vectores de fitoplasmas reportados pertenecen a cinco familias de insectos: Cicadellidae, Cixiidae, Psyllidae, Delphacidae y Derbidae (Weintraub y Beanland, 2006).

Dependiendo de la especie de fitoplasma, ésta puede tener alta o baja especificidad hacia sus insectos vectores, por lo que algunos fitoplasmas pueden ser transmitidos por varios insectos mientras que otros sólo pueden ser transmitidos por pocas o por una sola especie (Suzuki *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 1998). Cuando los fitoplasmas son adquiridos por algún vector al alimentarse de una planta infectada (periodo de adquisición), pasan por un extenso proceso de etapas secuenciales dentro del insecto (periodo de latencia) antes de que puedan ser transmitidos a otras plantas (periodo de inoculación o etapa infectiva) y así completar su ciclo de vida (Firrao *et al.*, 2007). Después de la adquisición, los fitoplasmas colonizan el estómago y el hemocele de sus hospederos, para posteriormente llegar a la hemolinfa. Como paso final, penetran en las glándulas salivales del vector, siendo este el paso necesario para una

transmisión insecto-planta (Lefol *et al.*, 1994; Boudon-Padieu *et al.*, 1989; Lherminier *et al.*, 1989).

Los efectos que ejercen las infecciones de fitoplasmas en sus insectos vectores son, en términos generales, desconocidos, ya que estas asociaciones no han sido estudiadas a fondo en muchas de las especies involucradas, no obstante, existen ejemplos en los que se ha documentado disminución en la capacidad reproductiva de algunos insectos, mientras que también hay ejemplos donde se ha demostrado que la infección representa una asociación benéfica, incrementándose la fertilidad y longevidad de la especie implicada (Christensen *et al.*, 2005; Beanland *et al.*, 2000).

### **2.1.2 *Haplaxius crudus*: características generales**

*Haplaxius crudus* Van Duzee (véase Fig. 5, Capítulo I), conocido comúnmente como “chicharrita pálida”, es un insecto miembro de la familia Cixiidae que se alimenta del follaje de muchas especies de palmeras, incluyendo al cocotero (*Cocos nucifera* L.), y que a su vez es considerado como el principal vector del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), la enfermedad más severa que afecta a *C. nucifera* a nivel mundial (Howard, 1987). Este insecto fue descrito por primera vez como *Myndus crudus* en 1907, a partir de ejemplares colectados en Jamaica (Van Duzee, 1907), sin embargo, otra descripción realizada con ejemplares de Florida en 1946 (Caldwell, 1946), donde las especies del género *Myndus* (Stål) del continente americano fueron reclasificadas dentro del género *Haplaxius* (Fowler), es considerada actualmente como la primera que proporcionó un nombre sistemáticamente válido para la especie (Ceotto *et al.*, 2008).

Este insecto es endémico del continente americano y se encuentra ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales (Kramer, 1979). Específicamente, su presencia ha sido confirmada en Estados Unidos, Cuba, Islas Caimán, Jamaica, Trinidad, Venezuela, Colombia, México, Belice, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Guatemala (Howard, 1983).

El ciclo de vida de la especie puede resumirse de la siguiente manera: individuos adultos depositan los huevos individualmente o en hileras de cinco en las vainas de las hojas inferiores de algunas hierbas. Después de eclosionar, las ninfas, que son similares

a los adultos pero sin presencia de alas funcionales, pasan al suelo para alimentarse de las raíces de sus plantas hospederas, atravesando por cinco estadios ninfales (véase Fig. 7, Capítulo I) sucesivos (Zenner de Polanía y López, 1977). El tiempo promedio transcurrido entre la eclosión y la última muda de las ninfas se reporta como 61.3 días a 24 °C y 41.5 días a 30 °C (Tsai y Kirsch, 1978). Después de la transformación, los adultos alados vuelan al follaje de las palmas más cercanas para alimentarse y reproducirse. Este insecto se alimenta insertando los estiletes de su aparato bucal picador-chupador en el tejido foliar para después succionar la savia encontrada en el floema. Después de la cópula (Fig. 10), las hembras vuelan de regreso a las hierbas para ovipositar y completar así su ciclo de vida (Zenner de Polanía y López, 1977).



**Figura 10.** Individuos macho (izquierda) y hembra (derecha) de *H. crudus* copulando sobre una hoja de palma de la especie *Pritchardia pacifica*. Fotografía de Eder Ramos.

El tiempo de vida de los adultos sobre las palmas puede llegar hasta los 50 días (Tsai y Kirsch, 1978). La proporción de sexos en la especie no ha sido del todo esclarecida: se ha reportado como 1♀:1♂ (Tsai y Kirsch, 1978) y 1.7♀:1♂ (Reinert, 1980), sin embargo, las hembras son más longevas que los machos (Zenner de Polanía y López, 1977), por lo que esto puede contribuir a una posible desproporción de sexos.

### 2.1.3 *H. crudus* como vector del ALC

Como ya se mencionó anteriormente, *H. crudus* es una especie fitófaga especialista en plantas de la familia Arecaceae, incluida la especie *C. nucifera* (Howard, 1987). Para que la alimentación del insecto pueda llevarse a cabo, los estiletes de su aparato chupador-picador son lo suficientemente largos como para alcanzar los vasos floemáticos de las plantas incluidas en su dieta, de donde extraen la savia que consumen para nutrirse (Waters, 1976). Sin embargo, durante este proceso suele haber intercambio de fluidos hacia ambos lados, savia de parte de la planta y saliva de parte del insecto, situación que constituye un ambiente ideal para la transmisión natural de los fitoplasmas causantes del ALC y síndromes relacionados (véase Cuadro 3, Capítulo I).

La evidencia que implica a *H. crudus* como vector del ALC en el continente americano está basada en una serie de estudios llevados a cabo en las áreas afectadas por dicha enfermedad que incluyen: a) estudios comparativos donde *H. crudus* resultó la única especie en común con poblaciones de *C. nucifera* afectadas con ALC (Howard, 1980a; Howard y Mead, 1980); b) un estudio de densidad poblacional donde se encontró un mayor número de insectos de esta especie (hasta 40 veces mayor) en zonas afectadas por la enfermedad, comparado con el encontrado en zonas sin influencia de ALC (Howard, 1980b); c) la disminución de la tasa de dispersión aparente de la enfermedad tras el uso de insecticidas y el consecuente decremento de la densidad poblacional del vector en zonas afectadas (Howard y McCoy, 1980); d) experimentos de transmisión *in vivo* realizados en Florida (Howard *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1983; Howard y Thomas, 1980) y México (Sánchez-Borges, 2014) y e) la detección directa por PCR de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en el insecto (Vázquez-Euán, 2010; Harrison y Oropeza, 1997).

Los estudios de detección directa de fitoplasmas en *H. crudus* mediante PCR son importantes para comprender a fondo el mecanismo de dispersión del ALC y sus síndromes relacionados, ya que hasta la fecha no se cuenta con información respecto al lapso de tiempo necesario para que el vector pueda transmitir los fitoplasmas del grupo del ALC a otras palmas a partir de su adquisición inicial (véase Fig. 8, Capítulo I); también se desconoce cuáles son los órganos del insecto que son colonizados tras la infección y si éstos retienen de por vida la capacidad de inocular dichos patógenos al alimentarse.

Otros aspectos poco explorados sobre la epidemiología de este grupo de enfermedades son la eficiencia de adquisición del patógeno por parte de *H. crudus* al alimentarse de savia infectada y la eficiencia de transmisión del mismo al alimentarse de una palma sana, con respecto a las distintas especies de palmeras afectadas, no obstante, un paso importante para llegar a elucidar el comportamiento de estos fenómenos es conocer la cantidad de insectos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC (porcentaje de infección) en muestras de poblaciones silvestres que se encuentren en sitios afectados por dichas enfermedades (Bosco y Tedeschi, 2013).

#### 2.1.4 Porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en *H. crudus*

El porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en insectos *H. crudus* de un sitio particular es un indicador que puede usarse, en conjunto con otros factores, para estimar el grado de riesgo que estas enfermedades representan para las palmas de dicha zona. Este porcentaje no se ha determinado con frecuencia en estudios previos, sin embargo, fue reportado como de 7.94% para insectos colectados en Florida (Harrison y Oropeza, 1997) mientras que con poblaciones naturales de distintos sitios del estado de Yucatán se obtuvo un 1.27% (Vázquez-Euán, 2010). Adicionalmente, los porcentajes obtenidos durante el periodo de 2006-2009 para insectos colectados en dos sitios distintos del estado: los jardines del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en la ciudad de Mérida y la localidad de Chicxulub Puerto, se muestran en el cuadro 6 (Narvaez *et al.*, datos no publicados).

**Cuadro 6.** Porcentajes de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres del insecto *H. crudus* de dos sitios distintos del estado: jardines del CICY y localidad de Chicxulub Puerto. Los individuos fueron analizados por medio de PCR anidada.

Año	Jardines del CICY			Chicxulub Puerto		
	Capturados	No. de positivos	Porcentaje de positivos	Capturados	No. de positivos	Porcentaje de positivos
2006	179	34	18.99%	-	-	-
2007	299	8	2.67%	620	6	0.96%
2008	310	0	0.00%	542	9	1.66%
2009	-	-	-	747	8	1.07%
<b>Total</b>	<b>788</b>	<b>42</b>	<b>5.32%</b>	<b>1909</b>	<b>23</b>	<b>1.20%</b>

Como puede observarse en el cuadro, aún cuando se trata de un mismo sitio, el porcentaje de infección puede variar significativamente de una temporada a otra, hecho que podría asociarse con cambios en la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de dicho sitio. No obstante, en el caso de los jardines del CICY, a pesar de que la población de *H. crudus* de dicho sitio registró un porcentaje de infección de 0.00% para el año 2008, existe evidencia que indica de manera directa e indirecta la presencia de individuos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en fechas posteriores: a) los ensayos de transmisión realizados con insectos *H. crudus* colectados en los jardines del CICY, en los cuales se logró transmitir de manera exitosa fitoplasmas del grupo del ALC a palmas de la especie *Pritchardia pacifica* (Sánchez-Borges, 2014) y plántulas de *C. nucifera* propagadas *in vitro* (datos no publicados); b) la mortandad observada en los jardines del CICY de ejemplares de *P. pacifica* (véase apartado 3.1.3, Capítulo III) y la presencia de palmas enfermas de otras especies en dicho sitio (Vázquez-Euán *et al.*, 2011).

En vista de esta evidencia aparentemente contradictoria, en este capítulo se realizaron una serie de colectas de insectos *H. crudus* seguidas de análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC por medio de PCR en tiempo real empleando una sonda TaqMan, con el fin de obtener el actual porcentaje de infección en poblaciones silvestres de dicho insecto provenientes de dos sitios en el estado de Yucatán: jardines del CICY y localidad de Chicxulub Puerto, en los cuales previamente se han reportado individuos positivos. Los resultados obtenidos se emplearán, junto con los presentados en los capítulos posteriores del presente trabajo, para determinar el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en la entidad de Yucatán.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Sitios de colecta para la captura de insectos *H. crudus***

Los insectos colectados en el presente trabajo fueron capturados en dos sitios ecológicamente distintos donde la presencia tanto de la especie como de palmeras infectadas con fitoplasmas del grupo del ALC ha sido previamente documentada (Vázquez-Euán, 2010; Nic-Matos, 2007; Narvaez *et al.*, 2006): los jardines del CICY, en la ciudad de Mérida, Yucatán (Fig. 11), y un segundo sitio ubicado en la localidad de



Chicxulub Puerto, municipio de Progreso, Yucatán (21° 17' 38" N, 89° 36' 30" O) (Fig. 12). En ambos sitios, los individuos de *H. crudus* fueron tomados directamente de hojas de palmeras propias de la zona; algunas de ellas, en la localidad de Chicxulub Puerto, con síntomas sugestivos de ALC.



**Figura 11.** Sitio de colecta jardines del CICY, para la captura de insectos *H. crudus*. Fotografía del autor.

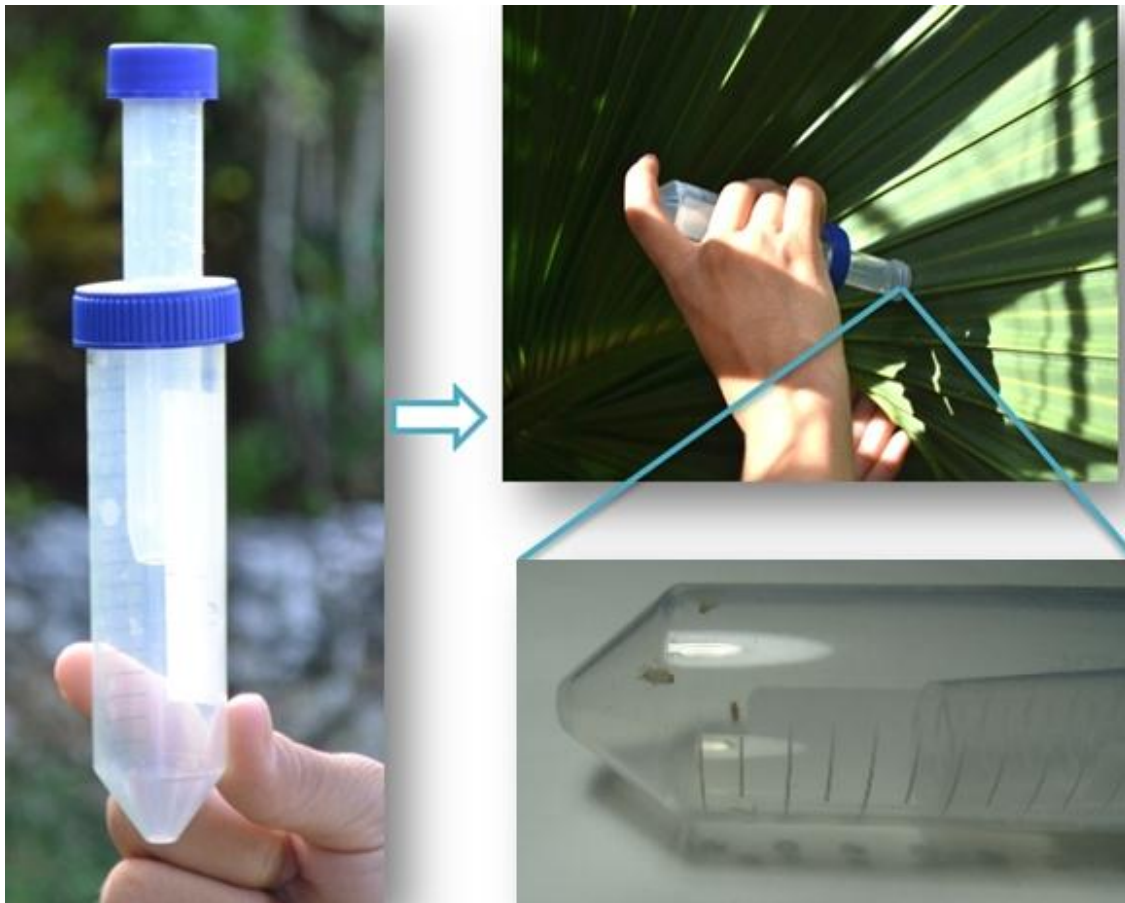


**Figura 12.** Sitio de colecta localidad de Chicxulub Puerto, para la captura de insectos *H. crudus*. La presencia de palmas de la especie *Thrinax radiata* con síntomas sugestivos de ALC fue detectada en este sitio. Fotografía del autor.

### **2.2.2 Método para la captura de insectos *H. crudus***

La colecta de los insectos se llevó a cabo utilizando un diseño propio desarrollado en el Laboratorio de Cocotero del CICY, el cual consiste en un tubo falcon de 15 mL con

una apertura en la parte de abajo, adaptado de manera especial encima de otro tubo de 50 mL. El uso de este sistema ayuda a capturar insectos minimizando el estrés y los daños mecánicos que pudieran ocurrir cuando se les está manejando. El proceso de captura fue realizado de la siguiente manera: primero se coloca la apertura de arriba del tubo menor encima del insecto deseado, cubriéndolo completamente; después, se espera a que el insecto salte y vaya hasta el fondo del tubo grande, lo cual reduce las posibilidades del insecto de escapar cuando el tubo menor tenga que destaparse nuevamente para atrapar a otro individuo. La figura 13 muestra el proceso y el diseño especial de captura utilizado en este trabajo. Posterior a la captura, los insectos fueron sometidos al protocolo de extracción de ácidos nucleicos descrito en el apartado siguiente; en caso de una extracción no inmediata, se conservaron en etanol al 70%.



**Figura 13.** Diseño de colecta y método de captura de insectos *H. crudus* en las plantas donde se alimentan. Una vez capturados, los insectos pasan al mayor de los tubos falcon (50 mL), reduciendo con esto las posibilidades de escape al destaparse el tubo menor (15 mL) en caso de capturar más individuos. Modificado de Osorno (2013).

