



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**AISLAMIENTO DE LOS GENES *GroEL* Y *SecA* DE
FITOPLASMAS DEL GRUPO DEL
AMARILLAMIENTO LETAL**

Tesis que presenta

GRACIANO ANTONIO PUCH HAU

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

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 Graciano Antonio Puch Hau titulado **"Aislamiento de los genes *GroEL* y *SecA* de fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal"** se realizó en el Laboratorio de Cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 17 de marzo de 2020.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Graciano Antonio Puch Hau.

El trabajo AISLAMIENTO DE LOS GENES *GroEL* Y *SecA* DE FITOPLASMAS DEL GRUPO DEL AMARILLAMIENTO LETAL se llevó a cabo en Laboratorio de Cocotero de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado EU H2020 R & I programme project “TROPICSAFE” GA No 727459, bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell.

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt, por la beca otorgada No. 492571.

Al CICY, por permitirme realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones.

Al proyecto EU H2020 R & I Programme project “TROPICSAFE” GA No. 727459, por financiar la tesis.

Al Laboratorio de Cocotero, donde se llevaron a cabo todos los análisis de investigación que permitieron la culminación del presente proyecto de tesis.

A los profesores del Posgrado en Ciencias Biológicas, quienes me ayudaron en mi formación académica y en la obtención de mi grado.

Al Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, por permitirme ser su estudiante y ayudarme en la realización del presente trabajo.

Al M. en C. Iván Córdova Lara, por tener la paciencia y la dedicación de transmitirme parte de sus conocimientos para poder realizar mi trabajo de tesis.

DEDICATORIAS

Este trabajo de investigación va dedicado a todas esas personas que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, mi familia en general, mis padres por apoyarme siempre y ser mis pilares e inspiración, a mi esposa por estar siempre a mi lado, a mis hermanos por aconsejarme siempre.

ÍNDICE

.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PALMA DE COCO EN MÉXICO	3
1.3 CARACTERÍSTICAS DE FITOPLASMAS	6
1.4 FITOPLASMA CAUSANTE DEL AMARILLAMIENTO LETAL (GRUPO 16SrIV).....	7
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
.....	16
CAPÍTULO II	19
MATERIALES Y METODOS.....	19
2.1 COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
2.2. EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	19
2.3 DETECCIÓN DE FITOPLASMAS POR PCR EN TIEMPO REAL	20
CAPITULO III	26
RESULTADOS	26
CAPÍTULO IV	54

DISCUSIÓN.....	54
CAPÍTULO V	60
CONCLUSIONES GENERALES	60
PERSPECTIVAS	61

LISTADO DE FIGURAS

Figura 3.1. Amplificación de ADN palmas utilizando los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2. La banda de 1600 pb indica la presencia de ADN de fitoplasma. Los carriles 1-3 muestran amplificación de ADN de *C.nucifera* infectados con el fitoplasma 16SrIV-A. Los carriles 4 y 5 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16SrIV-D. (-) control negativo. 25

Figura 3.2. Gel de agarosa donde se visualizan los productos amplificados del gen *GroEL* con diferentes gradientes de temperatura. Se observa que la temperatura que mostró un producto amplificado fue la de 50°C para la muestra de palma positiva a la cepa de fitoplasma perteneciente al subgrupo 16SrIV-D. (+) Control positivo, ADN de palma infectada con el fitoplasma del 16SrIV-A, (-) control negativo. 26

Figura 3.3. Productos de PCR amplificados con los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2, los carriles 1, 2, 3 corresponden a ADN *C. nucifera* infectado con el fitoplasma 16SrIV-A y los carriles 4 y 6 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16S IV-D. El tamaño del producto amplificado corresponde a 1600 Pb. C (-) representa el control negativo. 297

Figura 3.4. Alineamiento in-silico del gen GroEL del AL (cepa 16SrIV-A) con su cebadores correspondientes para una mejor amplificación de ADN de fitoplasmas con títulos bajos.30

Figura 3.5. Amplificación de ADN palmas utilizando los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2. La banda de 1543 pb indica la presencia de ADN de fitoplasma. Los carriles 1-2 muestran amplificación de ADN de *C.nucifera* infectados con el fitoplasma 16SrIV-A. Los carriles 3 y 4 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16SrIV-D, y el carril 5 corresponde a ADN *P. dactylifera infectada con el fitoplasma* 16S IV-D. C (-) control negativo 31

Figura 3.6. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso obtenidas con los cebadores del gen GroEL de las cepas de fitoplasmas –A y –D con a encontrada en la base de datos del GenBank..... 34

- Figura 3.7.** Productos de PCR amplificados con los cebadores *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF2*, *TPD-SecAR2*, los carriles 1, 2, 3 corresponde a ADN de *C. nucifera* 16SrIV-A y las muestras 4 y 5 pertenecen *A. merrillii* 16S IV-D, C (-), control negativo. 36
- Figura 3.8.** Productos de PCR amplificados con los cebadores *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF2*, *TPD-SecAR2*, los carriles 1, 2, 3 representa ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma 16SrIV-A y los carriles 4 y 5 representan ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16SrIV-D, C (-), control negativo. Se realizaron ajustes a la temperatura de hibridación a 60°C..... 39
- Figura 3.9.** Alineamiento de los cebadores *TPD-SecA* y *SecAfor*, con el gen *SecA* del AL en cocotero, para llevar acabo la amplificación mediante PCR anidado. 39
- Figura 3.10.** Productos de PRC amplificados con los cebadores *SecAfor1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*. Con la combinación de los cebadores del *SecA* se obtuvo un producto amplificado de 683 pb aproximadamente tanto para las muestras de ADN de palmas de *C. nucifera* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-A y en ADN de palmas de *A. merillii* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-D. C (-) control negativo..... 40
- Figura 3.11.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *SecA* de los dos subgrupos de referencia 16SrIV-A, 16SrIV-D y las secuencias de los productos amplificados..... 42
- Figura 3.12.** Productos de PRC amplificados con los cebadores *SecAfor1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*. Se obtuvo un producto amplificado de 750 Pb aproximadamente tanto para las muestras de ADN de palmas de *C. nucifera* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-A, en ADN de palmas de *A. merillii* y *P. datilyfera* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-D. C (-) control negativo. 43
- Figura 3.13.** Alineamiento múltiple de las secuencias consenso con Clustal-W obtenidas con los cebadores que amplifican la región del gen *SecA* de las cepas de fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D con sus homologas encontradas en la base de datos del GenBank. 46

Figura 3.14. Productos de PCR anidado corridos en electroforesis en gel de agarosa usando los cebadores AySecYF1 y AySecYF2 en ADN de *C. nucifera* presentes en los carriles 1, 2, 3 infectadas con el fitoplasma del 16SrIV-A y en ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D presente en los carriles 4 y 5 a una temperatura de alineamiento de 58 °C por un minuto. C (-) control negativo. 48

Figura 3.15. Gel de agarosa de los productos de PCR anidado usando los cebadores que amplifican el gen *SecY* con una temperatura de alineamiento de 60°C. En los carriles 1, 2,3 se observa ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-A, en los carriles 4 y 5 se observa ADN de palma *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D. C (-) control negativo. 49

Figura 3.16. Carriles 1, 2,3 se observa ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-A, en los carriles 4 y 5 se aprecia ADN de la palma *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D amplificadas con los cebadores del gen *Secy* con una temperatura de hibridación a 65°C..... 50

Figura 3.17. Productos de PCR amplificados con los cebadores IMP-532F1, IMP-257R1, IMP-586F2, IMP-2127R2. Los carriles 1, 2, 3, corresponden a ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasmas del 16SrIV-A, mientras que los carriles 4 y 5 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D..... 51

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Cebadores utilizados para amplificar los genes GroEL, SecA, SecY, LY-IMP con palmas positivas al AL.....	21
Tabla 3.1. Secuencias consenso obtenidas de los productos de PCR amplificados con los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL- F2 y GroEL-R2	28
Tabla 3.2. Análisis de homología de secuencias obtenidas de los productos amplificados con el gen <i>GroEL</i> , mediante BLAST-N, en ADN de palmas de <i>C. nucifera</i> infectadas con el fitoplasma 16SrIV-A y <i>A. merrillii</i> infectadas con el fitoplasma 16SrIV-D	29
Tabla 3.3. Secuencias consenso obtenidas de los productos de PCR amplificados con la combinación de cebadores GroEL-F2, GroEL-R1, GroEL- F2 y GroEL-R2.....	32
Tabla 3.4. Análisis de homología de secuencias obtenidas de los productos amplificados con el gen <i>GroEL</i> , mediante BLAST-N, en ADN de palmas de <i>C. nucifera</i> infectadas con el fitoplasma 16SrIV-A y <i>A. merrillii</i> infectadas con el fitoplasma 16SrIV-D.	33
Tabla 3.5. Cebadores específicos para amplificar ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.	35
Tabla 3.6. Alineación de las secuencias obtenidas de los productos amplificados con el gen <i>SecA</i> , comparadas con las encontradas en la base de datos del GenBank.	41
Tabla 3.7. Secuencias consenso obtenidas de los productos de PCR amplificados con la combinación de cebadores SecAfor1, TPD-SecAR1, TPD-SecAF1, TPD-SecAR1.....	44
Tabla 3.8. Análisis de similitud de las secuencias consenso obtenidas con el gen <i>SecA</i> , comparadas con las encontradas en la base de datos del Gen Bank.	45
Tabla 3.9. Cebadores específicos del gen <i>SecA</i> , para amplificar ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.....	47

ABREVIATURAS

AL:	Amarillamiento Letal
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ATP:	Ádenosin trifosfato
Blast:	"Basic local alignment search tool"
<i>A. merrillii</i> :	<i>Adonidia merrillii</i>
CTAB:	Cetil trimetilamonio bromuro
<i>C. nucifera</i> :	<i>Cocos nucifera</i>
dNTPs:	Desoxirribonucleotidos
NaClO:	Hipoclorito de sodio
ng:	Nanogramos
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
mL:	Mililitro
<i>H. crudus</i> :	<i>Haplaxius crudus</i>
LB:	Medio de cultivo
MgCl ₂ :	Cloruro de magnesio
RFLP:	Polimorfismo de longitud del fragmento de restricción
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa o "Polimerase chain reaction"
<i>P. dactylifera</i> :	<i>Phoenix dactylifera</i>
pb:	Pares de bases
μL:	Microlitro
mM:	Milimolar
ng:	Nanogramos

RESUMEN

El amarillamiento (AL) letal es una enfermedad devastadora del cocotero y otras palmas y es ocasionada por microorganismos conocidos como fitoplasmas; los cuales son transmitidos por el insecto *Haploxius crudus*. Con base en el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr, los fitoplasmas causantes del AL se ubican en el grupo IV con seis subgrupos. Esta enfermedad ha estado presente en Yucatán por más de dos décadas y aún continúa muy activa. Los síntomas que provoca en las palmas han sido bien caracterizados. Sin embargo, hay ocasiones que estos síntomas son ligeramente diferentes a los reportados. La detección e identificación de nuevos fitoplasmas asociados al cocotero y otras palmas se realiza con base en el análisis del gen ribosomal 16S, sin embargo, no siempre proporciona una distinción molecular de las cepas estrechamente relacionadas debido a la naturaleza altamente conservada de sus secuencias. Por tal razón, en el presente trabajo se planteó utilizar genes menos conservados, como *SecA*, *SecY*, *GroEL* y los *IMP* como parámetros filogenéticos más útiles para la determinación precisa entre cepas de '*Candidatus Phytoplasma palmae*' causante del AL. Se establecieron las condiciones de amplificación de los genes *SecA*, *GroEL* e *IMP*, logrando la amplificación de las dos cepas de fitoplasmas de los subgrupos –A y –D, los más predominantes en el sureste de México. Los productos amplificados se secuenciaron y se obtuvieron secuencias consenso de los genes *SecA* y *GroEL* de ambas cepas, las cuales fueron comparadas con las que se encontraban depositadas en la base de datos del GenBank. Las diferencias fueron visibles, nuestros cebadores fueron capaces de amplificar las dos cepas de referencia en ADN de palmas infectadas con el fitoplasma causante del amarillamiento letal y pudieron corroborar que efectivamente se encontraban infectadas con los fitoplasmas del subgrupo –A y –D. En el presente trabajo se sentaron las bases para la obtención de una filogenia mucho más fina del '*Candidatus Phytoplasma palmae*'.

ABSTRACT

Lethal yellowing (LY) is a devastating disease of coconut palm and other palms and is caused by microorganisms known as phytoplasmas; which are transmitted by the insect *Haplaxius crudus*. Based on the sequence analysis of the 16S ARNr gene, the phytoplasmas that cause AL are placed in group IV with six subgroups. This disease has been present in Yucatan for more than two decades and is still very active. The symptoms caused by the disease in the palms have been well characterized. However, there are occasions that these symptoms are slightly different from those reported. The detection and identification of new phytoplasmas associated with coconut palm and other palms are performed based on the analysis of the 16S ribosomal gene; however, it does not always provide a molecular distinction of closely related strains due to the highly conserved nature of their sequences. For this reason, in the present work it was proposed to use less conserved genes, such as *SecA*, *SecY*, *GroEL* and *IMP* as more useful phylogenetic parameters for the precise determination of strains of '*Candidatus Phytoplasma palmae*' causing LY. The amplification conditions of the *SecA*, *GroEL* and *IMP* genes were established, achieving the amplification of the two strains of phytoplasmas of the subgroups –A and –D, the most persistent in the Yucatan state region. The amplifications products were sequenced and consensus sequences of the *SecA* and *GroEL* genes were obtained from both strains, which were compared with those deposited in the GenBank database. The differences were visible, our primers were able to amplify the two DNA reference strains of palms infected with the phytoplasma causing lethal yellowing and could confirm that they were effectively infected with the phytoplasmas of subgroup –A and –D. In this work were established the basis for obtaining a much finer phylogeny of '*Candidatus Phytoplasma palmae*'.

INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son bacterias patógenas de plantas de la clase Mollicutes que son transmitidos por insectos vectores como Saltamontes y psílidos. Infectan a cientos de plantas en todo el mundo, incluyendo cultivos económicamente importantes, árboles frutales y plantas ornamentales. Las plantas infectadas muestran una amplia gama de síntomas, incluyendo el retraso del crecimiento, el amarillamiento de las hojas, la escoba de brujas (desarrollo de numerosos brotes con hojas pequeñas), filodia (formación de tejidos parecidos a las hojas en lugar de flores), virescencia (reverdecimiento de flores), púrpura (enrojecimiento de hojas y tallos). La infección por fitoplasma es a menudo fatal y causa daños devastadores a la producción agrícola a nivel global (Bertaccini and Lee, 2018).

Los fitoplasmas cuentan con ciertas características como un genoma pequeño entre 530 y 1500 kb, al igual que un contenido de GC de entre 23 y 29%, así como dos operones de ARNr, pocos tRNAs y una actividad metabólica limitada. Con estudios realizados basados en los análisis filogenéticos del gen 16S ARNr, se ha logrado demostrar que los fitoplasmas forman un clado distinto dentro de la clase Mollicutes (Bertaccini and Lee, 2018).