### 2.2.3 Extracción de ácidos nucleicos de insectos *H. crudus*

Se extrajo el DNA total de los insectos capturados utilizando el método de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) previamente reportado por Harrison *et al.* (1996), con algunas modificaciones. El procedimiento realizado para cada insecto fue el siguiente:

1. Se depositó el insecto en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se agregaron 300  $\mu$ L de buffer de extracción CTAB (CTAB al 2%/Tris-HCl 100 mM, pH 8.0/EDTA 20 mM, pH 8.0/NaCl 1.4 M/PVP al 1%) adicionado con monotioglicerol al 0.1%. Se maceró el insecto.
2. El extracto se incubó por una hora a 65 °C y posteriormente se dejó enfriar.
3. Se agregaron 300  $\mu$ L de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente; después se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos.
4. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf.
5. Se agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 0.6 volúmenes de isopropanol (30  $\mu$ L y 180  $\mu$ L, respectivamente), mezclando por inversión y se incubó a -20 °C por 60 minutos.
6. Después de incubar se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos.
7. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente evitando tirar la pastilla formada.
8. Se agregaron 100  $\mu$ L de etanol al 70% (para el lavado de la pastilla) y se centrifugó nuevamente a 7500 rpm por 5 minutos.
9. Se decantó el etanol evitando tirar la pastilla y se dejó secar a temperatura ambiente.
10. Por último, se disolvió la pastilla en 30  $\mu$ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0/EDTA 1 mM, pH 8.0) o agua ultra pura, aproximadamente.

Para verificar la integridad del DNA total obtenido de los insectos, las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM/ácido acético 20 mM/EDTA 1mM) teñidos con 1 µL de solución de bromuro de etidio (10µL/mL). En cada pozo se agregaron 2 µL de suspensión de DNA mezclado con una cantidad mínima de buffer de carga. Las bandas fueron observadas utilizando un *software* de fotodocumentación de geles (Gel Doc™ XR+ System, Bio-Rad) y las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital, para su posterior análisis.

### 2.2.4 Análisis de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en insectos *H. crudus* por reacciones de PCR en tiempo real

Una vez comprobada la extracción para todos los insectos, se procedió a realizar la detección por PCR en tiempo real de los individuos colectados siguiendo los lineamientos establecidos por Cordova *et al.* (2014), utilizando un termociclador Rotor-Gene® Q (Qiagen), MangoTaq™ DNA-polimerasa (Bioline) y la mezcla de reacción presentada en el cuadro 7, siendo el volumen final para todos los casos de 20 µL.

**Cuadro 7.** Mezcla de reacción empleada en los procesos de detección por PCR en tiempo real.

Ingrediente	Concentración	Cantidad
DNA templado	Dilución 1:10	2 µL
Mezcla de dNTP's (Invitrogen)	10 mM	0.5 µL
Sonda a utilizar*	20X	0.5 µL
Buffer de reacción (Bioline)	5X	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50 mM	1 µL
Taq DNA-polimerasa	5 u/µL	0.3 µL
H <sub>2</sub> O ultra pura (Usb)	-	10.7 µL

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador para el proceso de detección:

**1ª etapa.** 1 ciclo previo a la reacción a 50 °C por 2 minutos.

**2ª etapa.** 1 ciclo de pre-desnaturalización a 95 °C por 10 minutos.

**3ª etapa.** 40 ciclos de amplificación, cada uno con un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, seguido de un segundo paso a 61 °C por 60 segundos, después del cual se hace la cuantificación “en tiempo real” del producto de la reacción.

**\*Sonda utilizada.** Denominada como 503LY16S, específica para la detección de fitoplasmas del grupo del ALC, subgrupos 16SrIV-A, D y E (Cordova *et al.*, 2014).

Dependiendo del tamaño del lote, el DNA de los insectos fue analizado de forma individual o en grupos de cinco, mediante el siguiente procedimiento: en un tubo de 0.5 mL se agregaron 45  $\mu$ L de agua ultra pura, seguidos de 5  $\mu$ L en total de DNA templado, correspondientes a 1  $\mu$ L de suspensión de DNA por cada insecto, siendo la concentración final del tubo una solución 1:10 conteniendo DNA de cinco muestras distintas en igual proporción. De esta mezcla se tomaron 2  $\mu$ L como templado para las reacciones de PCR en tiempo real, respetando las cantidades de reactivos mostradas en el cuadro 7. Se registró la relación entre los individuos analizados y el grupo al que pertenecieron durante el análisis. En caso de encontrar resultados positivos, se procedería a realizar una detección individual a todos los insectos miembros de dicho agrupamiento. Se emplearon controles positivos y negativos para todas las reacciones realizadas, los cuales consistieron en el uso de 2  $\mu$ L de DNA extraído de palmas previamente caracterizadas como positivas a la infección por fitoplasmas del grupo del ALC y la misma cantidad de agua ultra pura, respectivamente.

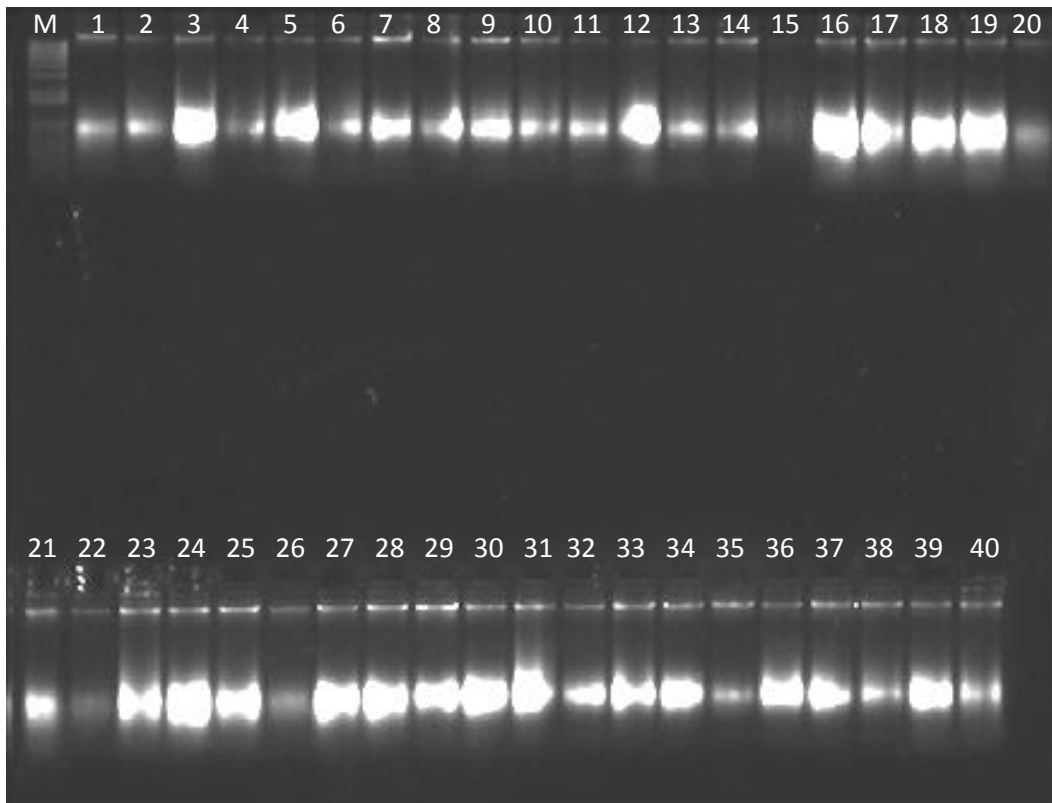
## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Captura de insectos *H. crudus*

Las colectas de insectos *H. crudus* fueron realizadas del 5 al 20 de noviembre de 2013, para el sitio jardines del CICY, donde fueron capturados 53 individuos, y en cuatro fechas distintas para el sitio ubicado en la localidad de Chicxulub Puerto, en el cual fueron colectados 336 insectos: 21 de febrero de 2014 para los primeros 79 individuos, 28 de marzo de 2014 para los siguientes 126, 8 de abril de 2014 para otros 105, y 24 de febrero de 2015 para los restantes 26 ejemplares. La cantidad superior de insectos colectados en este último sitio responde a la presencia de un mayor número de palmas de la especie *Thrinax radiata* con síntomas sugestivos de ALC en el área de captura (véase Capítulo IV para el análisis por PCR en tiempo real de dichas palmas, resultando en dos casos positivos de un total de seis), en comparación con el sitio de jardines del CICY, de manera que se planteó estudiar con mayor detenimiento la población de insectos presentes en dicha zona.

### 2.3.2 Extracción de ácidos nucleicos de insectos *H. crudus*

La calidad del DNA purificado de los 53 insectos que fueron capturados para inferir el porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en el sitio de captura jardines del CICY se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. La figura 14 muestra las bandas de DNA total obtenidas para los individuos del 1 al 40. Se observaron bandas para 52 de los 53 insectos capturados en dicho sitio, lo que permitió avanzar con el desarrollo del estudio empleando dichas muestras para las pruebas de detección por PCR en tiempo real. Para el insecto número 42 no se logró una extracción exitosa, de modo que la muestra fue descartada.

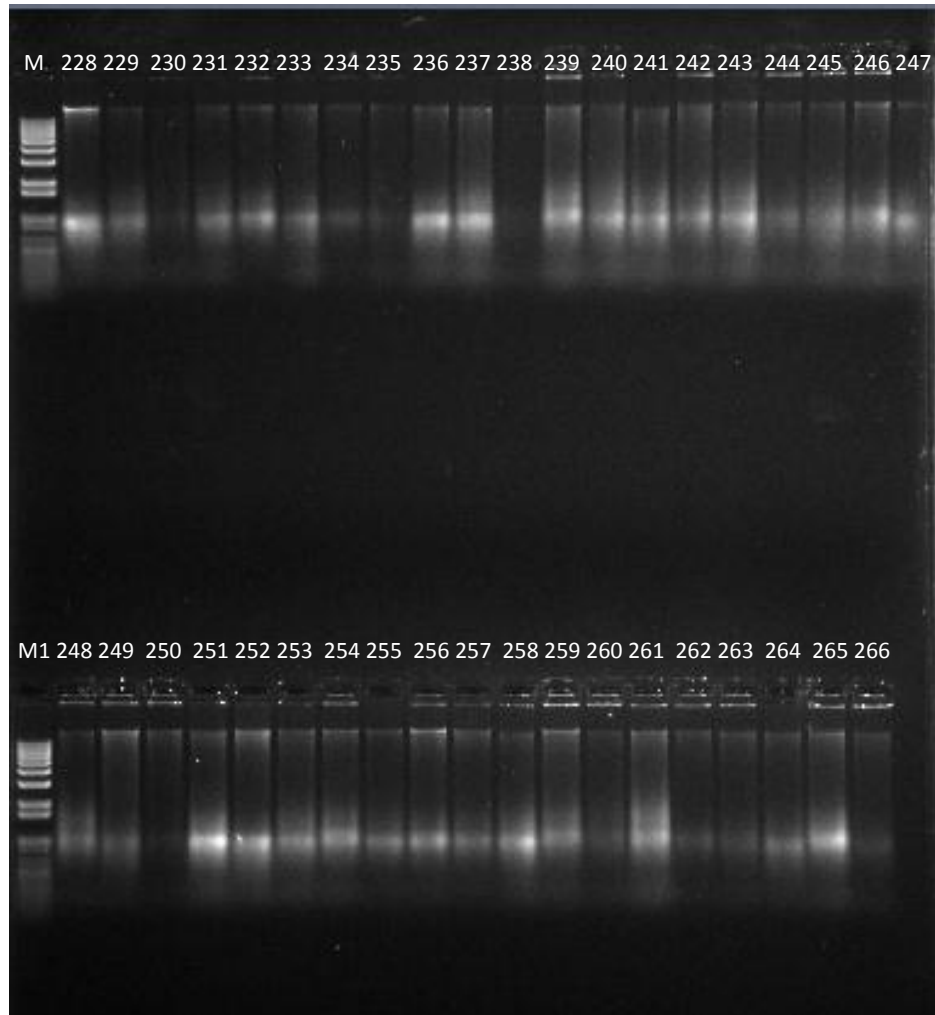


**Figura 14.** Visualización de DNA de *H. crudus* en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de los primeros 40 insectos para la prueba del porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en el sitio de captura jardines del CICY. Carril M: marcador Invitrogen™ 1 Kb DNA Ladder (Cat. 15615-016); carriles 1-40: DNA de los primeros 40 insectos capturados.

De la misma forma se analizaron las bandas de DNA total obtenidas de los insectos capturados en el sitio de colecta Chicxulub Puerto, empleándose las mismas



condiciones de electroforesis previamente mencionadas. La figura 15 muestra las bandas pertenecientes a los individuos del 228 al 266. Para las pruebas de detección por PCR en tiempo real se procedió con el total de 336 muestras de insectos capturados en dicho sitio.



**Figura 15.** Visualización de DNA de *H. crudus* en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de 39 insectos para la prueba del porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en el sitio de captura Chicxulub Puerto. Carriles M y M1: marcador Invitrogen™ 1 Kb DNA Ladder (Cat. 15615-016); carriles 228-266: DNA de 39 insectos capturados (individuos 228 al 266).

### 2.3.3 Detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en insectos *H. crudus* por reacciones de PCR en tiempo real

El análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC para los *H. crudus* de ambos sitios se realizó sometiendo el DNA obtenido a reacciones de PCR en tiempo real

utilizando las condiciones y reactivos mencionados anteriormente (véase apartado 2.2.4). Los resultados para los insectos del sitio de colecta jardines del CICY pueden observarse en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Resultados del análisis de detección por PCR en tiempo real de la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en el cuerpo de 52 insectos capturados en el sitio de colecta jardines del CICY durante noviembre de 2013. Cada insecto se examinó de forma individual.

No. de insecto analizado	Reacción con la sonda 503LY16S	No. de insecto analizado	Reacción con la sonda 503LY16S	No. de insecto analizado	Reacción con la sonda 503LY16S
1	Negativa	19	Negativa	37	Negativa
2	Negativa	20	Negativa	38	Negativa
3	Negativa	21	Negativa	39	Negativa
4	Negativa	22	Negativa	40	Negativa
5	Negativa	23	Negativa	41	Negativa
6	Negativa	24	Negativa	43	Negativa
7	Negativa	25	Negativa	44	Negativa
8	Negativa	26	Negativa	45	Negativa
9	Negativa	27	Negativa	46	Negativa
10	Negativa	28	Negativa	47	Negativa
11	Negativa	29	Negativa	48	Negativa
12	Negativa	30	Negativa	49	Negativa
13	Negativa	31	Negativa	50	Negativa
14	Negativa	32	Negativa	51	Negativa
15	Negativa	33	Negativa	52	Negativa
16	Negativa	34	Negativa	53	Negativa
17	Negativa	35	Negativa	-	-
18	Negativa	36	Negativa	-	-

El DNA de los insectos capturados en Chicxulub Puerto fue analizado tanto de forma individual como en grupos de cinco, con análisis individuales planeados en caso de observar reacciones positivas en alguno de los grupos. El resultado de estos análisis se muestra en los cuadros 9 y 10.

**Cuadro 9.** Resultados en grupos de cinco del análisis de detección por PCR en tiempo real de la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en el cuerpo de los primeros 310 insectos capturados en el sitio de colecta Chicxulub Puerto durante el periodo de febrero-abril de 2014.

<b>Grupo de insecto analizado</b>	<b>Reacción con la sonda 503LY16S</b>	<b>Grupo de insecto analizado</b>	<b>Reacción con la sonda 503LY16S</b>	<b>Grupo de insecto analizado</b>	<b>Reacción con la sonda 503LY16S</b>
1-5	Negativa	106-110	Negativa	211-215	Negativa
6-10	Negativa	111-115	Negativa	216-220	Negativa
11-15	Negativa	116-120	Negativa	221-225	Negativa
16-20	Negativa	121-125	Negativa	226-230	Negativa
21-25	Negativa	126-130	Negativa	231-235	Negativa
26-30	Negativa	131-135	Negativa	236-240	Negativa
31-35	Negativa	136-140	Negativa	241-245	Negativa
36-40	Negativa	141-145	Negativa	246-250	Negativa
41-45	Negativa	146-150	Negativa	251-255	Negativa
46-50	Negativa	151-155	Negativa	256-260	Negativa
51-55	Negativa	156-160	Negativa	261-265	Negativa
56-60	Negativa	161-165	Negativa	266-270	Negativa
61-65	Negativa	166-170	Negativa	271-275	Negativa
66-70	Negativa	171-175	Negativa	276-280	Negativa
71-75	Negativa	176-180	Negativa	281-285	Negativa
76-80	Negativa	181-185	Negativa	286-290	Negativa
81-85	Negativa	186-190	Negativa	291-295	Negativa
86-90	Negativa	191-195	Negativa	296-300	Negativa
91-95	Negativa	196-200	Negativa	301-305	Negativa
96-100	Negativa	201-205	Negativa	306-310	Negativa
101-105	Negativa	206-210	Negativa	-	-

**Cuadro 10.** Resultados del análisis de detección por PCR en tiempo real de la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en el cuerpo de los últimos 26 insectos capturados en el sitio de colecta Chicxulub Puerto durante febrero de 2015. Cada insecto se examinó de forma individual.

<b>No. de insecto analizado</b>	<b>Reacción con la sonda 503LY16S</b>	<b>No. de insecto analizado</b>	<b>Reacción con la sonda 503LY16S</b>	<b>No. de insecto analizado</b>	<b>Reacción con la sonda 503LY16S</b>
311	Negativa	320	Negativa	329	Negativa
312	Negativa	321	Negativa	330	Negativa
313	Negativa	322	Negativa	331	Negativa
314	Negativa	323	Negativa	332	Negativa
315	Negativa	324	Negativa	333	Negativa
316	Negativa	325	Negativa	334	Negativa
317	Negativa	326	Negativa	335	Negativa
318	Negativa	327	Negativa	336	Negativa
319	Negativa	328	Negativa	-	-

A la postre, los 388 insectos capturados en ambos sitios de colecta entre noviembre de 2013 y febrero de 2015 que fueron sometidos al análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC arrojaron resultados negativos. Cabe mencionar que los controles tanto positivos como negativos empleados en todas las reacciones realizadas se comportaron de la manera esperada, mostrando amplificaciones positivas para los primeros y negativas para los segundos.

## 2.4 DISCUSIÓN

El porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en las poblaciones silvestres de *H. crudus* de ambos sitios de colecta se determinó como de 0%. Tomando en cuenta que en todas las reacciones realizadas se emplearon controles positivos y negativos y que se observaron amplificaciones positivas para los primeros y negativas para los segundos, se concluyó que el proceso de detección se llevó a cabo sin errores metodológicos, asegurándose con ello la veracidad de dicha afirmación. Las posibles razones que ayuden a esclarecer estos resultados negativos son las siguientes:

Los estudios anteriores de Harrison y Oropeza (1997) y Vázquez-Euán (2010), realizados con la misma especie, incluyeron un tamaño total de muestra mayor al utilizado en el presente trabajo. En el primero se trabajó con 1321 individuos, encontrándose 105 casos positivos (7.94% del total de la muestra), mientras que en el segundo fueron incluidos 1809 insectos con 23 casos positivos (1.27% del total), aunque cabe mencionar que el tamaño de la mayoría de los lotes de captura reportados en la presente tesis para el sitio de Chicxulub Puerto (79, 105 y 126 individuos, dependiendo de su disponibilidad y abundancia durante los días en que fueron realizadas las colectas) fueron similares a los reportados por Vázquez-Euán para el mismo sitio, encontrando este autor insectos positivos aún tratándose de porciones pequeñas de su muestra total, hecho que contrasta con lo obtenido en el presente capítulo. Si bien los resultados encontrados por ambos autores difieren mucho entre sí, considerando que Vázquez-Euán colectó sus insectos en los mismos sitios empleados en el presente trabajo, mientras que Harrison y Oropeza emplearon insectos colectados en Florida, además de que las fechas de colecta reportadas por Vázquez-Euán son también más recientes, se juzgó probable encontrar un porcentaje de infección más cercano al manejado por este autor, en comparación con el obtenido por Harrison y Oropeza. Asimismo, las condiciones de captura manejadas en el

presente trabajo también semejan a las reportadas por Vázquez-Euán, ya que en ambos trabajos los insectos fueron colectados en áreas abiertas con presencia de palmas de distintas especies (véanse Figs. 11-12) con o sin síntomas de ALC (confirmadas enfermas en el caso de Chicxulub Puerto para el presente trabajo, véase Capítulo IV), sin importar sobre cuales estuviesen posados los insectos; en cambio, Harrison y Oropeza reportan haber capturado sus insectos directa y exclusivamente de una planta enferma. Tomando en cuenta lo anterior, si el porcentaje de Vázquez-Euán se mantenía estable, sería correcto suponer, para el tamaño de muestra empleado en el presente trabajo, la presencia de al menos cinco insectos positivos a fitoplasmas del grupo del ALC, aproximadamente. Incluso se juzgó probable obtener al menos un insecto positivo por cada lote de captura, debido a la estadística similar reportada en el trabajo de Vázquez-Euán mencionada anteriormente. Asimismo, considerando los datos mostrados en el cuadro 6 y los experimentos de transmisión exitosos realizados por Sánchez-Borges (2014), en los cuales se emplearon insectos *H. crudus* colectados tanto en los jardines del CICY como en la localidad de Chicxulub Puerto para infectar palmas de *P. pacifica* con fitoplasmas del grupo del ALC, la presencia de estos patógenos en las poblaciones de insectos de ambos sitios se juzgó como ampliamente respaldada (véase también apartado 3.1.3, Capítulo III). No obstante, el hecho de no haber encontrado insectos positivos, incluso tratándose de una muestra relativamente pequeña, es algo difícil de explicar si se considera sólo lo mencionado anteriormente.

Es por ello que deben tomarse en cuenta otros factores para explicar este hecho, como la posible variación estacional en el inóculo de fitoplasmas respecto a las poblaciones de *H. crudus* o la probable disminución natural, con el paso del tiempo, de la incidencia de este grupo de enfermedades en las palmas de un determinado sitio, al ir pereciendo los individuos susceptibles y con ello disminuyendo los posibles hospederos de estos patógenos, lo que también repercutiría en una disminución en la cantidad de insectos infectados con fitoplasmas en dichos ambientes. El primer caso, hasta la fecha, no ha sido explorado con detenimiento para *H. crudus* (no obstante, véase Cuadro 6 para variaciones anuales en el porcentaje de infección de las poblaciones de *H. crudus* de los sitios de colecta empleados en el presente trabajo, durante el periodo 2006-2009), sin embargo, un caso similar fue detectado para las especies *Orosius albicinctus* y *Anaceratagallia laevis*, insectos sospechados vectores del fitoplasma causante de la

enfermedad *Flavescence dorée* (FD), por Tanne *et al.* (2001). Estas especies fueron colectadas en campo a lo largo de muchas estaciones con el fin de demostrar su capacidad para liberar el fitoplasma del FD a un medio de alimentación artificial, sin embargo, la presencia de este fitoplasma fue imposible de detectar en los meses de septiembre, octubre y noviembre, mientras que no fue así para el resto del año. Cabe mencionar que los autores de este estudio aclararon que si bien los insectos fueron incapaces de liberar el patógeno a lo largo de dichos meses, la detección directa en los cuerpos de ambas especies arrojó resultados positivos durante el mismo periodo. La oportunidad de demostrar este fenómeno en *H. crudus* debe considerarse como fuerte propósito para la realización de futuros estudios sobre el tema.

Asimismo, la disminución de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de los ambientes estudiados no ha sido tampoco esclarecida en estudios recientes, no obstante, tomando en cuenta los datos mostrados en el cuadro 6, puede observarse que el porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC para la población de *H. crudus* colectada en los jardines del CICY disminuyó de un 18.99% inicial, para el año 2006, a 2.67% para el 2007, llegando finalmente a 0% en 2008. Esta clara disminución puede ser el resultado de cambios en la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas del mismo sitio, aspecto que decidió abordarse en las etapas subsecuentes del presente trabajo usando diferentes estrategias. La primera de ellas consistió en evaluar si la población de *H. crudus* presente en los jardines del CICY era capaz de transmitir de manera natural fitoplasmas del grupo del ALC a palmas de la especie *P. pacífica* expuestas al ambiente de dicho sitio. Esta palma ha demostrado una alta susceptibilidad al ALC y síndromes relacionados tanto en ensayos de transmisión previos (Sánchez-Borges, 2014) como en un experimento de exposición natural al vector realizado en los jardines del CICY (datos no publicados, véase apartado 3.1.3, Capítulo III). Por lo tanto, una forma de comprobar o no la presencia de insectos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en los jardines del CICY se basó en evaluar la posible infección de manera natural de estas palmas con fitoplasmas del grupo del ALC durante un periodo de tiempo cercano a los 300 días (véase Capítulo III). Igualmente, se investigó la presencia de palmas con síntomas sugestivos de ALC tanto en los jardines del CICY como en la localidad de Chicxulub Puerto, con el fin de determinar de manera directa, mediante análisis de detección de fitoplasmas por PCR en tiempo real, el estado actual de

la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las poblaciones de palmas de ambos sitios (véase Capítulo IV). De confirmarse que en efecto ha ocurrido una disminución en la incidencia del ALC en las palmas de ambos sitios y en caso de repetirse el resultado obtenido en este capítulo utilizando tamaños de muestra mayores así como colectas durante todo el año para las poblaciones de insectos *H. crudus*, la posibilidad de que el porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC haya disminuido a valores cercanos a cero en ambos ambientes debe ser seriamente considerada.

## 2.5 REFERENCIAS

- Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A., Nault, L.R. (2000). Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93(2), 271-276.
- Bosco, D., Tedeschi, R. (2013). Insect vector transmission assays. En: *Phytoplasma: Methods and Protocols* (M. Dickinson, J. Hodgetts, Eds.). *Methods in Molecular Biology*, vol. 938. Humana Press. Clifton, USA. 421 pp.
- Boudon-Padiou, E., Larrue, J., Caudwell, A. (1989). ELISA and dotblot detection of Flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Curr. Microbiol.* 19, 357-364.
- Caldwell, J.S. (1946). Notes on *Haplaxius* (Fowler) with description of new species. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 48(8), 203-206.
- Ceotto, P., Kergoat, G.J., Rasplus, J-Y., Bopurgoin, T. (2008). Molecular phylogenetics of cixiid planthoppers (Hemiptera: Fulgoromorpha): New insights from combined analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 667-678.
- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10(11), 526-535.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H.M., Windsor, G.D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathol. Mediterr.* 51(3), 607-617.
- Cordova, I., Oropeza, C., Puch-Hau, C., Harrison, N.A., Collí-Rodríguez, A., Narvaez, M., Nic-Matos, G., Reyes, C., Sáenz, L. (2014). A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16srIV subgroups A, D and E found in the Americas. *J. Plant Pathol.* 96(2), 343-352.
- Firrao, G., Andersen, M., Bertaccini, A., Boudon, E., Bove, J.M., Daire, X., Davis, R.E., Fletcher, J., Garnier, M., Gibb, K.S., Gundersen-Rindal, D.E., Harrison, N.A., Hiruki, C., Kirkpatrick, B.C., Jones, P., Kuske, C.R., Lee, I.M., Liefting, L., Marccone, C., Namba, S., Schneider, B., Sears, B.B., Seemuller, E., Smart, C.D., Streten, C.,



- Wang, K. (2004). “*Candidatus* Phytoplasma,” a taxon for the wall-less, nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(4), 1243–1255.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M., Marzachi, C. (2007). Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Front. Biosci.* 12, 1353-1375.
- Fletcher, J., Wayadande, A.C., Melcher, U., Ye, F. (1998). The phytopathogenic mollicute–insect vector interface: a closer look. *Phytopathology.* 88, 1351-1358.
- Harrison, N.A., Oropeza, C. (1997). Recent studies on detection of lethal yellowing disease phytoplasmas in the Americas. En: Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina Ghana, November 1995 (S.J. Eden-Green, F. Ofori, Eds.). Natural Resources Institute. Chatham, UK. 308 pp.
- Harrison, N.A., Richardson, P.A., Tsai, J.H., Ebbert, M.A., Kramer, J.B. (1996). PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Dis.* 80(3), 263-269.
- Howard, F.W. (1980a). Attractiveness of date and coconut palms to *Myndus crudus* and other homopterans. *Proc. Florida State Hort. Sci.* 93, 199-201.
- Howard, F.W. (1980b). Population densities of *Myndus crudus* Van Duzee (Homoptera: Cixiidae) in relation to coconut lethal yellowing distribution in Florida. *Principes.* 24(4), 174-178.
- Howard, F.W. (1983). World distribution and possible geographic origin of lethal yellowing and its vectors. *FAO Plant Protect. Bull.* 31, 101-113.
- Howard, F.W. (1987). *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae), a vector of lethal yellowing of palms. En: Proceedings of 2nd International Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of Economic Importance: Brigham Young University, Provo, Utah, USA, 28th July-1st August 1986 (M.R. Wilson, L.R. Nault, Eds.). CAB International Institute of Entomology. London, UK. 386 pp.

- Howard, F.W., McCoy, R.E. (1980). Reduction in spread of mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm *Veitchia merrillii* by the use of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 73(2), 268-270.
- Howard, F.W., Mead, F.M. (1980). A survey of Auchenorrhyncha (Insecta: Homoptera) associated with palms in southern Florida. *Trop. Agr. (Trinidad)*. 57(2), 145-153.
- Howard, F.W., Norris, R.C., Thomas, D.L. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera, Cixiidae). *Trop. Agr. (Trinidad)*. 60(3), 168-171.
- Howard, F.W., Thomas, D.L. (1980). Transmission of palm lethal decline to *Veitchia merrillii* by a planthopper *Myndus crudus*. *J. Econ. Entomol.* 73(5), 715-717.
- Howard, F.W., Williams, D.S., Norris, R.C. (1984). Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int. J. Entomol.* 26(4), 331-338.
- Kramer, J.P. (1979). Taxonomic study of the planthopper genus *Myndus* in the Americas (Homoptera:Fulgoroidea:Cixiidae). *T. Am. Entomol. Soc.* 105, 301-389.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A. (1998). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathol.* 88(12), 1359-1366.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Louis, C., Caudwell, A. (1994). Propagation of Flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J. Invert. Pathol.* 63(3), 285-293.
- Lherminier, J., Terwisscha van Scheltinga, T., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A. (1989). Rapid immuno-fluorescence detection of the grapevine Flavescence dorée in the salivary glands of the leafhopper *Euscelidius variegatus* Kbm. *Phytopath. Z.* 125, 353-360.
- Osorno, Y.Y. (2013). *Evaluación del efecto de lectinas en insectos Haplaxius (Myndus) crudus Van Duzee*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

- Reinert, J.A. (1980). Phenology and density of *Haplaxius crudus* (Homoptera:Cixiidae) on three southern turfgrasses. *Environ. Entomol.* 9, 13-15.
- Sánchez-Borges, R. (2014). *Evaluación de Haplaxius crudus como posible transmisor de fitoplasmas del grupo 16SrIV-A a la palma Pritchardia pacifica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., Namba, S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(11), 4252-4257.
- Tanne, E., Boudon-Padieu, E., Clair, D., Davidovich, M., Melamed, S., Klein, M. (2001). Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Phytopathology.* 91(8), 741-746.
- Tsai, J.H., Kirsch, O.H. (1978). Bionomics of *Haplaxius crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Environ. Entomol.* 7, 305, 308.
- Van Duzee, E.P. (1907). Notes on Jamaican Hemiptera: A report on a collection of Hemiptera made on the Island of Jamaica in the spring of 1906. *Bull. Buffalo Soc. Natur. Sci.* 8, 3-79.
- Vázquez-Euán, R. (2010). *Detección y caracterización de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vázquez-Euán, R., Harrison, N.A, Narvaez, M., Oropeza, C. (2011). Occurrence of a 16SrIV group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *Plant Dis.* 95, 256-262.
- Waters, H. (1976). Feeding behaviour of a putative vector of lethal yellowing *Haplaxius crudus* (Van Duzee) (Homoptera: Cixiidae). *Principes.* 20, 65-66.
- Weintraub, P.G., Beanland, L.A. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Ann. Rev. Entomol.* 51, 91-111.

Zenner de Polanía, I., López, A. (1977). Apuntes sobre la biología y hábitos del *Haplaxius pallidus*, transmisor de la “marchitez sorpresiva” en palma africana. *Rev. Colomb. Entomol.* 3, 49-62.

## CAPÍTULO III

### MONITOREO DE LA APARICIÓN DE CASOS DE AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO EN LA ESPECIE *Pritchardia pacifica* Seem. & H.Wendl.

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

##### 3.1.1 Amarillamiento Letal del Cocotero

El Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) es una enfermedad devastadora de rápida dispersión que afecta a *Cocos nucifera* L. y a 36 otras especies de palmas (véase Cuadro 4, Capítulo I) en el continente americano (Harrison y Oropeza, 2008). Esta enfermedad es causada por bacterias especializadas denominadas como fitoplasmas (McCoy *et al.*, 1983). Los fitoplasmas causantes del ALC y otros síndromes relacionados (véase Cuadro 3, Capítulo I) en palmas del continente americano son transmitidos por el insecto *Haplaxius crudus* Van Duzee (Sánchez-Borges, 2014; Howard *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1983), el único vector confirmado hasta la fecha para este grupo de enfermedades.

Actualmente, se considera que el cocotero, *Adonidia merrillii* (sin. *Veitchia merrillii* (Zona *et al.*, 2011; Zona, 1999)), *Phoenix dactylifera* y *Pritchardia* spp. son las especies de palmas más susceptibles al ALC y sus síndromes relacionados (Elliot y Harrison, 2007); asimismo, *C. nucifera*, *A. merrillii*, *Ph. canariensis*, *Pritchardia pacifica*, *P. thurstonii* y *Trachycarpus fortunei* son las únicas areáceas que han logrado infectarse con fitoplasmas del grupo del ALC en ensayos de transmisión *in vivo* con el vector *H. crudus* (Sánchez-Borges, 2014; Howard *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1983; Howard y Thomas, 1980).

##### 3.1.2 *P. pacifica*: origen y su relación con fitoplasmas del grupo del ALC

*P. pacifica* (Fig. 16), conocida comúnmente como “palma de abanico de Fiyi”, es una especie de palmera originaria de Tonga y que en la actualidad también se encuentra distribuida en Fiyi y Samoa. Fue descrita por primera vez en 1862 por Seemann y Wendland.