La clasificación actual de los fitoplasmas está basada en la similitud del gen 16S ARNr apoyado por análisis filogenéticos, esta estrategia ha descrito '*Candidatus Phytoplasma*' (Bertaccini and Lee, 2018); agrupados en 33 grupos designados 16SrI-16SrXXXIII (Bertaccini and Lee, 2018). Aunque el gen 16S ARNr se ha empleado para poder establecer una clasificación de los fitoplasmas, este no siempre proporciona una distinción molecular de las cepas estrechamente relacionadas debido a su naturaleza altamente conservada de sus secuencias y la presencia de interoperones heterogéneos, dado lo anterior el 16S puede excluir muchas cepas de fitoplasmas ecológica o biológicamente distintas, algunas de las cuales pueden justificar la designación como nuevos taxones. En el caso del fitoplasma asociado al amarillamiento letal el cual se ha denominado '*Candidatus Phytoplasma palmae*' y clasificado en el grupo 16SrIV dividido a su vez en los subgrupos A, B, C, D, E y F, también podrían presentar ciertas diferencias moleculares que quizá con el gen 16S no puedan ser apreciadas por ser muy conservado entre sus secuencias (Harrison y Oropeza, 2008).

En el caso de la Península de Yucatán este fitoplasma se ha encontrado en otras especies de palmas, como por ejemplo *Thrinax radiata* (Narváez et al.. 2006), *Sabal mexicana* (Vázquez-Euán et al.. 2011), *Roystonea regia* (Narvaez et al.. 2016) y *Adonida merillii* (Córdova et al., 2017), siendo los subgrupos 16SrIV-A y -D los reportados en la Península de Yucatán. Muchas de las palmas infectadas por el fitoplasma del AL muestran los síntomas típicos, sin embargo, se han visto otras que presentan síntomas atípicos, lo cual podría indicar la presencia de grupos o subgrupos distintos al causante del amarillamiento letal (Cordova et al., 2017).

El uso del gen 16S ARNr ha sido de gran utilidad para clasificar y detectar fitoplasmas a niveles de género o más profundamente a niveles taxonómicos más elevados, sin embargo, es un gen altamente conservado, que no podría ser útil para resolver relaciones filogenéticas a nivel de especies, así como de fitoplasmas que pudieran estar estrechamente relacionados y que pudieran ser percibidos como idénticos aun cuando estos no compartan nichos ecológicos o que sean transmitidos por diferentes vectores o que estén asociados con plantas hospedantes distintas en varias regiones geográficas (Gutiérrez y Almaraz., 2008). Reportes de otros trabajos donde se ha utilizado genes menos conservados como *GroEL*, *SecY*, *SecA*, *rp*, *AMPs*, *IMPs*, hacen mención que podrían ser utilizados para diferenciar de forma más fina los fitoplasmas que infectan las diferentes especies de palmas (Mitrovic et al., 2011; Lee et al., 2006; Lee et al., 2010). El uso de un enfoque con características moleculares para la caracterización genética del fitoplasma causante del amarillamiento letal, permitirá detectar, si la especie '*Candidatus* *Phytoplasma palmae*' tiene alguna otra relación con otra especie o cepas de fitoplasmas así como con enfermedades específicas, también permitirá reconocer enfermedades que producen complejos de varios desordenes celulares o similares causados por este mismo fitoplasma u otros dentro de la misma clasificación. Lo importante de la caracterización genética es que a partir de ella podremos saber más profundamente la existencia de infecciones de plantas individuales por especies mixtas de fitoplasmas. El presente estudio se enfocará en el uso de genes y técnicas moleculares que nos permitan realizar una caracterización genética más fina del grupo de fitoplasmas relacionados con la enfermedad de amarillamiento letal, basándonos de estudios previos realizados.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Históricamente, como ya se sabe, las enfermedades tanto en plantas como en animales están determinadas por los síntomas que estos inducen, así como el patógeno que lo causa y en el caso de los fitoplasmas no son la excepción. Nombres como el amarillamiento letal de la palma y otros indican la importancia de la percepción de los síntomas en la asignación de los nombres comunes de las enfermedades (Gutiérrez y Almaraz, 2008). A su vez, igual los nombres comunes de los patógenos se derivan de los nombres de las enfermedades de las plantas a las que son asociados. Por ejemplo, muchas de las enfermedades producidas por los fitoplasmas se han clasificado en términos generales, ya sea como enfermedades de declinación o de virescencia (Gutiérrez y Almaraz, 2008).

De manera general, se puede asumir que cada enfermedad puede ser causada por una sola especie de fitoplasma. Sin embargo, los estudios han dejado en claro que diferentes fitoplasmas pueden ser causantes de síntomas aparentemente idénticos en ciertas plantas. Por lo que algunos fitoplasmas estrechamente relacionados pueden causar síntomas claramente diferentes en sus hospederos. La comprensión de las relaciones entre las propiedades biológicas y la clasificación de los fitoplasmas basada en las secuencias conservadas requieren de estudios más amplios (Gutiérrez y Almaraz, 2008).

1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PALMA DE COCO EN MÉXICO

La enfermedad de amarillamiento letal es una enfermedad que afecta una variedad de palmas y en particular la palma de coco (*Cocos nucifera* L.), árbol frutal importante económicamente en las regiones tropicales y subtropicales; crece a lo largo de todas las costas arenosas. Morfológicamente el coco es una palma alta y erecta usualmente de 10 a 20 m de altura, posee un tronco delgado ya sea curvo o recto, a menudo suele estar ensanchado e inclinado en la base con una corteza parda o gris ligeramente rajada (Parrota, 1993).

Con frecuencia se conoce a la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) como árbol de la vida, debido a que tienen un gran valor como planta de uso múltiple encontrándose en el doceavo lugar de la lista de especies de plantas alimenticias más importantes para el hombre además de ser una de las más bellas; aproximadamente hace más de mil años se ha cultivado, y su dispersión es muy amplia, que en la actualidad existe un fuerte debate sobre su centro de origen geográfico (Sanchez y Rios, 2002). El cocotero es sin duda el cultivo arbóreo más importante del mundo, que involucra a un número relativo de personas relacionadas directa e indirectamente con los productos de esta planta (Sanchez y Rios, 2002).

De manera general el coco se planta extensamente por su fruto y como una planta ornamental y se usa como una fuente de alimento y bebida, como aceite, combustible, madera entre otros numerosos productos. De igual manera se usa en el entechado y en otras aplicaciones como material de construcción (Parrota, 1993). Basados en datos recientes el coco se siembra en una superficie de 124.3 mil hectáreas en 9 entidades del país, Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Tabasco y Veracruz, siendo el estado de Guerrero como el que aporta un volumen de 178.2 mil toneladas, las cuales representan el 80% de la producción nacional.

Actualmente México ocupa el octavo lugar mundial en la producción del cultivo de coco, el cual ha registrado un crecimiento constante en su productividad en los últimos 4 años, con una mayor aceleración en 2016; con base a esto la producción de coco aumentó en un 9.2% entre 2013 y 2016 (SAGARPA, 2017).

1.2 AMARILLAMIENTO DEL COCOTERO

En la actualidad el cultivo de coco atraviesa por una problemática muy compleja cuyo componente principal es la fitosanidad: dentro de este aspecto podemos destacar el daño causado por el acaro *Eriophyes guerreronis* y el Picudo *Rynchophorus palmarum* a estos daños se le añade el ataque del amarillamiento letal, la cual es una enfermedad devastadora. Su poder no solo se debe a su virulencia, si no a que no puede ser controlada químicamente. La enfermedad es producida por un fitoplasma y es transmitida por el insecto chupador denominado *Haplaxius crudus*, cuando este se alimenta de la savia del floema de las palmeras (Sanchez y Rios, 2002).

Haplaxius crudus es un saltamontes que se asocia con hierbas y palmas y está implicado como un vector de amarillamiento letal, enfermedades de las palmas en Florida y Jamaica. *H. crudus*, comúnmente conocido como chicharrita, es nativo de los trópicos y subtrópicos americanos. La especie se describió por primera vez en Jamaica en 1907 y actualmente su distribución abarca desde el norte de América del Sur, América Central, ciertas islas del Caribe y la Florida y el sur de Texas en los Estados Unidos. Los adultos de *H. crudus* se alimentan principalmente del floema de palmeras, especialmente de palmeras de coco, mientras que las ninfas se alimentan principalmente de hierbas. Los adultos se alimentan sobre el follaje de la palma, insertando sus estiletes en el tejido de la hoja chupando los jugos de la planta, siendo esta la forma en que este insecto infecta la palma con el fitoplasma del amarillamiento letal (McCoy et al., 1983).

El primer síntoma de carácter visual en las palmas de coco portadoras de la enfermedad del amarillamiento letal, es la caída del fruto de manera prematura independientemente de su desarrollo, otro síntoma visible es el ennegrecimiento de inflorescencias nuevas; este síntoma relacionado con las inflorescencias se muestra cuando la misma emerge de la espada. Las primeras inflorescencias que están afectadas generalmente muestran necrosis parcial, pero conforme la enfermedad progresa, todas las nuevas inflorescencias muestran necrosis más extensa. La mayoría de las flores masculinas muere, por lo tanto, no hay desarrollo de fruto en las inflorescencias afectadas.

El amarillamiento de las hojas comienza generalmente poco después de que se ha desarrollado la necrosis en más de dos inflorescencias; por lo que el patrón de decoloración foliar debido al AL es más rápido que el de la senescencia foliar. Las primeras hojas amarillas son las hojas más viejas o inferiores, posteriormente la enfermedad va avanzando hacia arriba, afectando el medio más joven u hojas más jóvenes, hasta llegar finalmente a las hojas superiores; dejando todas las hojas de color amarillo que posteriormente se volverán marrones y que finalmente morirán, permanecerán colgando durante unos días antes de caer finalmente dejando un tronco desnudo o poste telefónico. La hoja espada también se ve afectada por esta enfermedad, desarrollando una zona podrida y de vez en cuando muere cuando otras hojas superiores son todavía verdes (McCoy et al., 1983).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE FITOPLASMAS

Los fitoplasmas son parásitos estrictos de la célula de las plantas y de los insectos vectores. Sus tamaños y crecimiento dependen del desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan y tienen la capacidad de moverse lentamente a través de los poros de las células cribosas del floema. Su célula se encuentra rodeada por una membrana plasmática trilaminar de unos 10 µm de grosor, compuesta de igual manera que el resto de los procariontes de dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos, en su citoplasma se encuentran ribosomas para la síntesis de proteínas y una molécula de ADN doble circular (Nishigawa et al., 2001). El genoma de los fitoplasmas es pequeño, con un alto contenido de genes. Por estudios serológicos y moleculares también se ha logrado determinar que los fitoplasmas contienen un gen que se encarga de codificar para una proteína de membrana y esta es única para cada especie. Dichas proteínas se encuentran de manera abundante en la superficie externa de la célula y de su estudio se podría explicar la interacción de fitoplasma-huésped (Kirkpatrick et al., 1994).

Los fitoplasmas son bacterias de la clase Mollicutes que carecen de pared celular, son parásitos obligados que requieren de un insecto vector y a la vez no se pueden cultivar *in vitro* (Hogenhout et al., 2008), circunstancia por la cual se ha dificultado su análisis, clasificación, y caracterización taxonómica. Infectan a cientos de especies de plantas en todo el mundo, incluyendo cultivos de importancia económica, árboles frutales y plantas ornamentales. Aunque el genoma de los fitoplasmas es extremadamente pequeño, se conoce muy poco de su genoma. Se han realizado estudios para su clasificación e identificación basado en el rango de hospedantes, en la sintomatología, en algunas características epidemiológicas, en la remisión de síntomas inducida por la aplicación de antibióticos, en la microscopia y ahora en la actualidad en técnicas moleculares permitiendo ser un poco específicos en la detección de alguna enfermedad en las plantas (Cavalche, 2004).

Es de vital importancia agrícola identificar los factores implicados en la patogenicidad de los fitoplasmas, así como descubrir medidas eficaces para controlar las enfermedades originadas por éstos (Namba, 2011). Las plantas infectadas por los fitoplasmas presentan una amplia gama de sintomatologías que van desde la atrofia, coloración amarillenta, escoba de brujas; denominado así por la acumulación o desarrollo de numerosas ramas diminutas con pequeñas hojas. Otros síntomas, son la formación de tejidos en formas de hojas en vez del desarrollo de las flores (filodia), el enverdecimiento de los órganos florales (virescencia), necrosis del floema entre otros síntomas (Maejima et al., 2014).

1.4 FITOPLASMA CAUSANTE DEL AMARILLAMIENTO LETAL (GRUPO 16SrIV)

Los fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrIV son los causantes del amarillamiento letal en palmas, se conocen desde ya hace más de cien años. Los primeros informes sobre amarillamiento letal se registraron en las islas caimán donde se observó por primera vez, posteriormente se hicieron otros reportes de esta enfermedad de las palmas en república dominicana, Haití, Bahamas, y Florida en Estados Unidos, en años recientes se descubrieron brotes en la Península de Yucatán México y África (Ntushelo et al., 2013).

Este grupo de fitoplasma se denomina colectivamente según (Harrison y Elliot, 2016) grupo del amarillamiento letal que no solo afecta a las palmas de cocotero, sino que también se ha observado que otras especies de palmas pueden ser susceptibles a esta enfermedad. Los miembros de dicha cepa se encuentran distribuidos principalmente en la cuenca del caribe. El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad mortal del cocotero (*Cocos nucifera* L.) y de al menos otras 37 especies de palmas en el continente americano, dicha enfermedad ha matado millones de palmeras de diferentes especies en el Caribe durante los últimos 40 años (Brown et al., 2007).

En el sureste de México y en otras partes de América, la enfermedad de amarillamiento letal (AL) relacionada con el subgrupo 16SrIV-A, clasificada como '*Candidatus* Phytoplasma palmae', está asociada con muchas especies de palmeras.

Los otros subgrupos de 16SrIV que están asociados con los síntomas del AL en palmas en esta región geográfica son los reportados en *Thrinax radiata* y *Coccothrinax readii* donde fue detectado el subgrupo A (Narváez et al., 2006) *Acrocomia aculeata* en Honduras reportando al subgrupo B (Roca et al., 2006) *Cocos nucifera* en Tabasco, México, donde se encontró el subgrupo C (Harrison et al., 2002), *Sabal mexicana* en Yucatán, México donde se hicieron reportes de los subgrupos A y D (Vázquez-Euán et al., 2011), estos subgrupos también fueron encontrados en *Washingtonia robusta* (Harrison y Oropeza, 2008). En República Dominicana se identificó al subgrupo E en *Cocos nucifera* (Martínez et al., 2008) en *Washingtonia robusta* se hizo el primer reporte del subgrupo F (Harrison y Oropeza, 2008). Recientemente *Acrocomia mexicana* y *Roystonea regia* presentaron síntomas de amarillamiento letal y se confirmaron con los análisis moleculares correspondientes, cuyos resultados mostraron la presencia del fitoplasma causante del AL del subgrupo 16SrIV-A (Narváez et al., 2016).

1.5 GENES UTILIZADOS PARA CARACTERIZAR FITOPLASMAS

Como se mencionó anteriormente la clasificación de los fitoplasmas se basa en la similitud de las secuencias del gen 16S ARNr respaldadas por análisis filogenéticos, y utilizando esta estrategia, 38 especies de '*Candidatus* Phytoplasma' se han descrito formalmente hasta la fecha (Davis et al., 2013; Harrison et al., 2014; IRPCM, 2004; Nejat et al., 2013). La clasificación de los fitoplasmas está respaldada además por el gen 16S ARNr mediante el uso del polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) del fragmento 16S ARNr F2nR2 con un conjunto de diecisiete endonucleasas de restricción (Lee et al., 1993, 1998). Este enfoque identifica al menos 30 grupos de fitoplasmas, designados 16Srl-16SrXXX, con cada grupo que contiene subgrupos designados por letras (Harrison et al., 2014; Pérez-López et al., 2016; Zhao et al., 2009).