**Figura 16.** *P. pacifica* Seem. & H.Wendl. Fotografía tomada de Tropical Plant Pictures (<http://plants.swtexture.com>). ©SWtexture.

La presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en *P. pacifica* fue inferida en 1973 (Parthasarathy y Fisher, 1973) y comprobada un año después con microscopía electrónica (Parthasarathy, 1974) (véase Fig. 2B, Capítulo I). Actualmente, los fitoplasmas del grupo del ALC, subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D, han sido detectados en los tejidos de esta especie por medio de análisis de PCR (Sánchez-Borges, 2014).

**3.1.3 Mortandad de *P. pacifica* observada en el CICY en forma natural y en ensayos de transmisión en jaulas realizados con insectos *H. crudus***

Durante el periodo 2011-2013, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) se observó lo siguiente: a) síntomas sugestivos de ALC fueron detectados y después confirmados por análisis de PCR en individuos de mediana edad de la especie *P. pacifica* (Fig. 17) sembrados en los jardines del CICY como plantas ornamentales; b) un total de 20 ejemplares jóvenes de la especie *P. pacifica* provenientes de vivero y después expuestos al ambiente de los jardines del CICY como parte de un experimento de exposición natural al vector (datos no publicados), desarrollaron síntomas sugestivos de ALC (Fig. 18), a escasos meses del comienzo de dicha exposición. En ambos casos, las palmas enfermas eventualmente murieron.



**Figura 17.** Individuos de *P. pacifica* con síntomas de ALC, sembrados en los jardines del CICY. Febrero de 2012. Fotografías de Carlos Oropeza Salín.



**Figura 18.** Ejemplares jóvenes de *P. pacifica* empleados en un experimento previo de exposición natural al vector en el sitio de jardines del CICY (datos no publicados). Los números en la figura indican las etapas secuenciales de síntomas provocados por la enfermedad observados en todas las palmas. El experimento comenzó en septiembre de 2012, con aparición de los primeros síntomas transcurridos cuatro meses, aproximadamente (detecciones positivas por PCR en tiempo real transcurridos tres meses, aproximadamente).

La relativa facilidad con la que estas palmas adquirieron la enfermedad de forma natural, aún sin la necesidad de liberar cantidades enormes de insectos en jaulas confinadas, sugirió la posibilidad de usar a la especie como planta indicadora de la presencia de insectos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC capaces de transmitir estos patógenos, tanto en los jardines del CICY como en sitios con características similares.

Asimismo, el trabajo realizado por Sánchez-Borges (2014), en el cual ejemplares jóvenes de *P. pacifica* lograron infectarse con fitoplasmas del grupo del ALC (subgrupos 16SrIV-A y D) tras la realización de ensayos de transmisión en jaulas, en los cuales se empleó a *H. crudus* (colectados en los jardines del CICY y en la localidad de Chicxulub Puerto) como insecto vector, también evidenció dicha susceptibilidad de parte de la



especie para ambos subgrupos de fitoplasmas detectados, así como confirmó el papel de *H. crudus* como vector de fitoplasmas del grupo del ALC en *P. pacifica*.

Adicionalmente, esta alta susceptibilidad también ofrece el potencial de emplear a *P. pacifica* como fuente de inóculo para la obtención *in vitro* de insectos *H. crudus* infectados con fitoplasmas del grupo del ALC, tan necesarios para la evaluación *in vivo* de material resistente y para extender el estudio de la epidemiología de este grupo de enfermedades.

### **3.1.4 Empleo de *P. pacifica* para determinar la persistencia local de fitoplasmas del grupo del ALC en el ambiente de los jardines del CICY**

Como ya se mencionó en el apartado anterior, en septiembre de 2012 fueron expuestas al ambiente de los jardines del CICY 20 palmas de la especie *P. pacifica*, las cuales desarrollaron síntomas sugestivos de ALC y eventualmente murieron (véase Fig. 18). Sin embargo, como se mostró en el capítulo anterior (véase apartado 2.3.3, Capítulo II), en noviembre de 2013 se realizó una colecta de insectos *H. crudus* en el mismo sitio para determinar el número de individuos infectados con fitoplasmas del grupo de ALC en una muestra de dicha población, encontrándose un porcentaje de infección de cero. Asimismo, ningún individuo de las especies de palmas presentes en los jardines del CICY ha mostrado síntomas sugestivos de ALC desde la fecha en que se realizó dicha colecta, hecho que sugiere una baja incidencia de la enfermedad en las palmas e insectos del sitio a pesar de múltiples reportes en fechas anteriores que señalan lo contrario (Sánchez-Borges, 2014; Vázquez-Euán *et al.*, 2011; Vázquez-Euán, 2010; Nic-Matos, 2007).

Debido a lo anterior, en este capítulo se realizó un nuevo bioensayo en el sitio jardines del CICY con palmas de la especie *P. pacifica* con el objetivo de monitorear la posible transmisión natural de fitoplasmas del grupo del ALC a estas plantas, a pesar de haberse determinado previamente un porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC de cero en la población silvestre de *H. crudus* presente en dicho sitio (véase apartado 2.3.3, Capítulo II). Los resultados obtenidos se integrarán a los presentados en el capítulo previo del presente trabajo para determinar si está ocurriendo o no una disminución en la incidencia del ALC y síndromes relacionados en el ambiente de este sitio. Asimismo, estos resultados se complementarán con los resultados presentados en el

siguiente capítulo para evaluar el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en el estado de Yucatán.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Experimento de infección natural con fitoplasmas del grupo del ALC en *P. pacifica***

Un total de 16 palmas de la especie *P. pacifica* provenientes de vivero, de dos tallas distintas, fueron expuestas al ambiente de los jardines del CICY (Fig. 19) con el propósito de evaluar la posible infección de manera natural con fitoplasmas del grupo del ALC por parte de la población silvestre de *H. crudus* presente en dicho sitio (véase Fig. 10, Capítulo II). De igual manera, se reservaron cuatro ejemplares de la misma especie confinados en una jaula que se mantuvo libre de *H. crudus* en todo momento para usarse como grupo control.



**Figura 19.** Ejemplares de *P. pacifica* utilizados en el experimento de infección con fitoplasmas del grupo del ALC. Junto con el resto de las plantas del mismo tratamiento, fueron expuestas a la intemperie en los jardines del CICY para que la población silvestre de *H. crudus* de dicho ambiente pudiese alimentarse libremente de sus hojas. Fotografía del autor.

Todas las plantas fueron sometidas a análisis frecuentes de detección de fitoplasmas del grupo del ALC en tejido de hoja por medio de PCR en tiempo real, empleando previamente un protocolo de extracción de ácidos nucleicos basado en lo establecido por Doyle y Doyle (1990) (véase apartado 2.2.3 para la preparación de los reactivos). El procedimiento realizado para cada planta fue el siguiente:

1. Se pesó una cantidad suficiente de tejido de hoja (desde 0.2 hasta 1 g, dependiendo del tamaño de la planta), cortada en trocitos pequeños de tamaño regular y procurando trabajar siempre con las hojas más nuevas.

2. Se depositó el tejido en un mortero y acto seguido se maceró con la ayuda de un pistilo y nitrógeno líquido. Se agregaron 1-5 mL de buffer de extracción CTAB adicionado con monotioglicerol al 0.1% y se continuó macerando.
3. Se recuperó 1 mL de la mezcla obtenida en un tubo Eppendorf estéril de 2 mL.
4. El extracto se incubó por una hora a 65 °C y posteriormente se dejó enfriar.
5. Se agregó 1 mL de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó vigorosamente, después se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos.
6. Se extrajo el sobrenadante resultante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf.
7. Se agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclando por inversión. Después se incubó a -20 °C por 60 minutos.
8. Concluyendo la incubación se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos.
9. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente evitando tirar la pastilla formada.
10. Se agregaron 500 µL de etanol al 70% (para el lavado de la pastilla) y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos.
11. Se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente.
12. Por último, se disolvió la pastilla en 50 µL de buffer TE o agua ultra pura, aproximadamente.

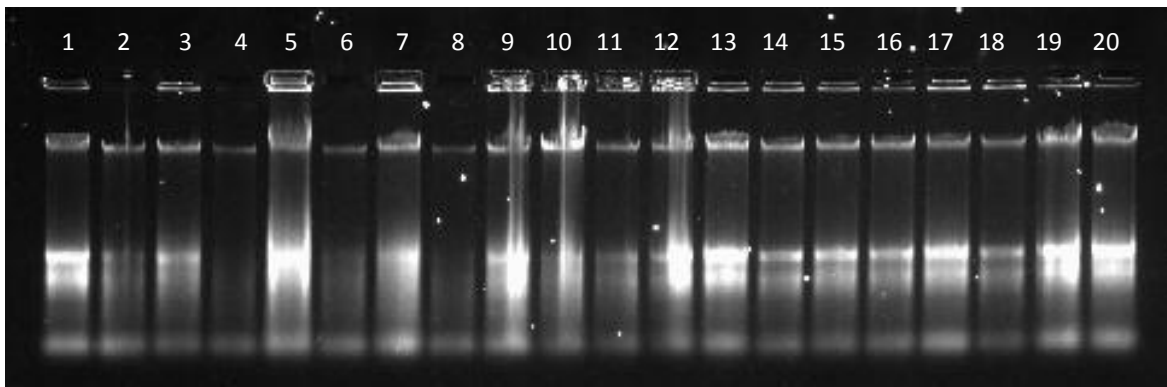
Los análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC por PCR en tiempo real fueron realizados siguiendo lo establecido por Cordova *et al.* (2014) y empleando los materiales, reactivos y cantidades especificados en el capítulo anterior (véase apartado 2.2.4), después de confirmar la presencia de DNA total para todas las palmas mediante análisis por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio (véase apartado 2.2.3 para las condiciones, reactivos y equipos empleados). Se emplearon controles positivos y negativos para todas las reacciones realizadas, los cuales consistieron en el uso de 2 µL de DNA extraído de palmas

previamente caracterizadas como positivas a la infección por fitoplasmas del grupo del ALC y la misma cantidad de agua ultra pura, respectivamente.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Detección de fitoplasmas del grupo del ALC en *P. pacifica* por PCR en tiempo real

Se realizaron extracciones de ácidos nucleicos de tejido de hoja de manera periódica a todas las plantas incluidas en el experimento. La primera extracción se realizó al tiempo cero (al momento de adquirir las plantas), con el material vegetal colectado el 28 de agosto de 2014. La segunda extracción se realizó con material del 13 de octubre, a los 46 días tras la primera colecta. La tercera extracción se llevó a cabo con material colectado el 8 de diciembre, transcurridos 102 días desde la primera colecta. Una cuarta extracción fue llevada a cabo con material colectado el 15 de enero de 2015, a 140 días del comienzo del experimento. Finalmente, se realizó una quinta extracción con material colectado el 18 de junio del mismo año, a 294 días de estar expuestas las plantas al ambiente de los jardines del CICY. La figura 20 muestra las bandas de DNA total obtenidas para las 20 palmas en una de las extracciones realizadas.



**Figura 20.** Visualización de DNA de *P. pacifica* en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de las 20 palmas incluidas en el experimento de infección con fitoplasmas del grupo del ALC, con material extraído el 8 de diciembre de 2014 (a 102 días del comienzo del experimento). Carriles 1-20: DNA de las plantas 1-20, respectivamente.

El cuadro 11 muestra los resultados obtenidos de las reacciones de PCR en tiempo real para las pruebas de detección de fitoplasmas del grupo del ALC en las 20 palmas incluidas en el experimento.

**Cuadro 11.** Resultados obtenidos de las reacciones de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas del grupo del ALC en las 20 palmas *P. pacifica* incluidas en el experimento de infección.

Número de palma	Tratamiento	Detección al día 0	Detección al día 46	Detección al día 102	Detección al día 140	Detección al día 294
1	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
2	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
3	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
4	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
5	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
6	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
7	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
8	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
9	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
10	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
11	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
12	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
13	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
14	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
15	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
16	Expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
17	No expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
18	No expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
19	No expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
20	No expuesta	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Como puede observarse en el cuadro, ninguna de las palmas expuestas al ambiente de los jardines del CICY, donde existe *H. crudus* de forma silvestre, adquirió fitoplasmas del grupo del ALC hasta la fecha del último análisis por PCR, realizado con material colectado el 18 de junio de 2015, a 294 días del comienzo del experimento. Cabe mencionar que los controles tanto positivos como negativos empleados en todos los análisis de detección realizados se comportaron de la manera esperada, mostrando amplificaciones positivas para los primeros y negativas para los segundos.

### 3.4 DISCUSIÓN

Hasta la fecha de preparación de la versión final del manuscrito de la presente tesis (20 de noviembre de 2015), la totalidad de los individuos jóvenes de *P. pacifica* que

formaron parte del presente experimento se encontraron sin síntomas visuales sugestivos de ALC. Asimismo, las pruebas de detección de fitoplasmas del grupo del ALC realizadas en dichas palmas también resultaron negativas, con el último análisis llevado a cabo con material colectado el 18 de junio de 2015, a 294 días del comienzo del experimento. Debido a la ausencia de síntomas en las palmas expuestas y al empleo y correcto comportamiento de controles positivos y negativos en todos los análisis realizados, observándose amplificaciones positivas para los primeros y negativas para los segundos, se puede asegurar con confianza la veracidad de esta conclusión. La principal razón para explicar este suceso es que la incidencia del ALC y síndromes relacionados ha disminuido con el paso del tiempo en el sitio de estudio.

Como ya se mencionó previamente, en años anteriores se observó en el CICY una mortandad de 100% de palmas de la especie *P. pacifica* por una enfermedad que posteriormente se confirmó era causada por fitoplasmas del grupo del ALC (véase apartado 3.1.3). Dicho fenómeno concuerda con reportes de alta incidencia de ALC y síndromes relacionados en palmas e insectos *H. crudus* del mismo sitio en fechas anteriores (Sánchez-Borges, 2014; Vázquez-Euán *et al.*, 2011; Vázquez-Euán, 2010; Nic-Matos, 2007) (véase también Cuadro 6, Capítulo II). No obstante, no se han observado nuevos casos de palmas enfermas en fechas recientes (véase Capítulo IV) y tampoco se han detectado *H. crudus* infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en el sitio (véase Capítulo II), evidencias congruentes con los resultados obtenidos en el presente capítulo. Todo lo anterior sugiere que efectivamente ha ocurrido una marcada disminución en la incidencia del ALC y síndromes relacionados para el sitio de jardines del CICY, tanto en palmas como en la población silvestre del insecto *H. crudus*.

### 3.5 REFERENCIAS

- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*. 12, 13-15.
- Elliot, M.L., Harrison, N.A. (2007). Palm diseases caused by phytoplasmas: Lethal yellowing and Texas phoenix palm decline. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. [Online] Disponible en: <https://www.freshfromflorida.com/content/download/9785/134978/Palm%20Diseases%20Caused%20by%20Phytoplasmas.pdf> [Consulta: 06/11/2014].
- Harrison, N.A., Oropeza, C. (2008). Coconut lethal yellowing. En: Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas (N.A. Harrison, G.P. Rao, C. Marcone, Eds.). Studium Press LLC. Houston, USA. 422pp.
- Howard, F.W., Norris, R.C., Thomas, D.L. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera, Cixiidae). *Trop. Agr. (Trinidad)*. 60(3), 168-171.
- Howard, F.W., Thomas, D.L. (1980). Transmission of palm lethal decline to *Veitchia merrillii* by a planthopper *Myndus crudus*. *J. Econ. Entomol.* 73(5), 715-717.
- Howard, F.W., Williams, D.S., Norris, R.C. (1984). Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int. J. Entomol.* 26(4), 331-338.
- McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt, L., Collins, M.E. (1983). Lethal yellowing of palms. *U. Fla. AES Bull.* 834, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, Florida, USA.
- Nic-Matos, G. (2007). *Estudio sobre la sobrevivencia de Thrinax radiata al amarillamiento letal (AL)*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. México.
- Parthasarathy, M.V. (1974). Mycoplasma-like organisms associated with Lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology*. 64, 667-674.



- Parthasarathy, M.V., Fisher, J.B. (1973). The menace of lethal yellowing to Florida palms. *Principes*. 17, 39-45.
- Sánchez-Borges, R. (2014). *Evaluación de Haplaxius crudus como posible transmisor de fitoplasmas del grupo 16SrIV-A a la palma Pritchardia pacifica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vázquez-Euán, R. (2010). *Detección y caracterización de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vázquez-Euán, R., Harrison, N.A, Narvaez, M., Oropeza, C. (2011). Occurrence of a 16SrIV group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *Plant Dis*. 95, 256-262.
- Zona, S. (1999). New perspectives on generic limits and relationships in the Ptychospermatinae (Palmae: Arecoideae). *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 83, 255-263.
- Zona, S., Francisco-Ortega, J., Jestrow, B., Baker, W.J., Lewis, C.E. (2011). Molecular phylogenetics of the palm subtribe Ptychospermatinae (Arecaceae). *Am. J. Bot.* 98(10), 1716-1726.



## CAPÍTULO IV

### EVALUACIÓN DE PLANTAS ENFERMAS POR AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO EN EL ESTADO DE YUCATÁN

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

##### 4.1.1 Amarillamiento Letal del Cocotero

El Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) es la enfermedad más importante que afecta la producción de coco en México y muchos otros países de la región (Myrie *et al.*, 2012; Oropeza y Zizumbo, 1997). Además de *Cocos nucifera* L., el ALC perjudica al menos a otras 36 especies de palmas (véase Cuadro 4, Capítulo I) en el continente americano (Harrison y Oropeza, 2008).

El ALC y sus síndromes relacionados (véase Cuadro 3, Capítulo I) son causados por bacterias especialistas conocidas como fitoplasmas (Ntushelo *et al.*, 2013; McCoy *et al.*, 1983), los cuales a su vez son transmitidos por el hemíptero *Haplaxius crudus* Van Duzee (previamente *Myndus crudus*), el único vector conocido hasta la fecha para este grupo de enfermedades en el continente americano (Sánchez-Borges, 2014; Howard *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1983). En la figura 21 se muestran algunas de las sintomatologías producidas por fitoplasmas del grupo del ALC en distintas especies de palmas presentes en la península de Yucatán (véase Fig. 9, Capítulo I para la sintomatología típica en *C. nucifera*; véase también Fig. 12, Capítulo II para algunos síntomas sugestivos de ALC en *Thrinax radiata* y Figs. 17-18, Capítulo III para *Pritchardia pacifica*).



**Figura 21.** Sintomatologías producidas por fitoplasmas del grupo del ALC en tres especies de palmas presentes en la península de Yucatán: A1-A2.- Necrosis de la hoja espada en la especie *Adonidia merrillii*; A3-A4.- Necrosis de la inflorescencia en *A. merrillii*; B-D.- Pérdida de coloración progresiva en hojas de la especie *Sabal mexicana*, comenzando en las hojas basales más viejas hasta la hojas nuevas de la parte superior de la planta; G-I.- Pérdida de coloración en hojas de individuos jóvenes de *S. mexicana*; J-K.- Individuo sano e individuo enfermo de la especie *Pseudophoenix sargentii*, respectivamente y L.- Coloración normal (izquierda) y coloración de una planta infectada (derecha) en inflorescencias de *P. sargentii*. Tomado de Mota-Narvaez (2015) y Vázquez-Euán *et al.* (2011).

#### 4.1.2 Historia del ALC en América, México y Yucatán

El ALC fue detectado por vez primera en las Islas Caimán en 1834 (McCoy *et al.*, 1983); después fue reportado en Jamaica, donde fue propiamente descrito como una nueva enfermedad del cocotero (Fawcett, 1891). A continuación se propagó a otras islas en la región del Caribe incluyendo Haití, Bahamas, República Dominicana y Cuba (McCoy *et al.*, 1983; Carter, 1964; Bruner y Boucle, 1943). En los Estados Unidos fue detectado en 1955 en Key West, Florida (Corbett, 1959).

En México, el ALC apareció primero en las costas de Quintana Roo, en 1977 (McCoy *et al.*, 1982), y en el norte de Yucatán, en 1985 (Cardeña *et al.*, 1991). La enfermedad continuó propagándose invadiendo las costas de Campeche y Tabasco (Oropeza y Zizumbo, 1997). Asimismo, fitoplasmas del grupo del ALC también han sido detectados en cocoteros de los estados de Oaxaca y Guerrero (Harrison *et al.*, 2002a).

En la península de Yucatán, el ALC trajo como consecuencia la inicial destrucción de la mayoría de los cocoteros locales del ecotipo Alto del Atlántico. Este periodo de alta incidencia fue sucedido por el eventual reemplazo del material susceptible, en gran parte de las áreas afectadas, con individuos del ecotipo Enano Malayo, con un mayor grado de resistencia ante la enfermedad, permaneciendo también poblaciones de Alto del Atlántico a lo largo del estado, así como cultivares híbridos (Zizumbo *et al.*, 1999). No obstante, reportes recientes de grandes pérdidas de material resistente (del ecotipo Enano Malayo y del cultivar híbrido “MayPan” (Enano Malayo x Alto de Panamá)) en algunos sitios en Jamaica y Florida (Lebrun *et al.*, 2008; Broschat *et al.*, 2002) han puesto en duda si dicha resistencia es capaz de mantenerse a largo plazo, aunque la evidencia más reciente apunta a la contaminación genética sufrida por estas variedades como una de las causas detonantes de esta supuesta pérdida de resistencia (Baudouin *et al.*, 2008).

#### **4.1.3 Previos brotes de ALC y síndromes relacionados en palmas del estado de Yucatán**

En el estado de Yucatán se han registrado una serie de brotes de ALC y síndromes relacionados en especies de palmas distintas a *C. nucifera*, mismos que se mencionan a continuación: a) en *T. radiata* y *Coccothrinax readii*, tanto en los jardines del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) como en la localidad de Chicxulub Puerto (Nic-Matos, 2007; Narvaez *et al.*, 2006); b) en *Sabal mexicana* y *Pseudophoenix sargentii* en los jardines del CICY, Anillo Periférico de la ciudad de Mérida, localidad de Chicxulub Puerto y ciudad de Ticul (Vázquez-Euán *et al.*, 2011); c) en *Adonidia merrillii* (sin. *Veitchia merrillii* (Zona *et al.*, 2011; Zona, 1999)) en varios puntos de la ciudad de Mérida (Mota-Narvaez, 2015) y d) en *Roystonea regia* y *Acrocomia aculeata* muestreadas en distintos sitios del estado (Narvaez *et al.*, 2015).

Igualmente, a lo largo de la década pasada se realizaron múltiples muestreos de individuos de *C. nucifera* en distintas localidades del estado como parte de un programa de monitoreo, distribución y caracterización del ALC y síndromes relacionados en México. El cuadro 12 muestra los casos confirmados de ALC reportados en el informe técnico de dicho programa para los cocoteros del estado, durante el periodo de 2005-2009.

**Cuadro 12.** Análisis de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en palmas de *C. nucifera* con síntomas sugestivos de ALC, muestreadas en distintas localidades del estado de Yucatán, durante el periodo 2005-2009. La detección fue llevada a cabo mediante reacciones de PCR anidada. La caracterización de las cepas fue realizada por medio de secuenciación y análisis *in silico* de los productos obtenidos.

Año de colecta	Sitio	No. de palmas positivas	No. de palmas muestreadas	Subgrupo de fitoplasma
2005	Temozón	1	5	16SrIV-A
2005	Celestún	0	5	-
2006	Celestún	3	3	16SrIV-A
2006	Sisal	0	3	-
2006	San Crisanto	0	3	-
2006	Ticul	2	2	16SrIV-A
2008	San Crisanto	4	36	16SrIV-A
2009	Chelem	2	5	16SrIV-A
2009	Sisal	5	7	16SrIV-A
2009	Chabihau	2	5	16SrIV-A
2009	Santa Clara	3	5	16SrIV-A
2009	Celestún	0	7	-
2009	Dzilam de Bravo	0	4	-
2009	Ticul	1	3	16SrIV-A

Como puede observarse en el cuadro, la incidencia de los fitoplasmas del ALC en las palmas de cocotero de los sitios muestreados presenta variación de tipo temporal aún tratándose de un mismo sitio.

Cabe mencionar la existencia en la localidad de San Crisanto de una plantación experimental de *C. nucifera* llamada “Guadalupe” establecida en 1991 con material representativo de las distintas variedades de germoplasma presentes en el territorio nacional con el fin de evaluar sus distintos niveles de susceptibilidad ante el ALC. En dicha plantación se reportaron múltiples casos de ALC en los cocoteros que fueron evaluados (Zizumbo *et al.*, 2008). Asimismo, investigadores del CICY actualmente se encuentran evaluando la genética de poblaciones segregantes de cocotero en otra plantación experimental en San Crisanto llamada “Caridad del Cobre” (datos no

publicados); ambas plantaciones representan focos de infección importantes, aunque intencionales, que deben tomarse en cuenta si se desea conocer la incidencia tanto previa como actual del ALC en el estado.

#### **4.1.4 Estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en Yucatán**

Desde su aparición en la costa norte de Yucatán en 1985 (Cardeña *et al.*, 1991), el ALC continúa afectando a los cocoteros y a muchas otras palmas de valor ornamental o cultural presentes en el estado, sin embargo, durante este periodo su incidencia ha variado, desde los altos niveles de mortandad registrados a finales de la década de los ochenta y a lo largo de los noventa hasta los bajos niveles observados a finales de la década pasada en distintos sitios del estado (véase Cuadro 12).

La presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres de *H. crudus* también ha sido detectada en el estado (Vázquez-Euán, 2010) (véase también Cuadro 6, Capítulo II), sin embargo, en colectas recientes llevadas a cabo durante las etapas previas de la presente investigación (véase Capítulo II) no se detectaron individuos positivos para los sitios de jardines del CICY y localidad de Chicxulub Puerto, lo que también sugiere una disminución proporcional en la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de dichos sitios, hecho que no ha sido aclarado en estudios recientes.

No obstante, los múltiples brotes de enfermedades del grupo del ALC registrados en Yucatán en palmas distintas a *C. nucifera* mencionados en el apartado anterior, demuestran la baja especificidad de estos fitoplasmas hacia sus palmas hospederas, no pudiéndose descartar la posibilidad de que en el futuro aparezcan nuevos brotes de estas enfermedades en especies de palmas en las que la enfermedad no ha sido reportada anteriormente, y que algunas de estas especies como *T. radiata*, *C. readii* y *S. mexicana* puedan actuar como reservorios naturales de estos patógenos, situación que podría desencadenar en un escenario adverso para el cultivo de cocotero en la región si no se toman en cuenta medidas preventivas para el correcto manejo y contención de la enfermedad (Oropeza *et al.*, 2010).

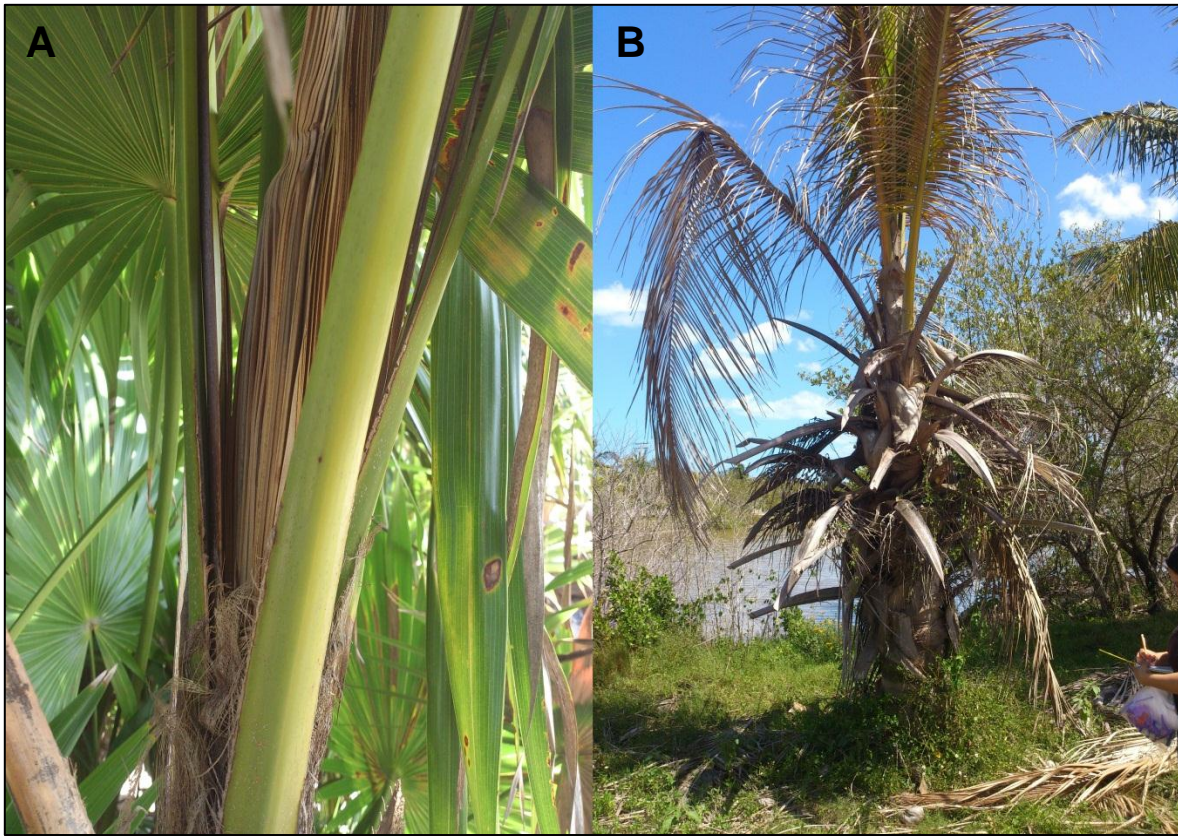
Debido a lo anterior, es importante conocer el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en la entidad de Yucatán, tanto en *C. nucifera* como en otras palmas importantes de la zona como *T. radiata*, *C. readii*, *S. mexicana*, *P. sargentii*, *A. merrillii* y *P. pacifica*, para poder estimar su persistencia en la región y con ello valorar el grado de riesgo que los distintos fitoplasmas del grupo del ALC representan para el cultivo de cocotero a nivel local. Con este fin, en el presente capítulo se realizaron muestreos de palmas con síntomas sugestivos de ALC, seguidos de análisis de detección de fitoplasmas por medio de PCR en tiempo real, para evaluar el estado actual de la incidencia de este grupo de enfermedades en las palmas del estado, el cual será complementado con los resultados presentados en los capítulos previos del presente trabajo.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Colecta de palmas sintomáticas: procedimiento y sitios de muestreo**

Se colectó material vegetal proveniente de hoja (la más joven posible), raquis, o tallo (dependiendo de la especie) de palmas con síntomas sugestivos de ALC y síndromes relacionados (Fig. 22) en distintos sitios del estado de Yucatán. Para extraer las muestras de tallo se empleó un taladro eléctrico y el método previamente descrito por Harrison *et al.* (2002b). En todos los casos se obtuvo como mínimo un gramo de tejido por individuo muestreado. Las muestras rotuladas fueron almacenadas en una hielera y transportadas al laboratorio para su posterior análisis.





**Figura 22.** Síntomas sugestivos de ALC y síndromes relacionados en las especies: A.- *T. radiata* (necrosis de la hoja espada) y B.- *C. nucifera* (caída de frutos, necrosis de inflorescencias, muerte de hojas viejas y pérdida de coloración de hojas nuevas). Fotografía del autor.

Los sitios de colecta fueron los siguientes: 1) los jardines del CICY, ubicado en la ciudad de Mérida, municipio homónimo; 2) fraccionamientos Francisco de Montejo y Real Montejo, también en Mérida; 3) localidad de Chicxulub Puerto ( $21^{\circ}17'38''\text{N } 89^{\circ}36'30''\text{O}$ ), municipio de Progreso; 4) localidad de Progreso de Castro ( $21^{\circ}16'58''\text{N } 89^{\circ}39'49''\text{O}$ ), municipio de Progreso; 5) poblado de Telchac Puerto ( $21^{\circ}20'26''\text{N } 89^{\circ}15'47''\text{O}$ ), municipio homónimo; 6) poblado de San Crisanto ( $21^{\circ}21'08''\text{N } 89^{\circ}10'18''\text{O}$ ), municipio de Sinanché; 7) localidad de Chabihau ( $21^{\circ}21'25''\text{N } 89^{\circ}07'05''\text{O}$ ), municipio de Yobaín; 8) localidad de Chelem ( $21^{\circ}16'00''\text{N } 89^{\circ}45'00''\text{O}$ ), municipio de Progreso; 9) ciudad de Ticul ( $20^{\circ}23'43''\text{N } 89^{\circ}32'02''\text{O}$ ), municipio homónimo y 10) localidad de Muna ( $20^{\circ}29'\text{N } 89^{\circ}43'\text{O}$ ); municipio homónimo. Asimismo, un individuo de *C. nucifera* ubicado en la carretera Progreso-Telchac, a la altura del km 31.5 también fue muestreado.

#### **4.2.2 Extracción de ácidos nucleicos de las palmas colectadas y análisis de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC mediante PCR en tiempo real**

La extracción de ácidos nucleicos de todas las muestras se llevó a cabo empleando un protocolo basado en lo establecido por Doyle y Doyle (1990), pero utilizando, dependiendo del tipo de muestra, tejido proveniente de hoja, raquis o tallo, éste último sin fraccionar previo a la maceración (véanse apartados 2.2.3 para la preparación de reactivos y 3.2.1 para el procedimiento).

Los análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC por PCR en tiempo real fueron realizados siguiendo lo establecido por Cordova *et al.* (2014) y empleando los materiales, reactivos y cantidades previamente especificados (véase apartado 2.2.4, Capítulo II), luego de confirmar la presencia de DNA total para todas las palmas mediante análisis por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio (véase apartado 2.2.3 para las condiciones, reactivos y equipos empleados). Se emplearon controles positivos y negativos para todas las reacciones realizadas, los cuales consistieron en el uso de 2 µL de DNA extraído de palmas previamente caracterizadas como positivas a la infección por fitoplasmas del grupo del ALC y la misma cantidad de agua ultra pura, respectivamente.