La identificación y caracterización de las diferentes cepas de fitoplasmas que conforman el grupo IV se han realizado en base a la secuencia del gen 16S ARNr, el cual debido a su naturaleza altamente conservada y a la presencia no poco común de la heterogeneidad de la secuencia del interperón del 16S ADN (Schneider y Seemüller, 1994; Liefting et al., 1996; Lee et al., 1998; Jomantiene et al., 2002, Davis et al., 2013; Duduk et al., 2009), se necesitan algunas herramientas adicionales para el análisis

filogenético y una diferenciación de cepas, mucho más fina de este grupo heterogéneo. Más genes de copia única variables, como la proteína ribosomal (*rpl22* y *rpS3*), *secY* y *tuf*, se ha informado que son adecuados para una diferenciación más fina del fitoplasma que causa el amarillamiento letal y de otros (Marccone et al., 2000; Lee et al., 2004, 2006, 2010).

Para caracterizaciones más finas de los fitoplasmas se ha recurrido al estudio de otros tipos de genes como aquellos que codifican proteínas como *GroEL*, el cual es una chaperonina que ayuda en el plegamiento de otras proteínas que han sufrido cambios en su estructura tridimensional y química tales como la exposición de residuos hidrofóbicos al medio que normalmente se encuentran en el interior de una proteína. El gen *GroEL* es un ejemplo de los estudios recientes para poder caracterizar fitoplasmas, como el estudio realizado por (Mitrović et al., 2011), donde se diferenciaron cepas de fitoplasma estrechamente relacionadas.

La amplificación específica de fragmentos de ADN de fitoplasmas que contienen el gen *GroEL* permitió estudiar la variabilidad genética de 27 cepas relacionadas con '*Candidatus* Phytoplasma asteris' pertenecientes a diferentes subgrupos de 16Srl, de las cuales 11 no habían sido estudiadas antes y 8 más que no habían sido estudiados con otros genes, más que con el 16S ARNr. Los análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los fragmentos amplificados confirmaron la diferenciación entre los diferentes subgrupos 16Srl-A, IB, IC, IF e IP, y mostraron una diferenciación adicional entre las cepas asignadas a los subgrupos 16Srl-A, 16Srl-B y 16Srl-C. Sin embargo, los análisis del gen *GroEL* no lograron mostrar diferencias adicionales para las cepas en los subgrupos 16Srl-L y 16Srl-M previamente descritos sobre la base de la heterogeneidad de la secuencia de interoperón de 16S ARNr de las cepas en el subgrupo 16Srl-B.

Por otro lado, la cepa no clasificada 16Srl ca2006 / 5 de la zanahoria la cual mostró heterogeneidad de secuencia de interoperón, fue diferenciada con los genes *rp* y *GroEL* de las cepas en el subgrupo 16Srl-B. Estos resultados indicaron que la heterogeneidad de la secuencia interoperónica de las cepas AY2192, PRIVA (16Srl-L), AVUT (16Srl-M) y ca2006 / 5 produjeron cambios multigénicos, es decir, un paso evolutivo adicional.

Los diferentes análisis filogenéticos realizados con el gen *GroEL* mostraron cierta concordancia con los análisis filogénicos realizados con los genes 16Sr, *rp*, *SecY*, y confirmando la diferenciación obtenida mediante análisis de RFLP en los amplicones del gen *GroEL* demostrando que este gen puede ser utilizado como una herramienta adicional para la diferenciación de cepas de fitoplasmas que se encuentran estrechamente relacionadas. Por otro lado, el gen *nusA* también ha sido implementado como una herramienta para llevar a cabo diferenciación molecular y filogenia de los fitoplasmas, es un gen del factor de terminación de la transcripción, al igual que el gen 16S ARNr es un gen que se encuentra conservado en las bacterias (Borukhov et al., 2005).

El gen *SecA* es una subunidad asociada a la membrana celular de la vía secretoria eubacteriana Sec o Tipo II, un sistema que es responsable de la secreción de proteínas a través de la membrana celular. Dentro de este sistema, *SecA* tiene las propiedades funcionales de una ATPasa y se requiere para potenciar el movimiento del sustrato de proteína a través del canal de translocación. Necesario para la exportación de proteínas, interactúa con el canal de conducción de preproteína *SecYEG*. *SecA* tiene un papel central en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP a la transferencia de proteínas a través de la membrana celular, sirviendo como receptor para el complejo preproteína-SecB y como motor molecular impulsado por ATP que impulsa la translocación gradual de cadenas de polipéptidos a través de la membrana (<http://www.uniprot.org/uniprot/P10408>).

El gen *SecY* que codifica una subunidad translocasa de proteínas, representa de igual manera uno de los marcadores prometedores para una diferenciación más fina de cepas de fitoplasmas y para delinear cepas biológica y ecológicamente distintas que a menudo no pueden resolverse fácilmente mediante el análisis solo del gen 16S ARNr. Las interrelaciones filogenéticas basadas en el análisis del gen *SecY* no se han explorado para las cepas que constituyen la mayoría de los grupos de fitoplasmas (Lee et al., 2006). En el estudio realizado por Lee et al., 2010, se hicieron análisis filogenéticos comparativos y se construyeron árboles filogenéticos basados en análisis de secuencia de 16S ARNr y genes *SecY* de cepas de fitoplasma representativas para evaluar la eficacia de secuencias de genes *SecY* para la diferenciación de cepas de fitoplasmas estrechamente relacionadas.

La filogenia basada en el gen *SecY* no solo resolvió fácilmente los subgrupos 16Sr dentro de un grupo 16Sr dado, sino que también delineó distintos linajes irresolubles por la filogenia basada en el gen 16S ARNr.

Aunque el gen 16S ARNr ha sido crucial en el proceso de agrupar fitoplasmas asociados con palmas, dentro de la resolución del grupo de los fitoplasmas 16SrIV ha sido posible; entre otros genes el análisis de la secuencia del gen *SecA*, ha permitido diferenciar tres grupos distintos de fitoplasmas causantes del amarillamiento letal en cocotero. Basado en el análisis de la secuencia de este gen combinado con el análisis de las secuencias del operon ribosómico, el grupo 16SrIV de fitoplasmas se dividieron en el grupo 16SrIV-A causante del amarillamiento letal en Tanzania, así como en la marchites de Cabo San Pablo en Ghana (16SrIV-C).

En el estudio realizado por Hodgetts et al., (2008), se diseñó un nuevo conjunto de cebadores de fitoplasmas del gen *SecA*. Los cebadores amplificaron una secuencia de aproximadamente 480 pb de todos los fitoplasmas probados, incluidos los representantes de 12 grupos 16Sr. Esto nos permitió utilizar un gen menos conservado como parámetro filogenético para producir un análisis filogenético alternativo de los fitoplasmas.

Marcone et al., (2000), examinaron setenta cepas de fitoplasmas, incluidas diez de referencias previamente caracterizadas del grupo del amarillamiento letal. El análisis de la secuencia del gen *tuf*. Sobre la base de los perfiles de restricción de ADNr, reconocieron siete subgrupos de 16S DNAr propuestos previamente (16SrI-A, -B, -C, -D, -E, -F y -K) en el material examinado. Además, identificaron tres nuevos subgrupos que difieren en los perfiles RFLP y se designaron 16SrI-L, 16SrI-M y 16SrI-N por la heterogeneidad de la secuencia de los dos operones del gen 16Sr ARNr. Los subgrupos delineados por análisis de RFLP de un fragmento del gen *tuf* de 940 pb fueron consistentes con subgrupos definidos sobre la base de secuencias del gen 16Sr ARNr. Los genes que se han utilizado para clasificar los fitoplasmas que pertenecen a otros grupos de 16Sr pueden usarse para clasificar los fitoplasmas dentro de 16SrIV. Una alta probabilidad de éxito potencial con estos genes se basa en la alta similitud genética entre los fitoplasmas (Ntushelo et al., 2013).

De una manera concisa se han descrito algunos genes utilizados como herramientas moleculares para la caracterización filogenética de los fitoplasmas causantes del amarillamiento, sin embargo, todavía los esfuerzos se orientan en la búsqueda de más genes que permitan, al igual que estos, obtener una clasificación más fina y atinada de los diferentes grupos y subgrupos de fitoplasmas.

1.6 IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL FITOPLASMA DEL AMARILLAMIENTO LETAL (AL)

Hasta la fecha, aunque ha habido reportes de cultivo *in vitro* de fitoplasmas (Wei et al., 2007), estos no han demostrado reproducibilidad, por lo que la diferenciación y clasificación de los fitoplasmas por medio de los criterios biofísicos y bioquímicos utilizados rutinariamente para microorganismos cultivables ha sido imposible. Cuando se creía erróneamente que los agentes etiológicos de las enfermedades de los fitoplasmas eran virus, la diferenciación de estos presuntos virus se fundamentó en los síntomas expuestos por las plantas enfermas y en la identidad de los hospedadores de plantas y vectores insectos específicos.

Dado que la misma cepa de estos fitoplasmas pueden inducir diferentes síntomas en diferentes huéspedes y diferentes cepas de fitoplasmas pueden compartir un vector común o causar enfermedades caracterizadas con síntomas similares, el enfoque para determinar una enfermedad en base a la sintomatología y su vector, no podrían proporcionar un medio preciso para una clasificación de fitoplasmas (Wei et al., 2007).

En el caso de *Adonidia merrillii*, se observaron más de tres tipos de síntomas diferentes, pero solo se pudieron asociar dos a los subgrupos 16S IV-A y 16S IV-D (Córdova et al., 2017). Los otros síntomas no se asociaron a un grupo en particular, pudiéndose ser otro subgrupo de fitoplasmas. Por otro lado, en palmas de cocotero también se han observado síntomas atípicos como: necrosamiento de la hoja espada desde el inicio que pudieran estar asociados a otro subgrupo de fitoplasma diferente al 16S IV-A que es el que ha sido reportado para esta especie (Oropeza et al., 2005). Estas observaciones podrían indicar que en la Península de Yucatán podrían estar asociados a palmas más subgrupos que los predominantes 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Datos moleculares recientes sobre los fitoplasmas han proporcionado considerables conocimientos sobre su diversidad y las relaciones genéticas que son la base para varios estudios exhaustivos sobre la filogenia y taxonomía de estos (Duduk, 2011). Aunque los análisis de las secuencias del 16S ARNr, es considerado el parámetro primario para poder clasificar los fitoplasmas, otros genes han sido útiles en la taxonomía y en la diferenciación de los mismos (Ntushello et al., 2013). Un análisis más profundo del grupo de fitoplasmas 16SrIV a nivel molecular para la realización de una caracterización y clasificación, podría mejorar la comprensión de estos microorganismos económicamente importantes y biológicamente interesantes.

JUSTIFICACIÓN

El amarillamiento letal continúa activo después de más de 30 años desde su aparición en el estado, ya que durante todo este tiempo se han observado palmas de coco con síntomas típicos a los ocasionados por esta enfermedad. También se ha visto que otras especies de palmas están siendo afectadas por el AL; entre estas palmas se encuentran palmas nativas de la región como *Thrinax radiata*, *Coccothrinax readii* (Narváez et al., 2006) *Sabal mexicana* (Vázquez-Euán et al., 2011), *Gaussia maya* y palmas exóticas como *Pritchardia pacifica*, *A. merrillii* y una especie no palma *Carludovica palmata* (Cordova et al., 2000). Recientemente, se reportó la presencia de este patógeno en palmas de *Acrocomia mexicana* y *Roystonea regia* (Narvaez et al., 2016).

La enfermedad del amarillamiento letal está asociada a un grupo de fitoplasmas que pertenecen al grupo 16srIV (Lee, et al. 1998) actualmente '*Candidatus* Phytoplasma palmae', el cual contiene seis subgrupos (del 16srIV-A, al 16srIV-F) (Oropeza et al., 2011). Hoy en día, los subgrupos de fitoplasmas con mayor prevalencia en las palmas en Yucatán son los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D (Córdova et al., 2017). Los fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A se han encontrado principalmente en palmas de cocotero que presentan síntomas típicos de la enfermedad y mientras que los del subgrupo 16SrIV-D en palmas como *Sabal mexicana* y *Pritchardia pacifica* (Vázquez-Euán et al., 2010) y *A. merrillii* (Cordova et al., 2017). Sin embargo, algunas palmas presentan diferentes síntomas a los reportados para los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D (Córdova et al., 2017).

Esta identificación se ha realizado utilizando el gen 16SrRNA, que como se sabe es un gen bastante conservado en los distintos grupos de fitoplasmas. Actualmente se están recurriendo a otros genes menos conservados para una clasificación más fina que permita separar grupos o subgrupos de fitoplasmas. Los genes más reportados para esta clasificación son *GroEL*, *SecA*, *SecY*, genes *rp* ribosomales (*rp*), *tuf* entre otros. Conocer las distintas cepas de fitoplasmas presentes en las palmas de cocotero u otras palmas sería de gran importancia desde varios puntos de vista: 1) identificación de posibles vectores de estos fitoplasma 2) estudios epidemiológicos y 3) para el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad.

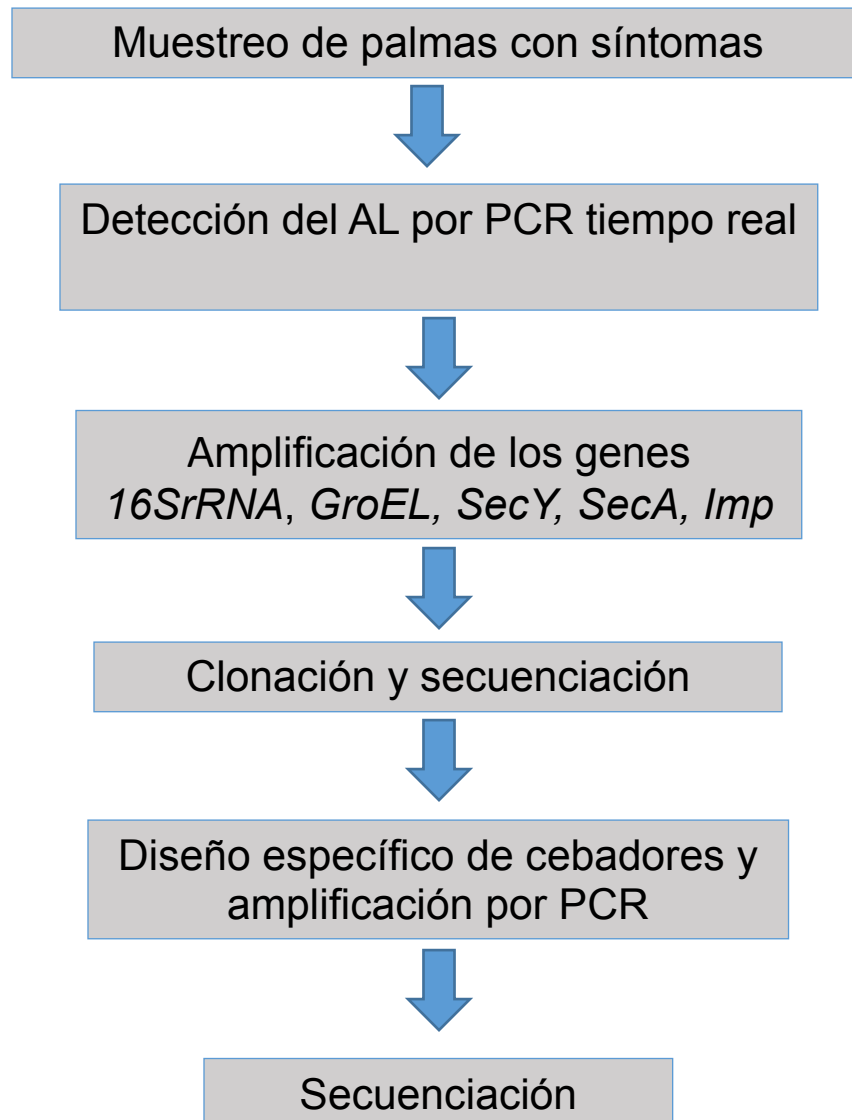
OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar los genes *GroEL*, *SecA*, *SecY*, *Imp* de fitoplasmas del grupo 16SrIV asociados a la enfermedad del amarillamiento letal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los genes *GroEL*, *SecA*, *SecY*, *Imp* utilizando cebadores sugeridos en la literatura.
2. Aislar y secuenciar los productos de PCR generados con estos cebadores.
3. Diseñar cebadores específicos de los genes *GroEL*, *SecA*, *SecY*, *IMP* de fitoplasmas del grupo 16SrIV asociados a la enfermedad del amarillamiento letal.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvo material biológico de palmas de cocotero y otras especies de palmas que presentaban síntomas típicos y atípicos de amarillamiento letal. Se colectó las hojas y el tallo con el objetivo de obtener ADN de fitoplasmas para los análisis en las plantaciones de San Crisanto y también se obtuvo material vegetativo de diferentes sitios de la ciudad de Mérida Yucatán. Todas las muestras de tejido de coco se obtuvieron como lo describe (Oropeza et al., 2011). Las muestras de tejido del tronco se colectaron, en base a lo señalado por Cordova et al. (2017), utilizando un taladro eléctrico portátil con una broca de 6,5 pulgadas; el aserrín fue colectado en una bolsa de plástico limpia y sellable. Para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada en las muestras, se realizó un lavado de la broca primeramente con alcohol al 70%, y posteriormente con una solución de NaClO al 0.6% para que finalmente la broca se enjuague con agua destilada estéril antes de tomar la siguiente muestra de otra palma. Los tejidos muestreados tanto del tallo como de las hojas se almacenaron en hielo inmediatamente después de la recolección para el transporte al laboratorio y se almacenaron a -20°C antes de la extracción de ADN y análisis de PCR. Los sitios de muestreo se seleccionaron en base a la incidencia de la enfermedad del amarillamiento letal.

2.2. EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la extracción de ADN del material colectado se maceró 1 g del tejido con la ayuda de nitrógeno líquido hasta dejarlo en una consistencia arenosa, y después se le adicionó 5 mL de buffer bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), En el caso del aserrín obtenido del tallo de la palma se mezcló directamente con el tampón CTAB. Para acelerar el proceso de lisis celular, la mezcla de buffer con muestra fue pasada a tubos de 1 ml, la cual fue colocada en baño María a 60°C por 30 min; pasado el tiempo de incubación en el baño María, a cada muestra se le adicionó cloroformo-fenol para luego centrifugar a 5 min a 20°C por 14000 rpm, y así eliminar el exceso de materia orgánica.

Una vez centrifugada la muestra, se extrajo la parte acuosa y se colocó en otro tubo de 2 ml, adicionando acetato de sodio al 0.1% e isopropanol al 0.8%. Los tubos fueron agitados levemente con la mano para poder observar el ADN. Una vez agregado el acetato de sodio y el isopropanol, la muestra se incubó a -20°C durante 30 min, para luego centrifugar 10 min a 15°C por 14000 rpm.

Una vez centrifugada las muestras se retiró el sobrenadante de cada una dejando solamente pelleta pastilla formada, para que inmediatamente después se le agregue 500 µL de etanol al 70%, y sea centrifugada nuevamente por 5 min a 21°C a 7500 rpm. Después de haber centrifugado, el etanol se extrajo de las muestras, conservando solamente la pastilla para que finalmente después de un secado, sea resuspendida en agua. Para corroborar la presencia del ADN en las muestras de tejido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para que posteriormente fuera observado en el equipo Gel-Doc (Bio-Rad, CA, EE. UU.).

2.3 DETECCIÓN DE FITOPLASMAS POR PCR EN TIEMPO REAL

Previamente se realizó análisis de detección con PCR en tiempo real de ADN obtenido del material muestreado con el gen 16S ARNr, utilizando una sonda Taqman 16S LY reportado por Córdova et al. (2014) confirmando que las muestras fueran positivas en base a su Ct. La amplificación se realizó con un equipo de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, CA, EE. UU.) del laboratorio de cocotero, contemplando las siguientes condiciones: 2 min a 50°C para activar la AmpErase UNG, 10 min a 95°C para activar la ADN polimerasa AmpliTaq Gold y 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 61°C durante 1 min. Las muestras de ADN se evaluaron por duplicado al igual que los controles para una mejor interpretación de los resultados.

2.4 DETECCIÓN DEL FITOPLASMA DE AL POR PCR CONVENCIONAL

La presencia del ADN de fitoplasma se confirmó en las palmas enfermas por medio PCR de acuerdo a los métodos señalados por Oropeza. (2011). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 25 µL de volúmenes de reacción, usando de templado 2 µL de ADN (100 ng de ADN de palma) 50 ng de cebador, 10 mM de la mezcla de los dNTPs equivalente a 0.5 µL para cada reacción, 1 U Taq ADN polimerasa Dream-Taq (Thermo Scientific) y un tampón estándar con una concentración de 20 mM de MgCl₂.

La PCR anidada se llevó acabo tomando en cuenta las siguientes condiciones, se contemplaron 35 ciclos en un PCR Express Programable (T100 Thermal Cycler) de la marca BIO-RAD utilizando cebadores universales para fitoplasmas P1/P7 (Smart et al., 1996) con los siguientes parámetros: la desnaturalización fue durante 60 s a 90°C, la temperatura de hibridación fue de 54°C con un tiempo de 50 s y posteriormente una temperatura de extensión a 72°C durante un 1 min y 20 s, para luego concluir con un ciclo a 72°C por un lapso de tiempo de 10 min. Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de P1/P7 fueron diluidos 1:10 con agua ultra pura estéril para luego ser amplificados de nuevo utilizando los cebadores generales R16Fn/R16R2 (Gundersen y Lee 1994). La amplificación con los cebadores generales R16Fn/R16R2, se llevó a cabo con las siguientes condiciones: una desnaturalización a 94°C por 60 s, 55°C por 60 s de hibridación y 72°C por 2 min de extensión, para concluir con un ciclo a 72°C por un tiempo de 10 min.

Para comprobar la presencia de ADN de fitoplasmas causante del amarillamiento letal en las muestras se llevó a cabo la amplificación de los cebadores específicos del grupo IV LY503F/LY16Sr como los describe Harrison et al., (1999) con ligeras modificaciones en los parámetros del ciclo térmico. Las amplificaciones con estos cebadores fueron con las siguientes condiciones: para la desnaturalización se consideró una temperatura de 94°C por 30 s, seguida de 50 s de hibridación a 60°C y 1 min y 20 s de extensión a 72°C durante 35 ciclos, y un ciclo final de 10 min a 72°C. Las alícuotas (5 µl) de cada reacción final, fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, para luego ser observadas en el transiluminador UV con el dispositivo GelDoc (Bio-Rad; Hercules, CA, EE. UU.).

2.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR CONVENCIONAL DE LOS GENES *GROEL*, *SECY*, *SECA* E *IMP*

Los productos amplificados por PCR convencional de los extractos de ADN de las palmas que previamente habían sido evaluadas en PCR tiempo real y PCR convencional con los cebadores P1/P7 y confirmados positivos con los cebadores específicos del Amarillamiento Letal LY503F/LY16Sr fueron amplificadas con los cebadores de los genes *GroEL*, *SecY*, *SecA* e *IMP*. Fue importante determinar que las muestras fueran positivas al AL mediante el análisis de rutina para que posteriormente estas mismas muestras fueran sometidas a los cebadores que se propusieron para realizar el presente trabajo.

Con el objetivo de amplificar genes diferentes al 16S ARNr se procedió a buscar en la literatura y propuestos también por el Dr. Nigel Harrison (Universidad de Florida, EUA) cebadores que amplifican a los genes *GroEL*, *SecA*, *SecY* e *IMP*. Los cebadores están enlistados en la Tabla 2.1. En el caso de los cebadores que amplifican los genes *GroEL*, *SecA* e *IMP* fueron proporcionados por el Dr. Nigel Harrison de la Universidad Florida, el previamente había diseñado estos cebadores, en base a unos ensayos realizados con palmas infectadas con la enfermedad del amarillamiento letal; sin embargo no fueron probados más a fondo por lo que en el presente trabajo se trabajó con ellos, la síntesis de los cebadores fue realizado por la empresa UNIPARTS SA. DE CV en Integrated DNA technologies.

Para los cebadores que amplifican el gen *SecY*, las secuencias fueron tomadas del artículo de Lee et al., (2006) donde realizó análisis filogenéticos basados en las secuencias del gen *secY* y en estudios previos realizados sobre el gen 16SARNr, *tuf* y las *rp* reforzando la idea de que la mayoría de los subgrupos identificados por RFLPs de *secY* y *rp* representan linajes distintos. La síntesis de estos cebadores se hizo por la misma compañía que llevo a cabo la síntesis de los anteriores.

Tabla 2.1. Cebadores utilizados para amplificar los genes *GroEL*, *SecA*, *SecY*, *IMP* con palmas positivas al AL.

Gen	Secuencias	Referencia
<i>GroEL</i>	groEL-F1 (5'-GAAGAACAACAACCACTATC-3')	Comunicación personal Nigel Harrison- Florida USA.
	groEL-R1 (CTTTAGGACCAAAAGGTACT-3')	
	groEL-F2 (5'-GAACTACAGCGGCTCCTGTTGTAAT-3')	
	groEL-R2 (5'-CGATAATGCTGGAGATGGGACTACT-3')	
TPD-<i>SecA</i>	TPD-secA-F1 (CTTCTGTTTTGCCTGCTTAT)	Comunicación personal Nigel Harrison- Florida USA.
	TPD-secA-F2 (CTGGAGAAAGCGTTCATATT)	
	TPD-secA-R1 (CTTGATGCAAACCTTCACTA)	
<i>SecY</i>	AysecYF1(5'-CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGG3')	Lee, et al. (2006)
	AysecYR1 (5'-CAGAAGCTTGAGTGCCTTTACC-3')	
Imp	IMP-532F1 (5'-ATTATTAGGCAGCGGAACAG-3')	Comunicación personal Nigel Harrison- Florida USA.
	IMP-2570R1 (5'-TGGTGGATTTGGAGATAGAG-3')	
	IMP-586F2 (5'-TTAGGCAGCGGAACAGGAAA-3')	
	IMP-2127R2 (5'-TAGCGGTTCAATTCCATTG-3')	

Para la purificación de los productos de PCR obtenidos con cada uno de los genes que se analizaron en el presente trabajo, se tomaron las alícuotas de 25 µl generados por las reacciones de PCR y se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y fueron visualizados en un transluminador con luz UV.

El producto de PCR amplificado fue cortado del gel y el ADN fue extraído usando el estuche Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de la marca Zymo Research de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para la clonación de los fragmentos amplificados se utilizó el estuche InstAclone PCR Cloning Kit de la marca Thermo Scientific con el vector pTZ57R/T; de acuerdo con el tamaño del fragmento amplificado fue la cantidad de producto de PCR purificado que se utilizó para la reacción de ligación. La clonación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Una vez que el producto de PCR se clonó en el plásmido, se inició el proceso de transformación en bacterias, para esto se tomaron 5 μ L del plásmido recombinante obtenido de la reacción de ligación, y se incubaron con 150 μ L de células competentes *E. coli* Top-10 por un lapso de 20 min en hielo, seguidamente la mezcla se procedió a incubar en baño María a 42°C por un periodo de 45 s e inmediatamente después en hielo por 2 min. Después de concluir el tiempo de incubación en hielo, los tubos de células competentes fueron colocados a temperatura ambiente por 30 min aproximadamente y posteriormente, en campana de flujo laminar fueron agregados 1,000 mL de medio LB, la mezcla se incubó a una temperatura de 37°C por 1 hora a 200 rpm.

Una vez concluida la hora de incubación, las células con medio LB, fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min a 20°C, la pastilla formada por centrifugación fue resuspendida en 150 μ L de medio LB sin antibiótico, que posteriormente fue transferida en placas de medio LB con ampicilina 20 ng/ μ L y X-Gal; se dejaron incubar toda la noche. Las colonias transformadas de color blanco se picaron y se colocaron, individualmente, en tubos falcon de 15 mL con medio LB, dejándose incubar toda la noche. De igual forma se realizó una reacción de PCR con los cebadores M13 para corroborar tanto la presencia del inserto como del plásmido antes de colocar los tubos en la incubadora.

Después de corroborar la presencia del plásmido junto con la del inserto, las colonias de bacteria aisladas se dejaron crecer toda la noche a 37°C para luego poder purificar el plásmido. La purificación del plásmido recombinantes se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo Zyppy Plasmid MiniPrep Kit. Las inserciones clonadas se secuenciaron en la compañía Davis Sequencing, Inc., CA, EUA.

2.6 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS Y DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA *GROEL*, *SECA*, *SECY* E *IMP*

Para el análisis de las secuencias de los productos de PCR obtenido de los diferentes cebadores, se llevó a cabo mediante el programa Chromas pro para la eliminación de las impurezas que estas pudieran tener al momento de la secuenciación, seguidamente al aislar la secuencia pura se eliminó el vector media el programa bioinformático del NCBI VecScreen.

El análisis de similitud de las secuencias que se obtuvieron se realizó con el programa Blast de igual manera de la base de datos del NCBI. Las secuencias se compararon con las depositadas en la bae datos del GenBank para luego descargar aquella con la que presentara mayor porcentaje de identidad y mediante Clustal-W realizar el alineamiento y obtener nuestras secuencias consenso.

Para el diseño de los cebadores específicos de cada juego de cebadores se usó el programa Prime 3 plus utilizando las secuencias consenso que se obtuvieron, que en este caso solo fueron las de los cebadores *GroEL* y *SecA*; los cuales fueron los únicos de los que se pudo aislar sus secuencias y se pudo diseñar cebadores específicos.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL *GROEL*

Se utilizaron muestras de palmas infectadas que previamente se habían caracterizado con las cepas 16SrIV-A y 16SrIV-D. Se amplificó el gen *GroEL*, contemplando las siguientes condiciones de PCR: 2 min de desnaturalización a 94°C, 1:20 min de hibridación a 58°C, y 1 min a 72°C para extensión, por 35 ciclos, al final 10 min a 72°C para complementar la extensión de la cadena.

En la Figura 3.1 se observa el gel de agarosa al 1%, de los productos de PCR anidada amplificados en ADN de palmas positivas a amarillamiento letal con los cebadores *GroELF1*, *GroELR1* para la primera ronda y *GroELF2*, *GroELR2* para la segunda ronda, se analizaron un total de 5 muestras de palmas, las cuales tres fueron de cocotero infectadas con el fitoplasma del subgrupo -A y otras 2 con infectadas con el fitoplasma del subgrupo -D, como el caso de *A. merrillii* y un control negativo para evitar algún indicio de contaminación y corroborar que nuestra reacción de PCR se llevó de la manera correcta. Se aprecia que, de 5 muestras analizadas, las encontradas en los carriles 1-3 muestran un producto amplificado de aproximadamente 1500 kb en base nuestro marcador de peso molecular de 1kb PreciGene. La amplificación solo ocurrió en palmas infectadas con la cepa 16SrIV-A.