### **4.3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Colecta del material vegetal de las palmas sintomáticas**

El total de muestras obtenidas, las especies de palmas colectadas, los sitios y la fecha de muestreo de los individuos incluidos en el presente estudio se muestran en el cuadro 13. Cabe mencionar que las localidades de Celestún, Chuburná Puerto, Dzilam de Bravo, Santa Clara y Sisal también fueron visitadas pero la presencia de palmas sintomáticas no fue detectada.

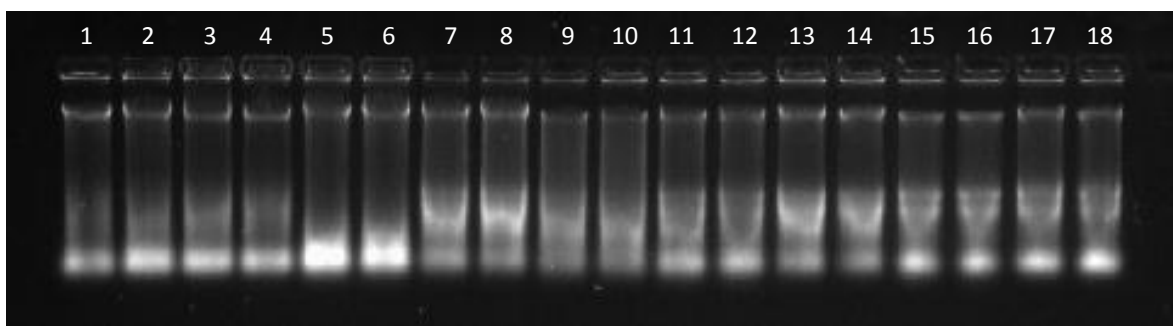
**Cuadro 13.** Datos de colecta de los individuos muestreados para la evaluación de la incidencia actual del ALC y síndromes relacionados en las palmas del estado de Yucatán.

Sitio de colecta	Fecha de muestreo	Palmas colectadas
Chicxulub Puerto	24 de febrero de 2015	<i>T. radiata</i> , seis ejemplares. <i>C. nucifera</i> , un ejemplar.
Jardines del CICY	6 de marzo de 2015	<i>T. radiata</i> , dos ejemplares.
San Crisanto	6 y 18 de marzo de 2015	<i>C. nucifera</i> , tres ejemplares.
Chabihau	20 de marzo de 2015	<i>C. nucifera</i> , cinco ejemplares.
Telchac Puerto	25 de marzo de 2015	<i>C. nucifera</i> , ocho ejemplares.
Carretera Progreso-Telchac	25 de marzo de 2015	<i>C. nucifera</i> , un ejemplar.
Chelem	1 de abril de 2015	<i>C. nucifera</i> , dos ejemplares.
Progreso de Castro	15 de abril de 2015	<i>C. nucifera</i> , dos ejemplares.
Fracc. Real Montejo	24 de abril de 2015	<i>Caryota</i> sp., tres ejemplares. <i>Washingtonia</i> sp., dos ejemplares.
Fracc. Francisco de Montejo	24 y 27 de abril de 2015	<i>A. merrillii</i> , cuatro ejemplares.
Ticul	20 de mayo de 2015	<i>C. nucifera</i> , un ejemplar.
Muna	20 de mayo de 2015	<i>C. nucifera</i> , un ejemplar.

Como puede observarse en el cuadro, se tomaron muestras de 24 individuos de la especie *C. nucifera*, ocho de *T. radiata*, cuatro de *A. merrillii*, tres de *Caryota* sp. y dos de *Washingtonia* sp., para un total de 41 individuos.

#### 4.3.2 Detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en las palmas muestreadas por reacciones de PCR en tiempo real

El DNA purificado de los 41 individuos muestreados se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. La figura 23 muestra las bandas de DNA total obtenidas para las palmas colectadas en los fraccionamientos Real Montejo y Francisco de Montejo, en la ciudad de Mérida. Se observaron bandas para las 41 palmas incluidas en el experimento, lo que permitió emplear dichas muestras para las pruebas de detección de fitoplasmas del grupo del ALC mediante PCR en tiempo real.



**Figura 23.** Visualización de DNA de palmas de distintas especies en gel de agarosa al 1% - TAE 1X. DNA total obtenido de las palmas colectadas en los fraccionamientos Real Montejo y Francisco de Montejo, en la ciudad de Mérida. Carriles 1-2, 3-4, 5-6: DNA (con réplica) de las tres palmas *Caryota* sp.; carriles 7-8, 9-10, 11-12, 13-14: DNA (con réplica) de las cuatro palmas *A. merrillii*; carriles 15-16, 17-18: DNA (con réplica) de las dos palmas *Washingtonia* sp.

Los resultados de las pruebas de detección de DNA de fitoplasmas por PCR en tiempo real realizadas a todas las palmas muestreadas se presentan en el cuadro 14.

**Cuadro 14.** Resultados obtenidos de las reacciones de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC en las palmas sintomáticas que fueron muestreadas en distintos puntos del estado.

Sitio de colecta	Palma analizada	Detección con la sonda 503LY16S
<b>Chicxulub Puerto</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	+
	<i>T. radiata</i> (1)	-
	<i>T. radiata</i> (2)	-
	<i>T. radiata</i> (3)	+
	<i>T. radiata</i> (4)	-
	<i>T. radiata</i> (5)	-
	<i>T. radiata</i> (6)	+
<b>Jardines del CICY</b>	<i>T. radiata</i> (1)	-
	<i>T. radiata</i> (2)	-
<b>San Crisanto</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	+
	<i>C. nucifera</i> (2)	+
	<i>C. nucifera</i> (3)	+
<b>Chabihau</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	+
	<i>C. nucifera</i> (2)	+
	<i>C. nucifera</i> (3)	+
	<i>C. nucifera</i> (4)	+
	<i>C. nucifera</i> (5)	+
<b>Telchac Puerto</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	+
	<i>C. nucifera</i> (2)	+
	<i>C. nucifera</i> (3)	+
	<i>C. nucifera</i> (4)	+
	<i>C. nucifera</i> (5)	-
	<i>C. nucifera</i> (6)	+
	<i>C. nucifera</i> (7)	+
	<i>C. nucifera</i> (8)	+
<b>Carretera Progreso-Telchac</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	+
<b>Chelem</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	-
	<i>C. nucifera</i> (2)	-
<b>Progreso de Castro</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	-
	<i>C. nucifera</i> (2)	+
<b>Fracc. Real Montejo</b>	<i>Caryota</i> sp. (1)	-
	<i>Caryota</i> sp. (2)	-
	<i>Caryota</i> sp. (3)	-
	<i>Washingtonia</i> sp. (1)	-
	<i>Washingtonia</i> sp. (2)	-
<b>Fracc. Fco. de Montejo</b>	<i>A. merrillii</i> (1)	-
	<i>A. merrillii</i> (2)	-
	<i>A. merrillii</i> (3)	-
	<i>A. merrillii</i> (4)	-
<b>Ticul</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	-
<b>Muna</b>	<i>C. nucifera</i> (1)	-

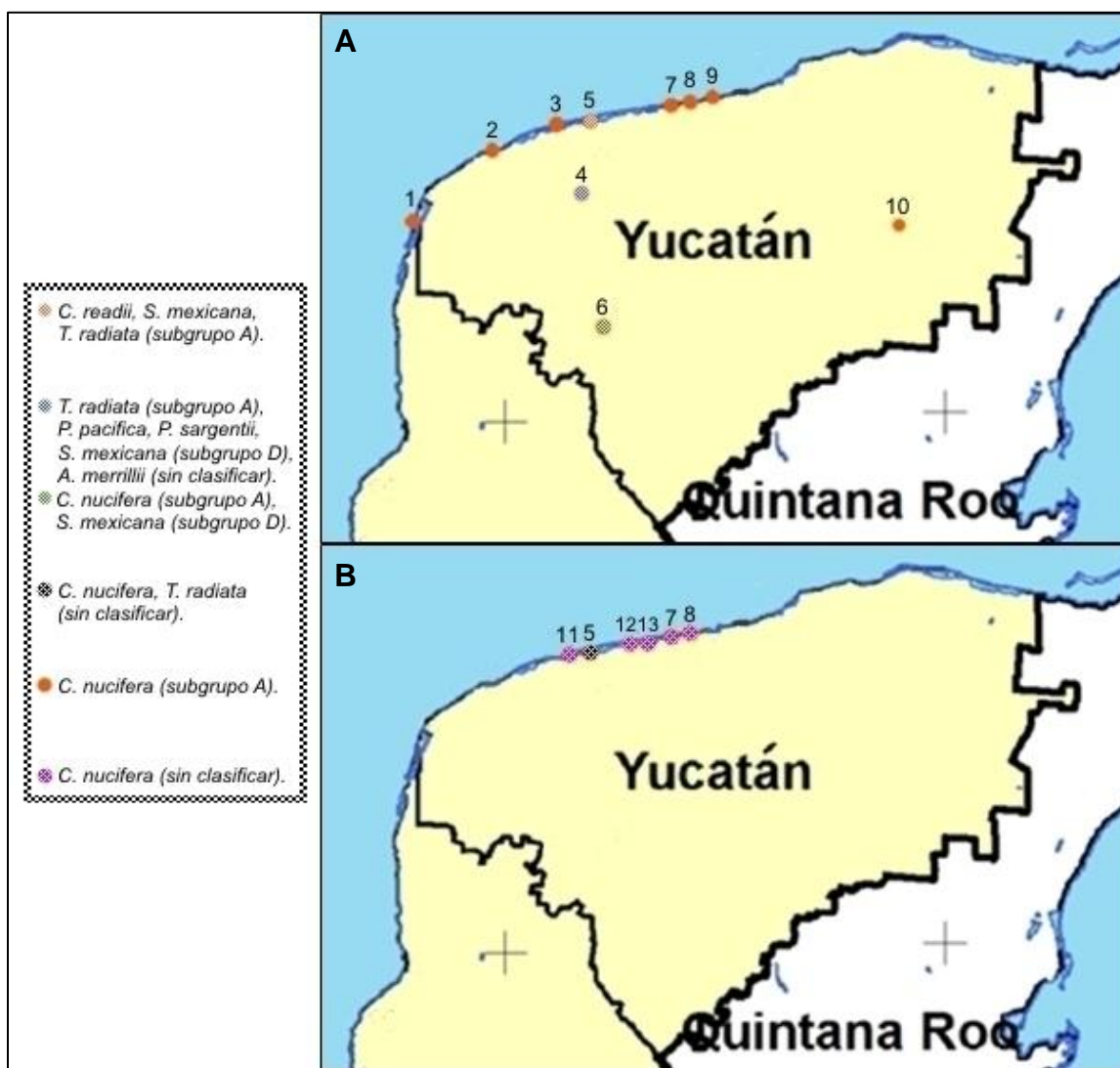
En el caso del estudio presente, se consideraron como positivas aquellas muestras que exhibieron un Ct (*Cycle threshold*, en inglés) menor a 30. De este modo, se obtuvieron 18 muestras positivas para *C. nucifera*, de un total de 24 y dos para *T. radiata*, de un total de ocho. Muestras con Cts mayores a este valor fueron consideradas como negativas, entre las cuales se cuentan cinco *C. nucifera*, seis *T. radiata*, y el resto de las especies de palmas analizadas (véase Anexo 1 para los valores de Ct obtenidos para todas las muestras). Cabe mencionar que los controles positivos y negativos empleados en todas las reacciones se comportaron de la manera esperada (Cts entre 21 y 25 para los positivos y mayores a 32 para los negativos).

El cuadro 15 muestra los cambios observados en el número de casos positivos y sintomáticos de ALC detectados en los distintos sitios del estado muestreados tanto en la década pasada como en la actualidad para la especie *C. nucifera*, en comparación con lo reportado en el cuadro 12.

**Cuadro 15.** Casos positivos y sintomáticos de ALC en palmas de *C. nucifera* muestreadas en distintos sitios del estado de Yucatán, durante el periodo 2005-2009 y el año 2015, respectivamente.

Sitio	Palmas positivas/Palmas sintomáticas	
	Periodo 2005-2009	Año 2015 (presente trabajo)
<b>Carretera Progreso-Telchac</b>	Sin datos de colecta	1/1
<b>Celestún</b>	3/15	Sin palmas sintomáticas
<b>Chabihau</b>	2/5	5/5
<b>Chelem</b>	2/5	0/2
<b>Chicxulub Puerto</b>	Sin datos de colecta	1/1
<b>Chuburná Puerto</b>	Sin datos de colecta	Sin palmas sintomáticas
<b>Dzilam de Bravo</b>	0/4	Sin palmas sintomáticas
<b>Muna</b>	Sin datos de colecta	0/1
<b>Progreso de Castro</b>	Sin datos de colecta	1/2
<b>San Crisanto</b>	4/39	3/3
<b>Santa Clara</b>	3/5	Sin palmas sintomáticas
<b>Sisal</b>	5/10	Sin palmas sintomáticas
<b>Telchac Puerto</b>	Sin datos de colecta	7/8
<b>Temozón</b>	1/5	Sitio no visitado
<b>Ticul</b>	3/5	0/1
<b>Total</b>	<b>23/93</b>	<b>18/24</b>

La figura 24 muestra a nivel geográfico los distintos sitios en el estado en los que se determinó la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en palmas sintomáticas de diferentes especies, tanto en fechas actuales como durante el periodo 2005-2013.



**Figura 24.** Sitios del estado de Yucatán en los que se determinó la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en palmas sintomáticas de distintas especies durante el periodo: A.- 2005-2013 y B.- 2015 (palmas analizadas en el presente trabajo). Dichas palmas fueron muestreadas en: 1.- Celestún, 2.- Sisal, 3.- Chelem, 4.- Mérida, 5.- Chicxulub Puerto, 6.- Ticul, 7.- San Crisanto, 8.- Chabihau, 9.- Santa Clara, 10.- Temozón, 11.- Progreso de Castro, 12.- Carretera Progreso-Telchac km 31.5, 13.- Telchac Puerto (véanse Cuadro 12 y apartado 4.1.3 para fechas de muestreo y referencias de la sección A).

#### 4.4 DISCUSIÓN

De acuerdo a lo presentado en el cuadro 14, en el presente estudio, 20 palmas (18 de *C. nucifera* y dos de *T. radiata*) del total de 41 que fueron muestreadas dieron positivas a la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en sus tejidos. Debido a lo anterior, es



posible determinar ciertos cambios en el número de casos positivos y sintomáticos de ALC en varias localidades del estado para la especie *C. nucifera*, en comparación con los números reportados durante el periodo de 2005-2009 (véanse Cuadro 15 y Fig. 24). En el caso de la localidad de Chabihau, existió un incremento de casos positivos, detectándose dos individuos en el 2009, en comparación con los cinco reportados en el presente estudio. Caso contrario en las localidades de Ticul y Chelem, las cuales reportaron tres y dos individuos, respectivamente, durante el periodo de 2006-2009, y ninguno en fechas actuales. Asimismo, Celestún, Sisal y Santa Clara registraron tres, cinco y tres casos positivos, respectivamente, durante el mismo periodo, mientras que en fechas actuales no se detectó la presencia de palmas sintomáticas en ninguno de estos sitios. En cambio, estos números no parecen haberse modificado en Dzilam de Bravo, ya que ningún caso de ALC fue reportado en ambos periodos para dicha localidad. En San Crisanto se tienen cuatro palmas positivas en 2008 y tres en la actualidad, no obstante, como ya se mencionó anteriormente (véase apartado 4.1.3), en esta localidad fue establecida en 1991 una plantación experimental de *C. nucifera* llamada “Guadalupe” con el propósito de evaluar los niveles de susceptibilidad ante el ALC de las distintas variedades de germoplasma presentes en el país. En dicha plantación se reportaron múltiples casos de ALC en los cocoteros que fueron evaluados, principalmente durante los primeros cinco años después del comienzo del ensayo, reportándose el último caso en 2003 (Zizumbo *et al.*, 2008); sin embargo, en la actualidad se han detectado nuevos casos de ALC en cocoteros que pertenecen a otra plantación experimental llamada “Caridad del Cobre” establecida por investigadores del CICY también en San Crisanto (datos no publicados), hecho que sugiere un nivel de incidencia alto y constante de esta enfermedad en las palmas de dicha localidad incluso en fechas recientes, debido principalmente al uso de material susceptible al ALC en ambas plantaciones para fines propios de los experimentos realizados.

Aunque la localidad de Telchac Puerto no fue incluida en dicha evaluación realizada en fechas pasadas, en la actualidad fueron detectados 7 ejemplares de *C. nucifera* infectados con fitoplasmas del grupo del ALC, la mayor cantidad para cualquiera de los sitios de colecta incluidos en la realización del presente trabajo. Cabe mencionar que todas las palmas muestreadas pertenecientes a dicha localidad se encontraban en cercanía unas con otras, siendo parte de un mismo terreno, lo que sugiere la posibilidad

de que se trate de una resiembra realizada por los habitantes de la zona en la cual se empleó material susceptible al ALC, ya que no se encontraron cocoteros sintomáticos fuera del terreno mencionado.