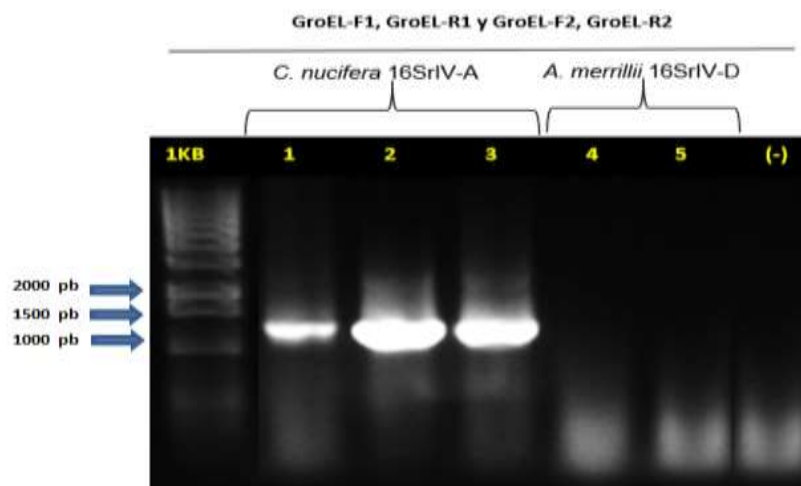


Figura 3.1. Amplificación de ADN palmas utilizando los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2. La banda de 1500 pb indica la presencia de ADN de fitoplasma. Los carriles 1-3 muestran amplificación de ADN de *C.nucifera* infectados con el fitoplasma 16SrIV-A. Los carriles 4 y 5 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16SrIV-D. (-) control negativo.

Los ensayos con cebadores del gen *GroEL* se repitieron para corroborar la reproducibilidad de las condiciones de PCR evaluando el mismo ADN de palmas infectadas. Se buscaba que los perfiles de amplificación fueran reproducibles cada vez que se repitieran los ensayos y poder establecer las condiciones de PCR para amplificar ADN de fitoplasmas, en base a los diferentes ensayos que se llevaron a cabo se logró establecer las condiciones de amplificación para los cebadores del gen *GroEL*, en ADN de palmas enfermas al amarillamiento letal de la cepa 16SrIV-A, mostrando un producto de 1500 pb aproximadamente, sin embargo, parte importante del presente trabajo es amplificar, también la 16SrIV-D. Por lo tanto, se optó en realizar ensayos evaluando diferentes gradientes de temperatura de hibridación que permitiera la amplificación del fitoplasma del subgrupo 16SrIV-D. Se evaluaron cuatro gradientes de temperatura de hibridación: 40°C, 42°C, 45°C y 50°C. Se tomó una muestra como control positivo y se conservó la temperatura de partida de 58 °C para la muestra control, y para la muestra de ADN de palma infectada con el fitoplasmas 16SrIV-D se sometió a los diferentes gradientes para tratar de obtener un producto amplificado.

En la Figura 3.2 se aprecia el gel de agarosa al 1% donde se observan los diferentes gradientes de temperatura de hibridación evaluadas, siendo la de 50°C la que mostró un producto amplificado de aproximadamente 1500 pb, amplificando ADN de fitoplasma del subgrupo 16SrIV-D.

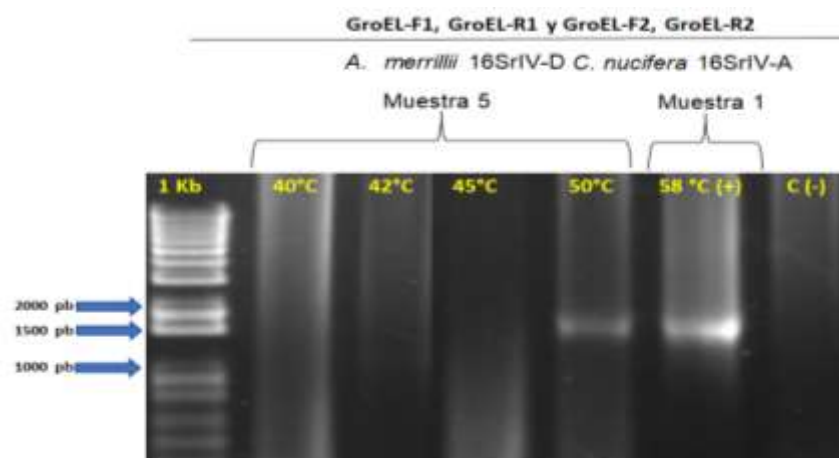


Figura 3.2. Gel de agarosa de los productos amplificados del gen *GroEL* con diferentes gradientes de temperatura. Se observa que la temperatura que mostró un producto amplificado fue la de 50°C para la muestra de palma positiva a la cepa de fitoplasma perteneciente al subgrupo 16SrIV-D. (+) Control positivo, ADN de palma infectada con el fitoplasma del 16SrIV-A, (-) control negativo.

El control positivo mostro un producto amplificado del tamaño correspondiente para estos cebadores confirmando que con la temperatura de hibridación de 58°C las muestras de ADN infectadas con el fitoplasma del subgrupo –A amplificaban sin problema alguno. Sin embargo, como se mencionó anteriormente también se requiere que con los mismos cebadores podamos establecer condiciones de amplificación para el fitoplasma del subgrupo –D. Al evaluar diferentes gradientes de temperatura de hibridación manteniendo las demás condiciones de PCR para amplificar *GroEL*, se logró obtener un producto amplificado con 50 °C de hibridación del tamaño de la muestra control siendo esto favorable para poder evaluar muestras de palmas positivas a 16SrIV-A y 16SrIV-D. En base a los resultados obtenidos con los gradientes de temperatura se obto por evaluar muestras de palmas infectadas con ambas cepas de fitoplasmas tanto –A como –D se contemplaron las mismas condiciones de PCR para amplificar el gen *GroEL* de fitoplasmas siendo la temperatura de hibridación la que se modificó bajándola a 50°C en

base al resultado que se obtuvo con los gradientes, manteniendo las demás condiciones de PCR; 2 min de desnaturalización a 94 °C, 1:20 min de hibridación a 50 °C, y 1 min a 72 °C para extensión, por 35 ciclos, al final 10 min a 72°C para complementar la extensión de la cadena, esto con el objetivo de poder amplificar muestras infectadas con las cepas de fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D. Se obtuvo un producto amplificado de 1,500 pb aproximadamente para el ADN de palmas positivas al subgrupo -A y -D. Los diferentes ensayos que se realizaron con la modificación en la temperatura de hibridación permitieron amplificar ADN de fitoplasmas de los dos subgrupos que se tienen como referencia, favorable para el propósito que se busca obtener con nuestros sets cebadores; el de amplificar ambas cepas, cosa que no se había podido hacer en los análisis donde se mantenía de una temperatura de hibridación de 58°C, por lo que al tener estos resultados se decidió mantener la temperatura de hibridación de 50 °C como un parámetro fijo en las condiciones de amplificación del gen *GroEL*. En la Figura 3.3 se observan los diferentes productos amplificados en ADN de palmas enfermas con los subgrupos de fitoplasmas -A y -D. El tamaño del producto amplificado que se obtuvo presentó un tamaño 1,500 pb aproximadamente.

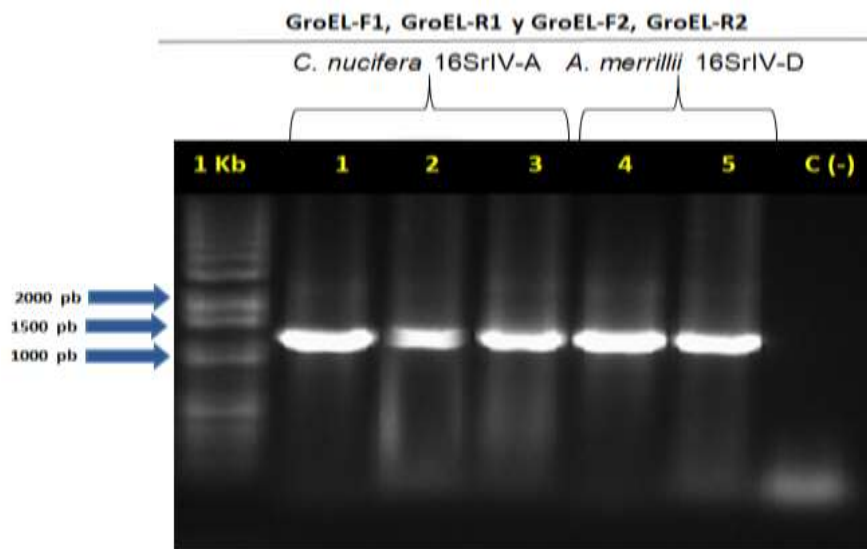


Figura 3.3. Productos de PCR amplificados con los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2, los carriles 1, 2, 3 corresponden a ADN *C. nucifera* infectado con el fitoplasma 16SrIV-A y los carriles 4 y 6 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16S IV-D. El tamaño del producto amplificado corresponde a 1500 Pb. C (-) representa el control negativo.

Los productos amplificados fueron aislados, clonados y enviados a secuenciar a una compañía externa (Universidad de Davis, EUA). Las secuencias que se obtuvieron de los productos amplificados con los cebadores del gen *GroEL* fueron alineadas entre sí con Clustal-W para obtener como resultado las secuencias consenso (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Secuencias consenso obtenidas de los productos de PCR amplificados con los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL- F2 y GroEL-R2.

Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen <i>GroEL</i> en ADN de palma de <i>C. nucifera</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-A.	Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen <i>GroEL</i> en ADN de palma <i>A. merrillii</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-D.
CAAATTAATAAAGCAATCGTTAAAAAGATAACACAGTT TTAGTTGGTGATAACAAAACGGAATCTTAATAGAAAGA ATTAAAGAAATTGAATCACATATTAAATAACAACATAAT GATTATGATTTACAAAATTTAAATCTCGTTTAGCTAAT TTATCTGGAGGAGTGGCAGTTATTAAAGTTGGTTCAATG ACTGAAGCTGAGTTAAAAGAACAATAAATAAAGATTGAA GATGCTTTAAATGCTACTCAAGCTGCTTTAGATGAAGGT ATATCTGTTGGTGGTGGAAAATCTTTAATTAATGTTTAT AAAAATTTAAAAGATATTTAAAAAATGATAATAGTGAT ATTCAAAGGGAATGAATATTGTTTTAGAAAAGTTTATTA TCCCCCTCTTATCAAATTGCCGAGAATTCTGGTTTTGAT GGAGATACTGTTGTAAAAAACAATTAAACAGAAAGAA GAAAGTTTTGGTTTTGATTCTAAAGAAGGTAAATATGTT GATTTAATCAAAAAAGGTATTATTGATCCTACTAAAGTT ACTAGACAAGCGATTTTAAATTCTGCTTCAATTGCTTCT GTTATAATTACAACAGGAGCCGCTGTAGTTCA	TGATAACAAAACGGAATCTTTAATAGAAAGAATTAAAGA AATTGAATCACATATTAAATAACAACATAATGATTATGA TTTACAAAATTTAAATCTCGTTTAGCTAATTTATCTGG AGGAGTGGCAGTTATTAAAGTTGGTTCAATGACTGAAGC TGAGTTAAAAGAACAATAAATAAAGATTGAAGATGCTTT AAATGCTACTCAAGCTGCTTTAGATGAAGGTATATCTGT TGGTGGTGGAAAATCTTTAATTAATGTTTATAAAAAATTT AAAAGATATTTAAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAA GGGAATGAATATTGTTTTAGAAAAGTTTATTATCCCTTC TTATCAAATTGCCGAGAATTCTGGTTTTGATGGAGATAC TGTGTAAAAAACAATTAAACAGAAAGAAGAAAGTTT TGGTTTTGATTCTAAAGAAGGTAAATATGTTGATTAAAT CAAAAAAGGTATTATTGATCCTACTAAAGTTACTAGACA AGCGATTTTAAATTCTGCTTCAATTGCTTCTGTTATAAT TACAACAGGAGCCGCTGTAGTTCA

Las secuencias consenso que se obtuvieron de *GroEL* fueron comparadas con las reportadas en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional para la información en Biotecnología (NCBI-National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nih.gov/>) mediante el programa Blast-N del mismo sitio, para conocer el nivel de identidad de nuestras secuencias consenso con las reportadas en el banco de datos; tal y como se aprecia en la Tabla 3.2 las secuencias obtenidas de ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A en el caso de *C. nucifera* y 16SrIV-D en el caso de *A. merrillii* que previamente habían sido caracterizadas con el gen 16Sr presentaron un porcentaje de identidad de 100% y 99% con la secuencia de fitoplasma del gen *GroEL* del amarillamiento letal del GenBank.

Tabla 3.2. Análisis de homología de secuencias obtenidas de los productos amplificados gen *GroEL*, mediante BLAST-N, en ADN de palmas de *C. nucifera* infectadas con el fito 16SrIV-A y *A. merrillii* infectadas con el fitoplasma 16SrIV-D

Secuencia	Accesión del GenBank	% identidad	% cobertura	Valor de E
<i>C. nucifera</i> 16SrIV-A GroEL.	KY779619.1 Gen del fitoplasma 'Cocos nucifera' (groEL), cds completos. (Cepa 16SrIV-A)	100%	98%	0.00
<i>A. merrillii</i> 16SrIV-D GroEL.	KY779619.1 Gen del fitoplasma 'Cocos nucifera' (groEL), cds completos. (Cepa 16SrIV-A)	99%	99%	0.00

Para corroborar estos resultados fue necesario llevar acabo ensayos que ayudaran a discernir un poco entre los dos subgrupos de fitoplasmas. De igual manera por cuestiones de impurezas encontradas en las secuencias además de posibles errores de secuenciación no se obtuvo la secuencia completa por lo que fue necesario realizar otros ensayos amplificando nuevamente ADN de palmas infectadas con los dos subgrupos de fitoplasmas de referencia y en base a eso proceder a la elaboración de cebadores específicos que definitivamente serian herramientas para el desarrollo de diagnóstico y la filogenia final de los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Para hacer más eficiente la reacción de PCR y poder amplificar ADN de fitoplasma con títulos bajos y evitar cualquier error en la secuenciación, se realizó un alineamiento in-silico del gen *GroEL* del Amarillamiento Letal con los cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2 y en base a ellos definir qué combinaciones de cebadores podrían amplificar un producto de tamaño considerable para la filogenia, (Figura 3.4).