Igualmente, los trabajos realizados por Narvaez *et al.* (2006) y Nic-Matos (2007) reportaron brotes de enfermedades causadas por fitoplasmas del grupo del ALC en la especie *T. radiata* en la localidad de Chicxulub Puerto. En la presente evaluación, la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC fue detectada en dos individuos de *T. radiata* (y un *C. nucifera*), esto representa una clara disminución en el número de casos positivos de este grupo de enfermedades para dicho sitio, ya que Narvaez *et al.* reportaron cinco casos (además de ocho para la especie *C. readii*). Cabe mencionar que esta disminución concuerda con lo reportado en el mismo sitio para el insecto *H. crudus* (véase Capítulo II), el cual también mostró una disminución en el porcentaje de insectos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en la población silvestre.

Vázquez-Euán *et al.* (2011) y Mota-Narvaez (2015) también reportaron brotes de este grupo de enfermedades en otras especies de palmas además de *C. nucifera*. Los primeros detectaron fitoplasmas del grupo del ALC en individuos de *S. mexicana* y *P. sargentii*, mientras que el segundo hizo lo mismo para *A. merrillii*. Como puede observarse en el cuadro 14, ninguno de los ejemplares muestreados de *A. merrillii* incluidos en el presente trabajo resultó positivo a la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC en las reacciones de detección realizadas, en comparación con los 28 reportados por Mota-Narvaez (colectados durante 2012-2013), lo que representa una clara disminución en la incidencia del ALC y síndromes relacionados para dicha especie en la ciudad de Mérida. Asimismo, no se observaron palmas sintomáticas de las especies *S. mexicana* y *P. sargentii* durante la realización del presente estudio, lo que también sugiere una disminución en los niveles de incidencia de este grupo de enfermedades para las especies mencionadas.

Finalmente, en el sitio de jardines del CICY no pudieron detectarse casos positivos de ALC y síndromes relacionados en ninguna especie de palma, lo que también concuerda con lo observado para el insecto *H. crudus* (véase capítulo II) y la palma *P. pacifica* (véase capítulo III), en comparación con los altos niveles de incidencia reportados previamente tanto en palmas como en insectos por Sánchez-Borges (2014), Vázquez-

Euán *et al.* (2011), Vázquez-Euán (2010) y Nic-Matos (2007) (véanse también Cuadro 6, Capítulo II y apartado 3.1.3, Capítulo III).

En conclusión, las enfermedades causadas por los fitoplasmas del grupo del ALC siguen estando activas en algunos sitios del estado de Yucatán, y, por lo tanto, representan un riesgo moderado para el cultivo de cocotero a nivel local (mismo que puede reducirse e incluso evitarse siguiendo las medidas recomendadas de prevención y manejo del ALC en plantaciones de cocotero), además de afectar a muchas otras especies de palmas con valor ornamental y cultural. No obstante, resulta evidente que desde la aparición del ALC en la Península de Yucatán, hace más de 35 años (Oropeza y Zizumbo, 1997), y la inicial destrucción del material vegetal nativo, considerado como altamente susceptible (Zizumbo *et al.*, 1999), los niveles de incidencia de esta enfermedad, junto con aquellas causadas por otros fitoplasmas del grupo del ALC, han tendido a disminuir en la región, con excepción de algunas pocas localidades. El estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de la entidad muestra una disminución a nivel general y una baja en el número de casos positivos de esta enfermedad en las localidades de Ticul, Chelem, Celestún, Sisal, Santa Clara, Chicxulub Puerto y la ciudad de Mérida, permaneciendo constante en San Crisanto y aumentando en las poblaciones de Chabihau y Telchac Puerto, aunque debido a lo observado durante el muestreo en estas últimas localidades, este presunto aumento parece ser más consecuencia de resiembras recientes en las que se utilizó material susceptible y no de brotes con mayor grado de virulencia que puedan amenazar al resto de los cocoteroceros locales, predominantemente resistentes al ALC. Finalmente, debido a que aún existen muchos aspectos sobre la epidemiología del ALC y sus síndromes relacionados que todavía no son comprendidos, como la posible existencia de vectores alternos, hospederos asintomáticos, los niveles de susceptibilidad y de resistencia de algunas de las especies de palmas afectadas, etcétera, esta aparente disminución no representa un motivo para reducir los esfuerzos actuales en materia de combate y prevención de este grupo de enfermedades a nivel local y nacional, ya que aún en fechas recientes se han descubierto casos positivos de ALC en palmas en las que la enfermedad no había sido reportada anteriormente, como los casos de *R. regia* y *A. aculeata* (Narvaez *et al.*, 2015), además de que también existen reportes de pérdidas de material en plantaciones de cocotero de variedades previamente caracterizadas como resistentes al

ALC (Lebrun *et al.*, 2008; Broschat *et al.*, 2002), aunque la evidencia más reciente apunta a la contaminación genética sufrida por estas variedades como una de las causas detonantes de esta pérdida de resistencia (Baudouin *et al.*, 2008). Igualmente, es importante mencionar la existencia de otros subgrupos de fitoplasmas que también afectan a *C. nucifera* tanto en Asia como en África (véase Cuadro 3, Capítulo I), ya que se ha demostrado que poseen relaciones filogenéticas con los subgrupos presentes en América (Harrison *et al.*, 2014) y, por lo tanto, representan una amenaza latente para las plantaciones nativas del continente; en este contexto, la búsqueda de germoplasma resistente a distintas cepas de fitoplasmas, tanto americanas como africanas y/o asiáticas, toma especial relevancia. Es por ello que el constante monitoreo de los niveles de incidencia del ALC y síndromes relacionados constituye una parte indispensable de los esfuerzos actuales en materia de combate y prevención de este grupo de enfermedades a nivel local y nacional.

---

## 4.5 REFERENCIAS

- Baudouin, L., Lebrun, P., Berger, A., Myrie, W., Been, B., Dollet, M. (2008). The Panama Tall and the Maypan hybrid coconut in Jamaica: did genetic contamination cause a loss of resistance to lethal yellowing? *Euphytica*. 161(3), 353-360.
- Broschat, T.K., Harrison, N.A., Donselman, H. (2002). Losses to lethal yellowing cast doubt on coconut cultivar resistance. *Palms*. 46(4), 185-189.
- Bruner, S.C., Boucle, L. (1943). La enfermedad conocida por “podrición del cogollo del cocotero en Cuba”. *Rev. Agric. (La Habana)*. 26, 132-141.
- Cardeña, R., Villanueva, M.A., Santamaría J.M., Oropeza, C. (1991). Presence in Yucatan of mycoplasma-like organisms in *Cocos nucifera* palms showing lethal yellowing disease symptoms. *Can. J. Plant Pathol.* 13, 135-138.
- Carter, W. (1964). Present status of research on lethal yellowing disease of coconut palm in Jamaica. *FAO Plant Protect. Bull.* 12, 67-69.
- Corbett, M.K. (1959). Diseases of the coconut palm. I. Lethal yellowing or unknown disease. *Principles*. 3, 6-13.
- Cordova, I., Oropeza, C., Puch-Hau, C., Harrison, N.A., Collí-Rodríguez, A., Narvaez, M., Nic-Matos, G., Reyes, C., Sáenz, L. (2014). A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16srIV subgroups A, D and E found in the Americas. *J. Plant Pathol.* 96(2), 343-352.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*. 12, 13-15.
- Fawcett, W. (1891). Report on the coconut disease at Montego Bay. *Bull. Bot. Dep. Jamaica*. 23, 2.
- Harrison, N.A., Davis, R.E., Oropeza, C., Helmick, E. E., Narvaez, M., Eden-Green, S., Dollet, M., Dickinson, M. (2014). “*Candidatus* Phytoplasma palmicola”, associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1890-1899.

- Harrison, N.A., Narvaez, M., Almeyda, H., Cordova, I., Carpio, M.L., Oropeza, C. (2002a). First report of grupo 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *New Dis. Rep.* 51, 808.
- Harrison, N.A., Oropeza, C. (2008). Coconut lethal yellowing. En: Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas (N.A. Harrison, G.P. Rao, C. Marcone, Eds.). Studium Press LLC. Houston, USA. 422pp.
- Harrison, N.A., Womack, M., Carpio, M.L. (2002b). Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis.* 86(6), 676-681.
- Howard, F.W., Norris, R.C., Thomas, D.L. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera, Cixiidae). *Trop. Agr. (Trinidad)*. 60(3), 168-171.
- Howard, F.W., Williams, D.S., Norris, R.C. (1984). Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int. J. Entomol.* 26(4), 331-338.
- Lebrun, P., Baudouin, L., Myrie, W., Berger, A., Dollet, M. (2008). Recent lethal yellowing outbreak: why is the Malayan Yellow Dwarf coconut no longer resistant in Jamaica? *Tree Genet. Genomes.* 4, 125-131.
- McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt, L., Collins, M.E. (1983). Lethal yellowing of palms. *U. Fla. AES Bull.* 834, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, Florida, USA.
- McCoy, R.E., Norris, R.C., Vieyra, G., Delgado, S. (1982). Mexico: Lethal yellowing disease of coconut palms. *FAO Plant Protect. Bull.* 30, 79-80.
- Mota-Narvaez, L. (2015). *Detección e identificación de fitoplasmas en palmas kerpis (Adonidia merrillii L.) con síntomas asociados al Amarillamiento Letal del Cocotero en Mérida, Yucatán*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México.

- Myrie, W.A., Douglas, L., Harrison, N.A., McLaughlin, W., James, M. (2012). First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16SrIV, a phytoplasma on St. Kitts in the Lesser Antilles. *New Dis. Rep.* 26, 25.
- Narvaez, M., Cordova, I., Orellana, R., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2006). First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Plant Pathol.* 55, 292.
- Narvaez, M., Cordova, I., Reyes, C., Puch-Hau, C., Mota-Narvaez, L., Collí-Rodríguez, A., Caamal, G., Harrison, N.A., Sáenz, L., Oropeza, C. (2015). Occurrence of 16SrIV subgroup A phytoplasmas in *Roystonea regia* and *Acrocomia mexicana* palms with Lethal Yellowing-like syndromes in Yucatán, Mexico. *J. Phytopathol.* (En prensa). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12464/pdf> [Consulta: 15/01/2016].
- Nic-Matos, G. (2007). *Estudio sobre la sobrevivencia de Thrinax radiata al amarillamiento letal (AL)*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. México.
- Ntushelo, K., Harrison, N.A., Elliott, M.L. (2013). Palm phytoplasmas in the Caribbean Basin. *Palms.* 57(2), 93-100.
- Oropeza, C., Zizumbo, D. (1997). The history of lethal yellowing in Mexico. En: Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina Ghana, November 1995 (S.J. Eden-Green, F. Ofori, Eds.). Natural Resources Institute. Chatham, UK. 308 pp.
- Oropeza, S., Narvaez, M., Echegoyén-Ramos, P.E., Rodas, R. (2010). Plan de Contingencia Ante un Brote de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en un País de la Región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria- OIRSA. San Salvador, El Salvador. 149pp.
- Sánchez-Borges, R. (2014). *Evaluación de Haplaxius crudus como posible transmisor de fitoplasmas del grupo 16SrIV-A a la palma Pritchardia pacifica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

- Vázquez-Euán, R. (2010). *Detección y caracterización de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vázquez-Euán, R., Harrison, N.A, Narvaez, M., Oropeza, C. (2011). Occurrence of a 16SrIV group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *Plant Dis.* 95, 256-262.
- Zizumbo, D., Colunga-GarcíaMarín, P., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N., Oropeza, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genet. Resour. Newsl.* 156, 23-33.
- Zizumbo, D., Fernandez, M., Torres, N., Cardeña, R. (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. En: *Current Advances in Coconut Biotechnology* (C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña, J.M. Santamaría, Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Nederland. 440 pp.
- Zona, S. (1999). New perspectives on generic limits and relationships in the Ptychospermatinae (Palmae: Arecoideae). *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 83, 255-263.
- Zona, S., Francisco-Ortega, J., Jestrow, B., Baker, W.J., Lewis, C.E. (2011). Molecular phylogenetics of the palm subtribe Ptychospermatinae (Arecaceae). *Am. J. Bot.* 98(10), 1716-1726.



## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

#### 5.1 DISCUSIÓN GENERAL

Anteriormente, en la península de Yucatán, el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) trajo como consecuencia la inicial destrucción de gran parte de los cocoteros locales, en su mayoría del ecotipo Alto del Atlántico, altamente susceptible a esta enfermedad, lo que permitió que surgiera una situación epidémica que se dispersó a lo largo de dicha región. Como consecuencia se observó una alta incidencia de la enfermedad en las plantaciones de cocotero del estado de Yucatán. En algunas de las áreas afectadas por el ALC se iniciaron procesos de resiembra para sustituir las plantas que se perdieron con individuos del ecotipo Enano Malayo, con un mayor grado de resistencia ante la enfermedad, permaneciendo también poblaciones de Alto del Atlántico a lo largo del estado, así como cultivares híbridos (Zizumbo *et al.*, 1999). De este modo, un monitoreo realizado a lo largo de la década pasada en cocoteros de distintas localidades de la entidad reveló el estado de la incidencia del ALC en la región hasta la fecha (véase Cuadro 12, Capítulo IV), mismo que tendía a la baja en la mayoría de los sitios en comparación con años anteriores. Sin embargo, reportes recientes de brotes de enfermedades causadas por fitoplasmas del grupo del ALC en palmas del estado distintas a *Cocos nucifera* L. (Mota-Narvaez, 2015; Vázquez-Euán *et al.*, 2011; Nic-Matos, 2007; Narvaez *et al.*, 2006) mostraron que estos patógenos seguían estando presentes en el ambiente y que algunas de estas especies como *Thrinax radiata*, *Coccothrinax readii* y *Sabal mexicana* podrían actuar como reservorios naturales de estos patógenos.

En el presente estudio, inicialmente se buscó determinar el número de individuos infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres del insecto vector *Haplaxius crudus* Van Duzee con el fin de que éstas se emplearan para demostrar la capacidad del insecto de inocular fitoplasmas a un medio de alimentación artificial. El desarrollo de una metodología como tal constituiría un primer acercamiento hacia el cultivo *in vitro* del fitoplasma causante del ALC. No obstante, resultados preliminares mostraron una aparente reducción en el número de individuos infectados en poblaciones

silvestres de *H. crudus* previamente estudiadas, fenómeno que también sugería una disminución correspondiente en la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de dichos sitios.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el estado actual de la incidencia del ALC en el estado de Yucatán, investigándose la presencia de fitoplasmas del grupo del ALC tanto en palmas locales como en poblaciones silvestres de *H. crudus*. Igualmente, se realizó un bioensayo utilizando a *Pritchardia pacifica*, una especie de palma altamente susceptible al ALC, con el fin de observar su posible infección de manera natural con fitoplasmas del grupo del ALC y monitorear la presencia de estos patógenos en un ambiente determinado (los jardines del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY)).

A partir de los resultados obtenidos (véase Capítulo IV), se determinó que el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de la entidad muestra una disminución a nivel general y una baja en el número de casos positivos de esta enfermedad en las localidades de Ticul, Chelem, Celestún, Sisal, Santa Clara, Chicxulub Puerto y la ciudad de Mérida, en comparación con lo reportado en fechas anteriores. Caso distinto el de San Crisanto, sitio que hasta la fecha mantiene un alto nivel de incidencia tomando en cuenta lo reportado por Zizumbo *et al.* (2008) para años anteriores y los nuevos casos positivos de ALC detectados en cocoteros que forman parte de la plantación experimental llamada “Caridad del Cobre” establecida en dicho sitio (datos no publicados), además de los datos obtenidos durante la realización del presente trabajo. Finalmente, se reportó un aumento de casos positivos de ALC en las poblaciones de Chabihau y Telchac Puerto, aunque esto parece ser más consecuencia de resiembras recientes en las que se empleó material susceptible y no de brotes con mayor grado de virulencia que puedan amenazar al resto de los cocoteros locales, predominantemente resistentes al ALC. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos para los análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC realizados en poblaciones silvestres de *H. crudus* (véase Capítulo II), en las cuales no se detectaron individuos positivos en la localidad de Chicxulub Puerto ni en los jardines del CICY, en la ciudad de Mérida, en contraste con lo reportado en fechas anteriores por Sánchez-Borges (2014), Vázquez-Euán (2010) y Nic-Matos (2007) (véase también Cuadro 6, Capítulo II). Igualmente, las

palmas *P. pacifica* expuestas al ambiente de los jardines del CICY no se infectaron con fitoplasmas del grupo del ALC durante la duración del ensayo realizado (véase Capítulo III), lo que también sugiere una clara disminución en la incidencia de este grupo de enfermedades para dicho sitio en fechas recientes, en comparación con lo reportado para la especie en un experimento similar realizado en septiembre de 2012 (datos no publicados) (véase apartado 3.1.3, Capítulo III) y en ensayos de transmisión anteriores (Sánchez-Borges, 2014).

Considerando los resultados obtenidos de los tres diferentes enfoques utilizados en la realización del presente trabajo, los cuales concuerdan entre sí para los distintos sitios en los que fueron empleados, se puede asegurar que, en efecto, las enfermedades causadas por fitoplasmas del grupo del ALC siguen estando activas en el estado de Yucatán (véase Cuadro 14, Capítulo IV) y, por lo tanto, siguen representando un riesgo para el cultivo de cocotero a nivel local (mismo que puede reducirse e incluso evitarse siguiendo las medidas recomendadas de prevención y manejo del ALC en plantaciones de cocotero (Oropeza *et al.*, 2010)), además de afectar a muchas otras especies de palmas con valor ornamental y cultural. No obstante, resulta evidente que los niveles de incidencia de esta enfermedad, junto con aquellas causadas por otros fitoplasmas del mismo grupo, han tendido a disminuir en la región, con excepción de algunos focos menores ubicados en las localidades anteriormente mencionadas (véase Fig. 24, Capítulo IV). Dichos focos también han disminuido en número e intensidad con el paso del tiempo, además de que no han sido capaces de dispersar la enfermedad en territorios aledaños. Sin embargo, debido a que aún hay muchos aspectos sobre la epidemiología del ALC y sus síndromes relacionados que aún no son comprendidos, como la posible existencia de vectores alternos, hospederos asintomáticos, los niveles de susceptibilidad y de resistencia de algunas de las especies de palmas afectadas, etcétera, esta aparente disminución no representa un motivo para reducir los esfuerzos actuales en materia de combate y prevención de este grupo de enfermedades a nivel local y nacional, ya que, como se mencionó anteriormente, aún en fechas recientes se han descubierto casos positivos de ALC en palmas en las que la enfermedad no había sido reportada anteriormente, como son los casos de *T. radiata* y *C. readii* (Narvaez *et al.*, 2006), *S. mexicana* y *Pseudophoenix sargentii* (Vázquez-Euán *et al.*, 2011) y *Roystonea regia* y *Acrocomia aculeata* (Narvaez *et al.*, 2015), además de que también existen reportes de

pérdidas de material en plantaciones de cocotero de variedades previamente caracterizadas como resistentes al ALC (Lebrun *et al.*, 2008; Broschat *et al.*, 2002), aunque la evidencia más reciente apunta a la contaminación genética sufrida por estas variedades como una de las causas detonantes de esta pérdida de resistencia (Baudouin *et al.*, 2008). Igualmente, es importante mencionar la existencia de otros subgrupos de fitoplasmas que también afectan a *C. nucifera* tanto en Asia como en África (véase Cuadro 3, Capítulo I), ya que se ha demostrado que poseen relaciones filogenéticas con los subgrupos presentes en América (Harrison *et al.*, 2014) y, por lo tanto, representan una amenaza latente para las plantaciones nativas del continente; en este contexto, la búsqueda de germoplasma resistente a distintas cepas de fitoplasmas, tanto americanas como africanas y/o asiáticas, toma especial relevancia.

Aunque la incidencia de las enfermedades causadas por fitoplasmas del grupo del ALC es un aspecto difícil de evaluar con precisión debido principalmente al alto número de especies de palmas afectadas (muchas de ellas con sintomatologías que difieren entre sí y que a la vez pueden confundirse con otro tipo de padecimientos) y a los distintos subgrupos de fitoplasmas involucrados (algunos incluso llegando a requerir metodologías de detección distintas), actualmente se cuenta con la metodología necesaria para poder atender estas cuestiones, de modo que es preciso continuar y ahondar más en el entendimiento de las interacciones planta-patógeno-vector del ALC y cómo éstas se relacionan con el medio ambiente.

Es por ello que el constante monitoreo de los niveles de incidencia del ALC y síndromes relacionados, mismo enfoque que fue favorecido para la realización del presente trabajo, constituye una parte indispensable de los esfuerzos actuales en materia de combate, prevención y estudio de este grupo de enfermedades, actualmente realizados por instituciones como el CICY, el Colegio de Postgraduados (COLPOS) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a nivel local y nacional, además de los efectuados a nivel internacional por muchas otras instituciones: véanse las investigaciones realizadas en *H. crudus* por Powell *et al.* (2015) y Osorno (2013); la detección de fitoplasmas del ALC en embriones de cocotero por Cordova *et al.* (2003); la nueva metodología de detección para fitoplasmas propuesta por Cordova *et al.* (2014); los estudios recientes sobre fitoplasmas de África y Asia realizados

por Bila *et al.* (2015), Harrison *et al.* (2014) y Nejat *et al.* (2009), entre otros; las búsquedas de nuevas plantas hospederas y vectores alternos de fitoplasmas del ALC elaboradas por Terán-Villanueva (2014), Brown y McLaughlin (2011) y Brown *et al.* (2006), por mencionar algunos; los estudios referentes a evaluaciones de variedades de *C. nucifera* resistentes al ALC por Baudouin *et al.* (2009), Zizumbo *et al.* (2008) y Baudouin *et al.* (2008); el plan de contingencia ante un brote del ALC detallado por Oropeza *et al.* (2010); y, finalmente, los ensayos de transmisión en jaulas realizados por Sánchez-Borges (2014). Estas y muchas otras valiosas contribuciones están enfocadas al mejor entendimiento de los componentes del patosistema del ALC y su relación con el medio ambiente, de modo que en el futuro se disponga de herramientas más eficaces para el combate de esta importante enfermedad.

## 5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ El estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en las palmas de Yucatán muestra una disminución a nivel general y una baja en el número de casos positivos de esta enfermedad en las localidades de Ticul, Chelem, Celestún, Sisal, Santa Clara, Chicxulub Puerto y la ciudad de Mérida, permaneciendo constante solamente en San Crisanto (sitio que hasta la fecha mantiene una alta incidencia) y aumentando en las poblaciones de Chabihau y Telchac Puerto (aunque este aumento parece ser consecuencia de resiembras recientes de material susceptible), en comparación con los casos reportados en fechas anteriores. Aunque todavía existen algunos focos menores de ALC en la entidad, éstos también han disminuido en número e intensidad con el paso del tiempo, además de que no han sido capaces de dispersar la enfermedad en territorios aledaños.
- ❖ No se detectaron insectos *H. crudus* infectados con fitoplasmas del grupo del ALC en los sitios de Chicxulub Puerto y jardines del CICY, lo que también sugiere una disminución del inóculo de estos patógenos presente en el ambiente de dichos sitios, en comparación con reportes previos.
- ❖ Las palmas *P. pacifica* expuestas al ambiente de los jardines del CICY no se infectaron con fitoplasmas del grupo del ALC durante la duración del ensayo

realizado, lo que igualmente sugiere una disminución en la presencia de insectos vectores infectados con estos patógenos para dicho sitio.

### 5.3 PERSPECTIVAS

- ❖ El constante monitoreo de los niveles de incidencia del ALC y síndromes relacionados en palmas de distintas especies como herramienta para evaluar el grado de riesgo que dichas enfermedades representan para el cultivo de cocotero y como complemento de los programas sólidos ya existentes en materia de combate y prevención de este grupo de enfermedades, como el propuesto por Oropeza *et al.* (2010).
- ❖ Realizar análisis de detección de fitoplasmas del grupo del ALC en poblaciones silvestres de *H. crudus* empleando mayores tamaños de muestra, tanto en los sitios utilizados en el presente trabajo como en otras zonas del estado y del país. Igualmente, realizar estos muestreos a lo largo del año, con el fin de determinar si existen variaciones estacionales en el porcentaje de infección por fitoplasmas del grupo del ALC en el insecto *H. crudus*.
- ❖ Emplear individuos de la especie *P. pacifica* para llevar a cabo ensayos de exposición natural en un sitio con alta incidencia (Telchac Puerto, Chicxulub Puerto, San Crisanto o Chabihau), con el fin de obtener palmas jóvenes enfermas que puedan utilizarse para la realización de futuros experimentos de adquisición de fitoplasmas del grupo del ALC en insectos *H. crudus* mantenidos en laboratorio, y que esto constituya un primer acercamiento hacia el cultivo *in vitro* del fitoplasma causante del ALC.
- ❖ Continuar con los estudios enfocados a mejorar el conocimiento de las interacciones planta-patógeno-vector del ALC y su relación con el medio ambiente, así como con el desarrollo de nuevas técnicas que faciliten el entendimiento de aspectos poco comprendidos sobre la epidemiología de esta enfermedad.
- ❖ Complementar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los que se están realizando a nivel nacional para determinar el estado actual de la incidencia del ALC y síndromes relacionados en México.

---

## 5.4 REFERENCIAS

- Baudouin, L., Lebrun, P., Berger, A., Myrie, W., Been, B., Dollet, M. (2008). The Panama Tall and the Maypan hybrid coconut in Jamaica: did genetic contamination cause a loss of resistance to lethal yellowing? *Euphytica*. 161(3), 353-360.
- Baudouin, L., Philippe, R., Quaicoe, R., Dery, S., Dollet, M. (2009). General overview of genetic research and experimentation on coconut varieties tolerant/resistant to Lethal Yellowing. *OCL*. 16(2), 127-131.
- Bila, J., Mondjana, A., Samils, B., Högberg, N. (2015). High diversity, expanding populations, and purifying selection in phytoplasmas causing lethal yellowing in Mozambique. *Plant Pathol.* 64, 597, 604.
- Broschat, T.K., Harrison, N.A., Donselman, H. (2002). Losses to lethal yellowing cast doubt on coconut cultivar resistance. *Palms*. 46(4), 185-189.
- Brown, S.E., Been, B.O., McLaughlin, W.A. (2006). Detection and variability of the lethal yellowing group 16SrIV phytoplasmas in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Ann. Appl. Biol.* 149, 53-62.
- Brown, S.E., McLaughlin, W.A. (2011). Identification of lethal yellowing group (16SrIV) of phytoplasmas in the weeds *Stachytarpheta jamaicensis*, *Macroptilium lathyroides*, and *Cleome ruidosperma* in Jamaica. *Phytopathogenic Mollicutes*. 1(1), 27-34.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2003). *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.* 4(2), 99-108.
- Cordova, I., Oropeza, C., Puch-Hau, C., Harrison, N.A., Collí-Rodríguez, A., Narvaez, M., Nic-Matos, G., Reyes, C., Sáenz, L. (2014). A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16srIV subgroups A, D and E found in the Americas. *J. Plant Pathol.* 96(2), 343-352.
- Harrison, N.A., Davis, R.E., Oropeza, C., Helmick, E. E., Narvaez, M., Eden-Green, S., Dollet, M., Dickinson, M. (2014). “*Candidatus* Phytoplasma palmicola”, associated

with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1890-1899.

Howard, F.W., Norris, R.C., Thomas, D.L. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera, Cixiidae). *Trop. Agr. (Trinidad)*. 60(3), 168-171.

Howard, F.W., Williams, D.S., Norris, R.C. (1984). Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int. J. Entomol.* 26(4), 331-338.

Lebrun, P., Baudouin, L., Myrie, W., Berger, A., Dollet, M. (2008). Recent lethal yellowing outbreak: why is the Malayan Yellow Dwarf coconut no longer resistant in Jamaica? *Tree Genet. Genomes.* 4, 125-131.

Mota-Narvaez, L. (2015). *Detección e identificación de fitoplasmas en palmas kerpis (Adonidia merrillii L.) con síntomas asociados al Amarillamiento Letal del Cocotero en Mérida, Yucatán*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México.

Narvaez, M., Cordova, I., Orellana, R., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2006). First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Plant Pathol.* 55, 292.

Narvaez, M., Cordova, I., Reyes, C., Puch-Hau, C., Mota-Narvaez, L., Collí-Rodríguez, A., Caamal, G., Harrison, N.A., Sáenz, L., Oropeza, C. (2015). Occurrence of 16SrIV subgroup A phytoplasmas in *Roystonea regia* and *Acrocomia mexicana* palms with Lethal Yellowing-like syndromes in Yucatán, Mexico. *J. Phytopathol.* (En prensa). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12464/pdf> [Consulta: 15/01/2016].

Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S.N.A., Vadamalai, G., Dickinson, M. (2009). Phytoplasmas associated with disease of coconut in Malaysia: phylogenetic groups and host plant species. *Plant Pathol.* 58, 1152–1160.

Nic-Matos, G. (2007). *Estudio sobre la sobrevivencia de Thrinax radiata al amarillamiento letal (AL)*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. México.



- Oropeza, S., Narvaez, M., Echegoyén-Ramos, P.E., Rodas, R. (2010). Plan de Contingencia Ante un Brote de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en un País de la Región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria- OIRSA. San Salvador, El Salvador. 149pp.
- Osorno, Y.Y. (2013). *Evaluación del efecto de lectinas en insectos Haplaxius (Myndus) crudus Van Duzee*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Powell, C.M., Hail, D., Potocnjak, J., Hanson, J.D., Halbert, S.H., Bextine, B.R. (2015). Bacterial community composition of three candidate insect vectors of palm phytoplasma (Texas Phoenix Palm Decline and Lethal Yellowing). *Curr. Microbiol.* 70, 240-245.
- Sánchez-Borges, R. (2014). *Evaluación de Haplaxius crudus como posible transmisor de fitoplasmas del grupo 16SrIV-A a la palma Pritchardia pacifica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Terán-Villanueva, N. (2014). *Importancia de las arvenses en la dispersión del Amarillamiento Letal del Cocotero*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México.
- Vázquez-Euán, R. (2010). *Detección y caracterización de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vázquez-Euán, R., Harrison, N.A, Narvaez, M., Oropeza, C. (2011). Occurrence of a 16SrIV group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *Plant Dis.* 95, 256-262.
- Zizumbo, D., Colunga-GarcíaMarín, P., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N., Oropeza, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genet. Resour. Newsl.* 156, 23-33.
- Zizumbo, D., Fernandez, M., Torres, N., Cardeña, R. (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. En: Current Advances in Coconut Biotechnology

(C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardaña, J.M. Santamaría, Eds.).  
Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Nederland. 440 pp.

## ANEXO

**Anexo 1.** Valores de Ct obtenidos de las reacciones de detección de DNA de fitoplasmas del grupo del ALC por PCR en tiempo real en las palmas que fueron analizadas en el presente trabajo.

Sitio de colecta	Palma analizada	Ct* obtenido (sonda 503LY16S)	Sitio de colecta	Palma analizada	Ct* obtenido (sonda 503LY16S)
Chicxulub Puerto	<i>C. nucifera</i> (1)	22.32	Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (5)	32.98
Chicxulub Puerto	<i>T. radiata</i> (1)	36.50	Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (6)	28.31
Chicxulub Puerto	<i>T. radiata</i> (2)	36.22	Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (7)	25.20
Chicxulub Puerto	<i>T. radiata</i> (3)	27.52	Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (8)	27.24
Chicxulub Puerto	<i>T. radiata</i> (4)	33.53	Carretera Progreso-Telchac	<i>C. nucifera</i> (1)	26.55
Chicxulub Puerto	<i>T. radiata</i> (5)	35.35	Chelem	<i>C. nucifera</i> (1)	36.02
Chicxulub Puerto	<i>T. radiata</i> (6)	27.75	Chelem	<i>C. nucifera</i> (2)	36.70
Jardines del CICY	<i>T. radiata</i> (1)	36.76	Progreso de Castro	<i>C. nucifera</i> (1)	34.52
Jardines del CICY	<i>T. radiata</i> (2)	33.21	Progreso de Castro	<i>C. nucifera</i> (2)	26.32
San Crisanto	<i>C. nucifera</i> (1)	21.35	Fracc. Real Montejo	<i>Caryota</i> sp. (1)	37.18
San Crisanto	<i>C. nucifera</i> (2)	23.37	Fracc. Real Montejo	<i>Caryota</i> sp. (2)	NA
San Crisanto	<i>C. nucifera</i> (3)	23.90	Fracc. Real Montejo	<i>Caryota</i> sp. (3)	39.76
Chabihau	<i>C. nucifera</i> (1)	25.72	Fracc. Real Montejo	<i>Washingtonia</i> sp. (1)	37.15
Chabihau	<i>C. nucifera</i> (2)	26.48	Fracc. Real Montejo	<i>Washingtonia</i> sp. (2)	35.88
Chabihau	<i>C. nucifera</i> (3)	26.75	Fracc. Fco. de Montejo	<i>A. merrillii</i> (1)	35.95
Chabihau	<i>C. nucifera</i> (4)	21.81	Fracc. Fco. de Montejo	<i>A. merrillii</i> (2)	NA
Chabihau	<i>C. nucifera</i> (5)	25.82	Fracc. Fco. de Montejo	<i>A. merrillii</i> (3)	NA
Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (1)	24.65	Fracc. Fco. de Montejo	<i>A. merrillii</i> (4)	NA
Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (2)	28.21	Ticul	<i>C. nucifera</i> (1)	33.14
Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (3)	25.57	Muna	<i>C. nucifera</i> (1)	35.36

Telchac Puerto	<i>C. nucifera</i> (4)	27.35	-	-	-
-------------------	------------------------	-------	---	---	---

\*Resultado promediado. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y, en algunos casos, triplicado.



El *Hubble eXtreme Deep Field* (XDF), imagen publicada el 25 de septiembre de 2012. La mayoría de los objetos que pueden observarse son galaxias, con excepción de unas pocas estrellas. La luz proveniente de algunas de estas galaxias se originó hace poco más de 13 mil millones de años. El XDF es, sin duda, el documento que contiene la mayor cantidad de información (en forma de luz visible) creado por la humanidad hasta la fecha. Representa nuestra postura como especie ante la ignorancia y la incertidumbre. No pude desaprovechar la oportunidad de reproducirla aquí.