TATAAAAAATTAGAATCCATCATAGGA GAAGAACAACAACCACTATC ATTAGATTGTTCTTTAACTG GAACTACAGCGGCTCCTGTT
 STAAT TATAACAGAAGCAATTGAAGCAGAATTTAAAATCGCTTGTCTAGTAACCTTTAGTAGGATCAATAATACCTTTTTGATTAAATC
 AACATATTTACCTTCTTTAGAATCAAAACCAAACTTTCTTCTTCTGTTTTAATTGTTTTTTACAACAGTATCTCCATCAAAACCAGA
 ATTCTCGGCAATTTGATAAGAAGGGGATAATAAACTTTCTAAAACAATATTCATTCCTTTTGAATATCACTATTATCATTTTTTAAAA
 TATCTTTTAAATTTTTATAAACATTAAATTAAGATTTTCCACCACCAACAGATATACCTTCATCTAAAGCAGCTTGAGTAGCATTAAAA
 GCATCTTCAATTCTTAATTTTTGTTCTTTAACTCAGCTTCAGTCATTGAACCAACTTTAATAACTGCCACTCCTCCAGATAAATTAGC
 TAAACGAGATTTTAAATTTTGTAATCATAATCATTAGTTGTTATTTAATATGTGATTCAATTTCTTAAATTTCTTCTATTAAAGATTCC
 GTTTTGTTATCACCAACTAAAACGTGTTATCTTTTTTAACGATTGCTTTATTAATTTGCTTAAATGTTTCATATTAACATCTTGTAAAT
 TTCATATTTAAATCTTTAGATATAAAAAGTAGCTTTAGATAAAGCACATATATCTTTCAGTAATCTTTTTGATTATCTCCGAATCCTGG
 AGCTTCAGTAGCAACAACATTAATAAACTCCGCTTATTTTATTAATAAACTAAAGAATTAATAACATCTGTTTCAAAAGAATCAGCAATAA
 TTAACAAAGGAATAGAAGATTTAACTATTTCTTCTAACAAAAACGAATTTTCATGTATATTATTTATTTTATGATCAGTAACATAAATAG
 ATACTTTTTCTAAATCAATAGACATATTTCTTATTAGTAATAAAATGAGGTGAACATAACCTTTATCATATTGCATCCCTTGAACA
 ACTTCTAATTTCTGTTTCAAAACCTTTAGATTTCATCAACACTAATAACACCTTTTTTAGTAACCTTTTCCATAGCAGAGGCTATTATTTT
 ACCTATTGATTTTTGTCTGAAGAAATAGAAGCAATATTTCAATATCCTCTTGCGTTACAACAGGTTTTGATTTTTCTAAAAGTTTTT
 TAGCAACTAAATCAGCAGCTTTTAAATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTTAGAACCGGATTCAACAAATTTAAACCTTTATTAAT
 CATATACTGAGCTAAAACAGTTGCAGTAGTAG TCCCATCTCCAGCATTATCG TTAGTTTTACTAGCAGCTTCACATACTAATTTTGCA
 CCCATATTTTGATAAAGATTCTTTAATTCATTTCTTTAGCTATTGTAACCTCATATTACAAGCAATAATAGAATCATTTTTTTGTAAA
 ACAACATTAGTACCTTTTGGTCTCTAAAGTCGATTTAACAGTATTTGCTAAAATATTTACACCTTTTAAATTTCTCTTCTAGCATCTTTT
 CCAAAAAGAATTTCTTTAGCCAT

F1-GroEL- GAAGAACAACAACCACTATC.
 R1-GroEL- AGTACCTTTTGGTCTCTAAAG.
 F2-GroEL- GAACTACAGCGGCTCCTGTTGTAAT.
 R2-GroEL- AGTAGTCCCATCTCCAGCATTATCG.

Figura 3.4. Alineamiento in-silico del gen GroEL del AL (cepa 16SrIV-A) con sus cebadores correspondientes para una mejor amplificación de ADN de fitoplasmas con títulos bajos.

Al realizar el alineamiento in-silico de los cebadores de GroEL se consideró una combinación de cebadores F2, R1 para la primera ronda y F2, R2 para la segunda ronda; que podrían ser usados para la amplificación de muestras con títulos bajos de ADN de fitoplasmas en una semi-nested PCR. Las condiciones de PCR que se emplearon para la reacción fueron las que ya se habían estado usando en los primeros ensayos; se consideró la temperatura de hibridación de 50°C y se mantuvo los demás parámetros; 2 min de desnaturalización a 94°C y 1 min a 72°C para extensión, por 35 ciclos, al final 10 min a 72°C. Se obtuvo un producto amplificado de aproximadamente 1300 pb de acuerdo a nuestra escalera de 1kb DNA Ladder numero de catálogo (GBR204), en ADN de palmas infectadas con la cepa -A y -D. Sin embargo, esto se comprobaría mediante secuenciación.

En la Figura 3.5 se observan los diferentes productos amplificados en ADN de palmas enfermas con los subgrupos de fitoplasmas -A y -D. El tamaño del producto amplificado que se obtuvo presentó un tamaño 1300 pb aproximadamente como se había predicho en el análisis in-silico de la secuencia del gen *GroEL* del fitoplasma del amarillamiento letal de cocotero. Se evaluaron un total de cinco muestras de ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas -A y -D, buscando confirmar los resultados que se obtuvieron en la primera etapa del proyecto donde se había logrado amplificar y secuenciar ADN de fitoplasmas de ambas cepas. A diferencia de los primeros análisis, se tomó en cuenta la combinación de cebadores que se propusieron al hacer el análisis in-silico. Se amplificó ADN de *C. nucifera*, *A. merrillii* y *P. dactylifera* que previamente se había evaluado con el gen 16S rRNA y había resultado positiva al fitoplasma 16SrIV-D por lo que se evaluó de igual manera con *GroEL*.

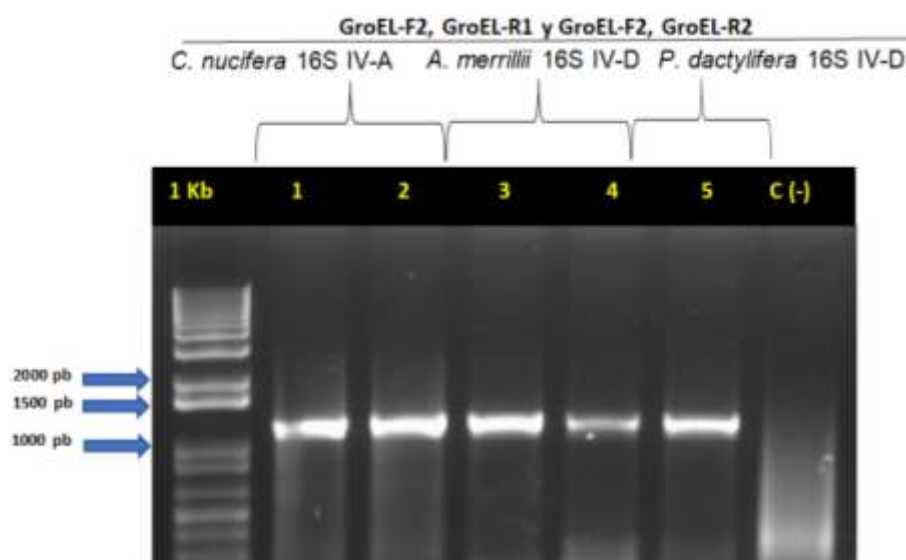


Figura 3.5. Amplificación de ADN palmas utilizando los cebadores GroEL-F2, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2. La banda de 1300 pb indica la presencia de ADN de fitoplasma. Los carriles 1-2 muestran amplificación de ADN de *C.nucifera* infectados con el fitoplasma 16SrIV-A. Los carriles 3 y 4 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16SrIV-D, y el carril 5 corresponde a ADN *P. dactylifera* infectada con el fitoplasma 16S IV-D. C (-) control negativo

Los productos amplificados que se obtuvieron se purificaron con el estuche Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de la marca Zymo Research de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la clonación de cada fragmento amplificado, se utilizó el estuche InsTAclone PCR Cloning Kit de la marca Thermo Scientific con el vector Ptz57R/T; de acuerdo con el tamaño del fragmento amplificado fue la cantidad de producto de PCR purificado que se requirió para la ligación. La clonación se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Las inserciones clonadas se secuenciaron completamente en la compañía Davis Sequencing, Inc., CA, EUA. Todas las muestras fueron clonadas tres veces para tratar de disminuir los errores de secuenciación lo mínimo posible, y de esa manera obtener la secuencia consenso. En la Tabla 3.3 se observan las secuencias consenso que se obtuvieron al amplificar ADN de palmas infectadas con fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Tabla 3.3. Secuencias consenso obtenidas de los productos de PCR amplificados con la combinación de cebadores GroEL-F2, GroEL-R1, GroEL- F2 y GroEL-R2.

Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen GroEL en ADN de palma de <i>C. nucifera</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-A.	Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen GroEL en ADN de palma <i>A. merrillii</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-D.
GCTGGAGAATGGGACTAGCTCTACTTCAGGCAATAAACTTAGA AGAATCACACGTTGAGCCAGAGAAATGCTTCTATTTCTTCAGGA CAAAAACCAATGGGTAAATAATAGCCTCTGCTATGGAAAAGGTT ACTAAAAAGGTGTTATTAGTGTGATGAATCTAAAGGTTTGTAA ACAGAATTAGAAGTTGTTCAAGGATGCAATATGATAAAGGTTAT GTTTCACCTCATTTTATTACTAATAAGGAAATATGCTATTGAT TTAGAAAAAGTATCTATTTAGTTACTGATCATAAAATAAATAA TATACATGAAATTCGTTTTTTGTTAGAAGAAATAGTTAAATCTTC TATTCCTTTGTTAATTATGCTGATTCTTTGAAACAGATGTTAT TAATTCCTTTAGTTTTTAATAAAATAAGCGGAGTTTTTAATGTTGT TGCTACTGAAGCTCCAGGATTCGGAGATAATCAAAAAGAAATTACT GAAAGATATATGTGCTTTATCTAAAGCTACTTTTATATCTAAAGA TTTAAATATGAAATTACAAGATGTTAATATGAACATTTAGGACA AATTAATAAAGCAATCGTTAAAAAGATAACACAGTTTGTGTTGG TGATAACAAAACGGAATCTTTAATAGAAAGAAATTAAAGAAATTGA ATCACATATTAATAAACAATAATGATTATGATTCAAAAATTT AAAATCTCGTTTAGCTAATTTATCTGGAGGAGTGGCAGTTATTAA AGTTGGTTCAATGACTGAAGCTGAGTTAAAAGAACAAAATTAAG AATTGAAGATGCTTTAAATGCTACTCAAGCTGCTTTAGATGAAGG TATATCTGTTGGTGGTGGAAAACTTTAATTAATGTTTATAAAAA TTTAAAGATATTTTAAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAAGGG AATGAATATGTTTTAGAAAGTTTATTATCCCCCTCTTATCAAT TGCCGAGAATCTGGTTTTGATGGAGATACTGTTGTAAAAAACA ATTAACACAGAAAGAAAGTTTTGGTTTTGATTCTAAAGAGG TAAATATGTTGATTAAATCAAAAAGGTATTATTGATCCTACTAA AGTTACTAGACAAGCGATTTTAAATCTGCTTCAATTGCTTCTGT TATAATTACAACAGGAGCCGCTGTAGTTCA	ACCATTGAAACGCTGCGAGTAGTGTCAAAACCTTGAATCAA CGTTAGCAGAGAATTGAAAATGCTCATTCTCAGACAAAATC AATGTAATATAGGCCTCCGCTTGAAGTACTAAAAGGTAT AGTGTGATGATCTAAAGTTTGACAGATAGAAGGTGTCAA GGGATGCATATGATAAAGTATGTTACCTCATTTTATTACT ATAAGAAAATATGTCTATGATTAGAAAAAGTATCCTATTTT AGTACTGATCATAAAATAAATAATATACATGAAATTCGTTT TTGTTAGAAGAAATAGTTAAATCTTCTATTCCTTTGTTAAT TATTGCTGATTCTTTGAAACAGATGTTATTAAATCCTTTAG TTTTTAATAAAATAAGCGGAGTTTTTAATGTTGTGCTACT GAAGCTCCAGGATTCGGAGATAATCAAAAAGAATTACTGAA AGATATATGTGCTTTATCTAAAGCTACTTTTATATCTAAAG ATTTAAATATGAAATTACAAGATGTTAATATGAACATTTA GGACAAATTAATAAAGCAATCGTTAAAAAGATAACACAGT TTTAGTTGGTGATAACAAAACGGAATCTTTAATAGAAAGAA TTAAAGAAATTGAATCACATATTAATAAACAATAATGAT TATGATTTACAAAATTTAAATCTCGTTTAGCTAATTTATC TGGAGGAGTGGCAGTTATTAAAGTTGGTTCAATGACTGAAG CTGAGTTAAAAGAACAAAATTAAGAATTGAAGATGCTTTA AATGCTACTCAAGCTGCTTTAGATGAAGGTATATCTGTTGG TGGTGGAAAATCTTTAATTAATGTTTATAAAAAATTTAAAG ATATTTTAAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAAGGGAATG AATATTGTTTTAGAAAGTTTATTATCCCCCTCTTATCAAA TGCCGAGAATCTGGTTTTGATGGAGATACTGTTGTAAAAA AACAAATTAACAGAAAGAAAGTTTTGGTTTTGATTCT AAAGAAGGTAAATATGTTGATTAAATCAAAAAGGTATTAT TGATCCTACTAAAGTTACTAGACAAGCGATTTTAAATCTG CTTCAATTGCTTCTGTTATAATTACAACAGGAGCCGCTGTA GTTCA

Las secuencias que se obtuvieron de los productos amplificados de la palma *P. dactylifera* no mostraron resultados favorables probablemente a que los clones enviadas no tenían la pureza adecuada. Por lo que no se pudieron realizar los análisis bioinformáticos correspondientes. Las secuencias se compararon con las depositadas en base de datos del GenBank con el uso de la herramienta bioinformática Blast-N disponible en la página del NCBI para observar su similitud. Los resultados obtenidos en la segunda etapa de análisis confirman hasta el momento que los cebadores del gen *GroEL* que se han estado utilizando, además de las modificaciones realizadas a las condiciones de PCR, son capaces de amplificar ADN de palmas infectadas por los fitoplasmas del 16SrIV-A y 16SrIV-D. En la Tabla 3.4 se aprecia el porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas con las encontradas en la base de datos del GenBank.

Tabla 3.4. Análisis de homología de secuencias obtenidas de los productos amplificados con el gen *GroEL*, mediante BLAST-N, en ADN de palmas de *C. nucifera* infectadas con el fitoplasma 16SrIV-A y *A. merrillii* infectadas con el fitoplasma 16SrIV-D.

Secuencia	Accesión del GenBank	% identidad	% cobertura	Valor de E
<i>C. nucifera</i> 16SrIV-A GroEL	KY779619.1 Gen del fitoplasma 'Cocos nucifera' GroEL (groEL), cds completos.	99.73%	98%	0.00
<i>A. merrillii</i> 16SrIV-D GroEL	KY779619.1 Gen del fitoplasma 'Cocos nucifera' GroEL (groEL), cds completos.	96.52%	96%	0.00

Las secuencias consenso de los productos amplificados fueron alineadas y comparadas con las encontradas en la base de datos del GenBank y en base a eso se procedió al diseño de cebadores específicos para la amplificación de plantas infectadas con los fitoplasmas de las cepas -A y -D. En la Figura 3.6 se observa un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con los cebadores del gen *GroEL* con las reportadas en la base de datos, el alineamiento se realizó utilizando la herramienta Clustal-W, se observaron zonas semejantes, así como variables dentro del alineamiento.

```

IV-A C. nucifera -----GCTGGAGAA-----
IV-D A. merrillii -----ACC---AT-----
LY-groEL KY779619.1 AAAAATGATTCTATTATTGCTTGAATGATGGAGTTACAATAGCTAAAGAAATAGAATTA
* *

IV-A C. nucifera -----
IV-D A. merrillii -----
LY-groEL KY779619.1 AAGAATCTTTATCAAATATGGGTGCAAAATTAGTATGTGAAGCTGCTAGTAAACTAAC

IV-A C. nucifera -----TGGGACTA-----
IV-D A. merrillii -----TGAAC-----
LY-groEL KY779619.1 GATAATGCTGGAGATGGGACTACTACTGCAACTGTTTGTAGCTCAGTATATGATTAATAAA
* *

IV-A C. nucifera -----GCTCTACTTCAGGCAA-----
IV-D A. merrillii -----GCTGCGACTAG-----
LY-groEL KY779619.1 GGTTTTAAATTTGTTGAATCCGGTTCTAAAGCTGTTCTGCTTAGAGAAAGGAATTTTAAAA
* *

IV-A C. nucifera -----TA---AAAA---CTTAGAAGAATCACA---CATTGAGCC---AGAG
IV-D A. merrillii -----TGTCAAAA---CCTTGAA---TCA-A---CGTTAG---C---AGAG
LY-groEL KY779619.1 GCTGCTGATTAGTTGCTAAAAAATCTTTAGAAAAATCAAAACCTGTTGTAACGCAAGAG
* * * * *

IV-A C. nucifera AA-----ATTGCTTCTATTCTTCA--GGACAAAAACAATGGGTAAATAATAGC
IV-D A. merrillii AA-----TTGAAATGCTCATTCTCAGACAAAA--TCAATGT---AAATATAGGC
LY-groEL KY779619.1 GATATTGAAATATTGCTTCTATTCTTCA--GGACAAAAACAATAGGTAAATAATAGC
* * * * *

IV-A C. nucifera CTCTGCTATGGAAAAAGGTTACTAAAAAGGTTTATTAGTGTGTGATGAATCTAAAGGTTT
IV-D A. merrillii CTCCGCT-TGAAAG---TACTAAAA--GGTAT---AGTGTGATGA-TCTAAAG--TT
LY-groEL KY779619.1 CTCTGCTATGGAAAAAGGTTACTAAAAAGGTTTATTAGTGTGTGATGAATCTAAAGGTTT
* * * * *

IV-A C. nucifera TGAACAGAAATAGAAAGTTGTTCAAGGGATGCAATATGATAAGGTTATGTTTCACCTCA
IV-D A. merrillii TGAA-CAGA--TAGAAGGTGT-CAAGGGATGCA-TATGATAAG--TATGTT-CACCTCA
LY-groEL KY779619.1 TGAACAGAAATAGAAAGTTGTTCAAGGGATGCAATATGATAAGGTTATGTTTCACCTCA
* * * * *

IV-A C. nucifera TTTTATTACTAATAAGGAAAAATATGCTATTGATTGAGAAAAAGTATC-TATTTTAGTT
IV-D A. merrillii TTTTATTACTA-TAAG-AAAAATATGCTAT-GATT--AGAAAAAGTATCCTATTTTAGTT-
LY-groEL KY779619.1 TTTTATTACTAATAAGGAAAAATATGCTATTGATTGAGAAAAAGTATC-TATTTTAGTT
* * * * *

IV-A C. nucifera AAAGATTTAAATATGAAATTACAAGATGTTAATATGAAACATTTAGGACAAATTAATAAA
IV-D A. merrillii AAAGATTTAAATATGAAATTACAAGATGTTAATATGAAACATTTAGGACAAATTAATAAA
LY-groEL KY779619.1 AAAGATTTAAATATGAAATTACAAGATGTTAATATGAAACATTTAGGACAAATTAATAAA
* * * * *

IV-A C. nucifera GCAATCGTTAAAAAGATAACACAGTTTGTAGTTGGTGATAACAAAACGGAATCTTTAATA
IV-D A. merrillii GCAATCGTTAAAAAGATAACACAGTTTGTAGTTGGTGATAACAAAACGGAATCTTTAATA
LY-groEL KY779619.1 GCAATCGTTAAAAAGATAACACAGTTTGTAGTTGGTGATAACAAAACGGAATCTTTAATA
* * * * *

IV-A C. nucifera GAAAGAATTAAAGAAATGAATCACATATTAATAACAACCTAATGATTATGATTACAA
IV-D A. merrillii GAAAGAATTAAAGAAATGAATCACATATTAATAACAACCTAATGATTATGATTACAA
LY-groEL KY779619.1 GAAAGAATTAAAGAAATGAATCACATATTAATAACAACCTAATGATTATGATTACAA
* * * * *

IV-A C. nucifera AATTTAAATCTCGTTTAGCTAATTTATCTGGAGGAGTGGCAGTTATTAAAGTTGGTTCA
IV-D A. merrillii AATTTAAATCTCGTTTAGCTAATTTATCTGGAGGAGTGGCAGTTATTAAAGTTGGTTCA
LY-groEL KY779619.1 AATTTAAATCTCGTTTAGCTAATTTATCTGGAGGAGTGGCAGTTATTAAAGTTGGTTCA
* * * * *

IV-A C. nucifera ATGACTGAAGCTGAGTTAAAGAACAATAAAGAAATTGAAGATGCTTTAAATGCTACT
IV-D A. merrillii ATGACTGAAGCTGAGTTAAAGAACAATAAAGAAATTGAAGATGCTTTAAATGCTACT
LY-groEL KY779619.1 ATGACTGAAGCTGAGTTAAAGAACAATAAAGAAATTGAAGATGCTTTAAATGCTACT
* * * * *

IV-A C. nucifera CAAGCTGCTTTAGATGAAGGTATATCTGTTGGTGGTGAAAAATCTTTAATTAAATGTTTAT
IV-D A. merrillii CAAGCTGCTTTAGATGAAGGTATATCTGTTGGTGGTGAAAAATCTTTAATTAAATGTTTAT
LY-groEL KY779619.1 CAAGCTGCTTTAGATGAAGGTATATCTGTTGGTGGTGAAAAATCTTTAATTAAATGTTTAT
* * * * *

IV-A C. nucifera AAAAATTTAAAGATATTTTAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAGGGAATGAATATT
IV-D A. merrillii AAAAATTTAAAGATATTTTAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAGGGAATGAATATT
LY-groEL KY779619.1 AAAAATTTAAAGATATTTTAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAGGGAATGAATATT
* * * * *

IV-A C. nucifera GTTCA-----
IV-D A. merrillii GTTCA-----
LY-groEL KY779619.1 GTTCAAGTTAAAGAACAATCTAATGATAGTGGTGTGTTCTCTCTATGATGGATT
* * * *

```

Figura 3.6. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso obtenidas con los cebadores del gen GroEL de las cepas de fitoplasmas –A y –D con a encontrada en la base de datos del GenBank.

En esta segunda etapa de análisis de ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16srIV-A y 16SrIV-D, se corroboran los resultados obtenidos con las secuencias de los estudios realizados en la primera etapa ya que las secuencias obtenidas de las palmas de *C. nucifera* infectado con la cepa -A y *A. merrillii* infectado con la cepa -D mostraron el mismo comportamiento al momento de realizar los estudios bioinformáticos correspondientes de su secuencias, y con base a eso se desarrolló cebadores propios específicos capaces de amplificar ambas cepas de fitoplasmas mediante el programa Primer 3 Plus mostrados en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Cebadores específicos para amplificar ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Cebadores	Subgrupo	Cebadores	Subgrupo
F1groelA:GAAGAACAACAACCACTATC	IV-A	F1groelD:GAAGAACAACAACCACTATC	IV-D
F2groelA:GAACTACAGCGGCTCCTGTTGTAAT	IV-A	F1groelD:GAACTACAGCGGCTCCTGTTGTAAT	IV-D
R1groelA:CTTTAGGACCAAAAGGTACT	IV-A	R1 groelD:TTGAAAATGCTCATTCTC	IV-D
R1groel:CGATAATGCTGGAGATGGGACTACT	IV-A	R2 groelD:AAATATAGGCCTCCGCT	IV-D

Con el nuevo diseño de cebadores se esperaba amplificar sin problemas ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas más prevalecientes en la región de la Península de Yucatán, de igual forma obtener una caracterización del grupo IV de fitoplasmas causantes del a enfermedad del Amarillamiento Letal en palmas de cocotero y en otras especies de palma de importancia económica. Con lo que se ha obtenido hasta ahora podría realizarse una filogenia preliminar para observar la agrupación de nuestras secuencias en los diferentes subgrupos de fitoplasmas que conforman el grupo IV.

3.2. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN SECA

Para la amplificación en PCR anidada del gen *SecA* se usaron los cebadores TPD-SecAF1, TPD-SecAR1, para la primera ronda y TPD-SecAF2, TPD-SecAR2, para la segunda ronda con las siguientes condiciones: 94°C por 2 min de desnaturalización, 58°C por 2 min de alineamiento y 72°C por tres min de extensión por un lapso de 35 ciclos y 72 °C 10 min en el ciclo final. Se evaluaron muestras de palmas positivas con al AL pertenecientes al subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D, cepas de referencia para este estudio, mismas que previamente también fueron analizadas con *GroEL*. En la Figura 3.7 se observan los resultados obtenidos de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados, los cuales presentan diferentes números de bases y no corresponden al que se reportado por el Dr. Nigel Harrison.

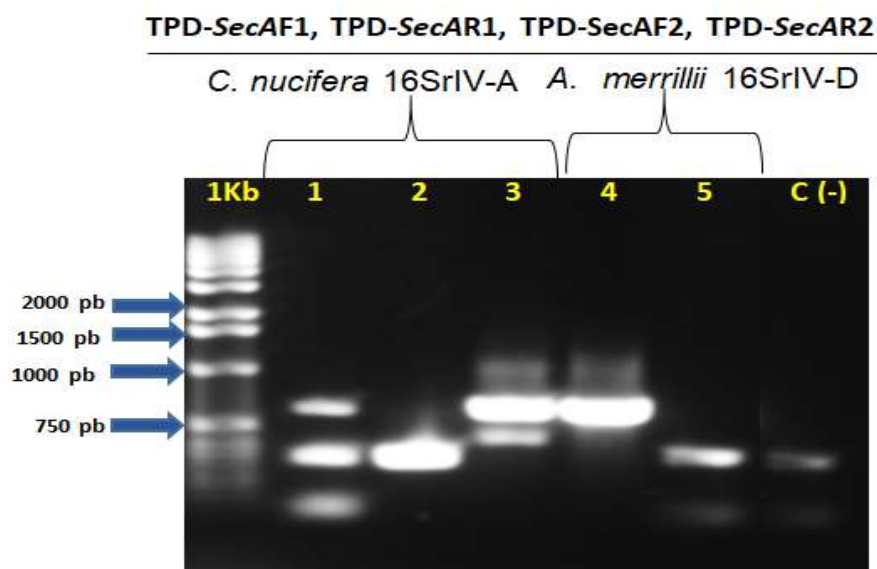


Figura 3.7. Productos de PCR amplificados con los cebadores *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF2*, *TPD-SecAR2*, los carriles 1, 2, 3 corresponde a ADN de *C. nucifera* 16SrIV-A y las muestras 4 y 5 pertenecen *A. merrillii* 16S IV-D, C (-),

Con base en los resultados anteriores, se decidió repetir el ensayo modificando la temperatura de hibridación con el fin de poder amplificar el tamaño de fragmento de interés deseado ya que para este gen se espera se obtenga un producto de 750 pb aproximadamente y en base a la escalera GeneRuler 1Kb DNA Ladder los productos amplificados fueron variables en cuanto a su tamaño, por lo que se decidió hacer un ajuste a la temperatura de hibridación como se mencionó anteriormente subiendo a 60 °C tratando de hacer un poco más específica la reacción de PCR.

En la Figura 3.8 se observan productos amplificados de diferentes tamaños que se obtuvieron al modificar la temperatura de alineamiento a 60°C para los cebadores del gen *SecA*, sin embargo ningún producto amplificado presentó el tamaño correspondiente a lo reportado para este gen (750 pb), la variación del tamaño de los productos amplificados, muestra que quizá todavía es necesario seguir evaluando otras condiciones que permita un patrón homogéneo en los diferentes perfiles de los productos amplificados y que sobre todo esas condiciones de PCR que se evalúen permita la reproducción de los resultados cada vez que los ensayos fueran repetidos.

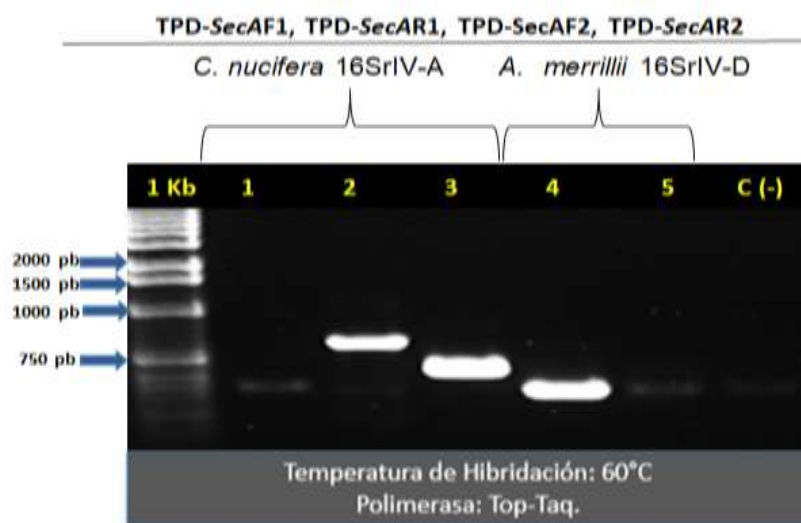


Figura 3.8. Productos de PCR amplificados con los cebadores *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF2*, *TPD-SecAR2*, los carriles 1, 2, 3 representa ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma 16SrIV-A y los carriles 4 y 5 representan ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma 16SrIV-D, C (-), control negativo. Se realizaron ajustes a la temperatura de hibridación a 60°C.

Los productos de amplificados del gen *SecA* fueron más variables en su tamaño, impidiendo tener un resultado favorable que pudiera ser considerado como dato reproducible en los dos casos en que se evaluaron, por lo que se decidió realizar, una revisión bibliográfica más profunda donde pudiéramos encontrar cebadores degenerados que pudieran servir para el análisis de nuestras muestras. Hodgetts et al. (2008) reportaron el uso del gen *SecA* para una mejor resolución entre diferentes especies de fitoplasmas incluyendo el del grupo 16SrIV, el cual mostros buenos resultados con las diferentes cepas de fitoplasmas que se analizaron, pero sobre todo a la hora de la caracterización filogenética mostrando la eficiencia del gen *SecA* como un excelente marcador molecular. Del trabajo de Hodgetts se tomaron los cebadores SecAfor1 (5'-GARATGAAACTGGRGAAGG-3'), SecAfor2 (5'-GAYGARGSWAGAACKCCT3').

Se descargó la secuencia del gen *SecA* de la base de datos del GenBank y se hizo un estudio in-silico de nuestros cebadores TPD-*SecA* y los SecAfor obtenidos de la bibliografía, alineándolos dentro la secuencia del gen *SecA* con el propósito de ver la región dentro del mismo gen *SecA* donde nuestros cebadores se alineaban bien y de esa manera usarlos para amplificar ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D que no se habían podido amplificar los proporcionados por el Dr. Nigel Harrison.

En la Figura 3.9, se observa exclusivamente la región dentro el gen *SecA* de AL que se obtuvo del GenBank, donde las secuencia de los cebadores proporcionados por el Dr. Harrison y los de Hodgetts se alinean de una manera correcta y que podrían ser útiles para hacer ensayos usando diferentes combinaciones de los mismos, con la obtención de un amplicón de 683 pb, por lo que se procedió a realizar la amplificación mediante una semi-nested PCR contemplando las condiciones de PCR que se habían descrito anteriormente para los cebadores TPD-*SecA*.

>EU267187.1 Palm lethal yellowing phytoplasma preprotein translocase subunit (secA) gene, complete cds.

```

GAAATGAAAAGTGGAGAAGGTAAACTTTGACTTCTGTGTTACCTGCTTATTGAATGCTTTAAGCGGG
GAAAGTGTTTCATATTGTCACCTGTTAATGAATATTTAGCTGATAGAGAAGCTAATGGATTGATAGGTAAA
GTTTTTAAATTTTATAGGATTATCTGTAGGATTAAATATTTAAATCAAAAAATATTGAAGCAAAAAACAA
GCTTATGAATGTGATATTTTGTATTCTACTAATAGTGAATTAGGATTTGATTATTTAAGAGATAATATG
GAAATGAAATTTTCTAATATTTTAATGAAAAGAAAATATAACTATGCAATTTTAGATGAAGTTGATTCA
ATTTTGATTGACGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTCTAATCAAACAAAACAAAATATTCATTTTTAT
AGGGATTTCAGATCGTTTTGTTAAAAAACTGAAAAGAGGATCATTATCTTATTGATTTAGAATCTAAAACT
ATAGAATTAACGGAATCAGGAATTAAGGCGGAAATTTTTTTTCAAACAAAAGATCTTTATAATTTCG
AAAAATTATATTTTATTACATTGTATTAAAAACGCTTTAAAGCTTATTTTATTGAAAAAAATAAA
GATTATTTAGTAGAAAAAGATAAAGTTTTAATTATCGATCATTTTACAGGAAGAATTTTGCATGGACGT
CAATTAGTGAAGGATTACATCAAG
>SecAfor1: GARATGAAAAGTGGRGG
>TPD-SecAF1: CTTCTGTTTTGCCTGCTTAT
>TPD-SecAR1: TAGTGAAGGTTTGCATCAAG

```

Figura 3.9. Alineamiento de los cebadores TPD-SecA y SecAfor, con el gen SecA del AL en cocotero, para llevar acabo la amplificación mediante PCR anidado.

Se propusieron para el gen SecA usar las combinaciones de cebadores: SecAfor1, TPD-SecAR1, TPD-SecAF1, TPD-SecAR1 en una semi-nested PCR, ya que al alinearlos con la secuencia del gen SecA fueron los que alinearon de manera correcta, por lo que se usaron para amplificar ADN de fitoplasmas de las cepas –A y –D. Las condiciones de PCR que se emplearon, fueron las que previamente se habían descrito para los cebadores TPD-SecA. Se eligieron muestras positivas a los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D que conforman el grupo IV de la enfermedad del amarillamiento letal en diversas especies de palmas (Figura 3.10).

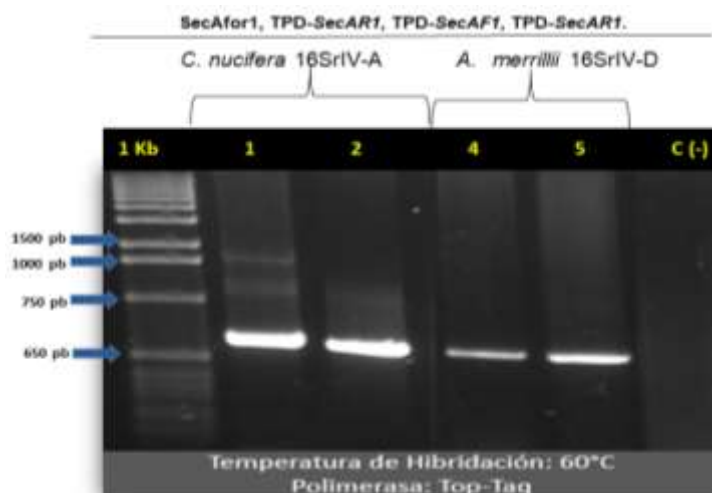


Figura 3.10. Productos de PRC amplificados con los cebadores SecAfor1, TPD-SecAR1, TPD-SecAF1, TPD-SecAR1. Con la combinación de los cebadores del gen SecA. Se obtuvo un producto amplificado de 683 Pb aproximadamente tanto para las muestras de ADN de palmas de *C. nucifera* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-A y en ADN de palmas de *A. merillii* infectadas con el fitoplasma del 16SrIV-D. C (-) control negativo.

Se obtuvo un producto amplificado de aproximadamente 683 pb según la escalera GeneRuler 1 Kb Ladder numero de catálogo (GBR204). Los ensayos se repitieron varias veces con la finalidad de reproducir los resultados y de esa manera afirmar que las condiciones de PCR fueran las adecuadas para amplificar ADN de fitoplasmas del grupo 16SrIV. Los productos amplificados se procesaron y fueron enviados a secuenciar para corroborar ciertamente que los productos de PCR amplificados correspondieran a los dos subgrupos de fitoplasmas de referencia en este estudio. Las secuencias que se obtuvieron se analizaron con la herramienta BLAST del NCBI, para la búsqueda de similitudes locales entre secuencias. Se compararon las secuencias con las de la base de datos del GenBank. BLAST sirvió para identificar a qué tipo de familia de genes presenta similitudes nuestras secuencias de nucleótidos, (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Alineación de las secuencias obtenidas de los productos amplificados con el gen *SecA*, comparadas con las encontradas en la base de datos del GenBank.

Secuencia	Accesión del GenBank	% identidad	% cobertura	Valor de E
<i>C. nucifera</i> 16SrIV-A <i>SecA</i>.	EU267187.1 Palm Lethal Yellowing Phytoplasma protein Translocase subunit (<i>SecA</i>) gene, complete cds.	99%	99%	0.00
	KF751386.1 Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D <i>SecA</i> (<i>SecA</i>) gene partial cds.	93%	99%	0.00
<i>A. merrillii</i> 16SrIV-D <i>SecA</i>.	EU267187.1 Palm Lethal Yellowing Phytoplasma protein Translocase subunit (<i>SecA</i>) gene, complete cds	99%	99%	0.00
	KF751386.1 Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D <i>SecA</i> (<i>SecA</i>) gene partial cds.	92%	99%	0.00

Las secuencias consenso se compararon con las de la base de datos del GenBank y como se observó en la tabla anterior tanto las secuencias de las palmas *A. merrillii*, como las de *C. nucifera* presentaron un porcentaje de identidad que los relaciona muy cercanamente a los dos subgrupos de fitoplasma 16SrIV-A y 16SrIV-D del gen *SecA*. Sin embargo, entre ellas existió una similitud más cercana relacionándose más al subgrupo -A que al subgrupo -D del grupo IV de fitoplasmas que causan la enfermedad del amarillamiento letal en diferentes especies es de palmas de carácter económico.

Mediante un alineamiento múltiple de las secuencias que se obtuvieron de los productos amplificados con el gen *SecA* utilizando la herramienta Clustal-W, para observar semejanza y diferencias entre ellas. Se realizó un análisis profundo encontrando zonas variables entre ellas como se observa en la Figura 3.11 que podrían ser útil en determinado caso para la elaboración de cebadores específicos, así como el desarrollo de un sistema multiplex que nos permita la detección de las cepas -A y -D en una sola reacción de PCR.

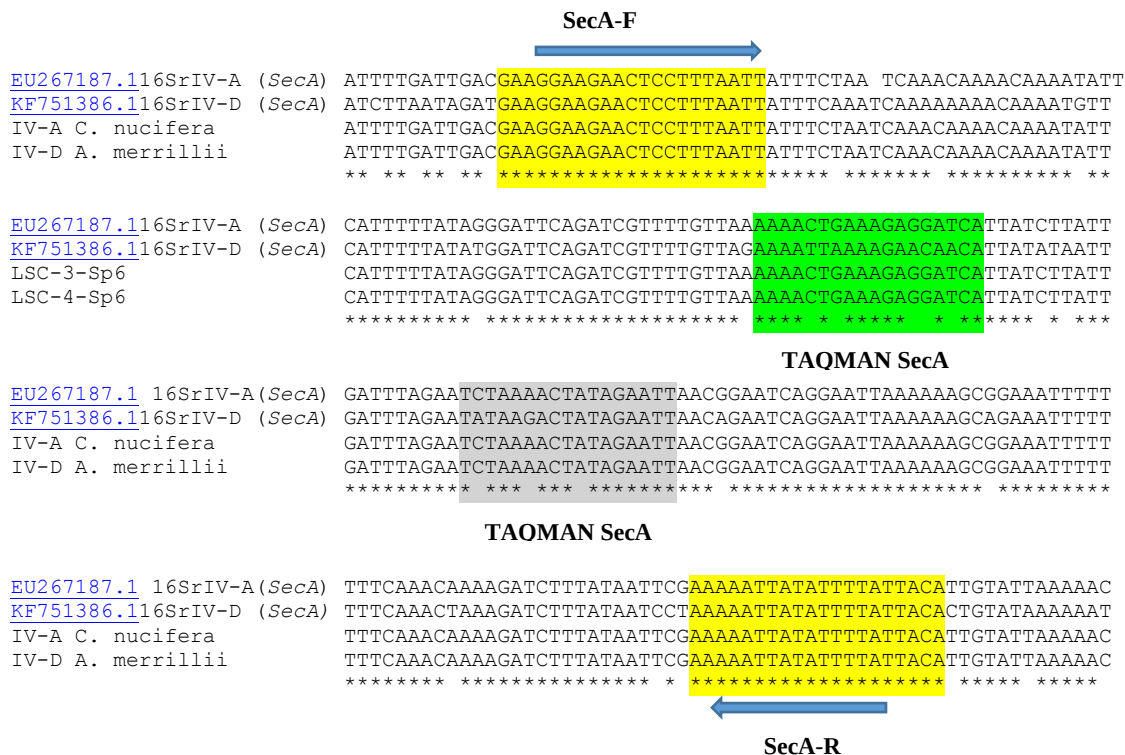


Figura 3.11. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *SecA* de los dos subgrupos de referencia 16SrIV-A, 16SrIV-D y las secuencias de los productos amplificados.

La propuesta de un sistema multiplex ayudará con diagnóstico mucho más rápido para la detección de amarillamiento letal en las plantaciones de cocotero como otras especies de palmas que pudieran estar siendo afectadas por las dos cepas de fitoplasmas características presentes en el estado de Yucatán. Además, sería una excelente modelo para el desarrollo de nuevos diseños de cebadores más eficaces para la detección y caracterización de los fitoplasmas que afectan a las diferentes especies de palmeras, no solo nacional sino también a nivel internacional.

Para corroborar los resultados obtenidos en la primera etapa de ensayos realizados con los cebadores que amplifican el gen *SecA* de fitoplasma en ADN de palmas infectadas con las cepas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D, se evaluaron nuevamente ADN palmas de importancia económica como *C. nucifera*, *A. merrillii* y *P. dactylifera* que al igual que *A. merrillii* se encontró positiva a la cepa IV-D de fitoplasmas que causan el AL de acuerdo al gen 16S ARNr. En la Figura 3.12 se observa un gel de agarosa con los productos de PCR de las muestras de palmas amplificadas con los cebadores *SecAfor1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*. Se observa un producto amplificado de aproximadamente 683 pb para la muestras positivas las dos cepas -A y -D que conforman el grupo IV de fitoplasmas causantes del amarillamiento letal.

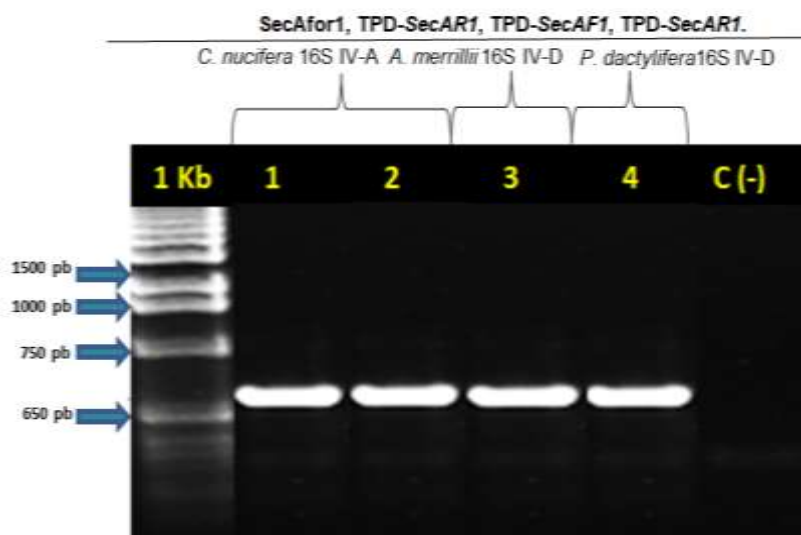


Figura 3.12. Productos de PCR amplificados con los cebadores *SecAfor1*, *TPD-SecAR1*, *TPD-SecAF1*, *TPD-SecAR1*. Se obtuvo un producto amplificado de 750 Pb aproximadamente tanto para las muestras de ADN de palmas de *C. nucifera* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-A, en ADN de palmas de *A. merillii* y *P. datilyfera* infectadas con el fitoplasmas del 16SrIV-D. C (-) control negativo.

Los productos de PCR amplificados que se obtuvieron se purificaron con el estuche Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de la marca Zymo Research de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la clonación de cada uno de los fragmentos amplificados se utilizó el estuche InstAclone PCR Cloning Kit de la marca Thermo Scientific con el vector Ptz57R/T, en relación al tamaño del fragmento amplificado fue la cantidad de producto de PCR purificado que se requirió para la ligación. La clonación se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Las inserciones clonadas se secuenciaron completamente en la compañía Davis Sequencing, Inc., CA, EUA. Todas las muestras fueron clonadas tres veces para tratar de disminuir los errores de secuenciación lo más que se pudiera y de esa manera obtener las secuencias consenso. En la Tabla 3.7 se observa las secuencias consenso que se obtuvieron al amplificar ADN de palmas infectadas con fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Tabla 3.7. Secuencias consenso obtenidas de los productos de PCR amplificados con la combinación de cebadores SecAfor1, TPD-SecAR1, TPD-SecAF1, TPD-SecAR1.

Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen <i>SecA</i> en ADN de palma de <i>P. datyifera</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-d.	Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen <i>SecA</i> en ADN de palma de <i>A. merrillii</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-D.	Secuencia consenso obtenida con los cebadores del gen <i>SecA</i> en ADN de palma de <i>C. nucifera</i> infectada con el fitoplasma 16SrIV-A.
TGCATCTAGATTCTTCTGTTTTGCCTGCT TATTTAAATCTTTAACTGGAGAAAGTGTA CATATTGTAACGTGTTAATGAATATTTAGCC GATAGAGAAGCTAATGGTTTAATAGGTAA AGTTTTTAATTTTTAGGTTTGTCTGTAGG ATTAAATATTAATCAAAATAATATAGAAG AGAAAAAAAAGCTTATGAATGTGATATT TTATATTCTACCAATAGTGAATTAGGATTT GATTATTTAAGAGACAATATGGAAATGAA ATTTTCTAATGTTTTGATGAAAAGAAAATA TAATTATGCAATTTTAGATGAAGTTGATTC GATTTTAATAGATGAAGGAAGAACTCCTT TAATTATTTCTAATCAAAAGAAACAAAATG TTCATTTTTATATGGATTTCAGATCGTTTTG TTAGAAAATTTAAAGAACACATTATATAA TTGATTTTGAATATAAACTATAGAATTAA CAGAATCAGGAATTAAGAAAGCAGAAATT TTTTTCAAACATAAGATCTTTATAATCCT AAAAATTATATTTTATTACACTGTATAAAA AATGCTTTAAAGCTCATTTTACTTTAGAA AAAAACAAAGATTATTTAGTAGAAAAAA CAAAGTTTTAATTATTGATCATTTTACAGG AAGAATTTACATGGTCGCCAATTTAGTG AAGGTTTGCATCAAGAA	TGCATCTAGATTCTTCTGTTTTGCCTGCT TATTTAAATCTTTAACTGGAGAAAGTGTA CATATTGTAACGTGTTAATGAATATTTAGCC GATAGAGAAGCTAATGGTTTAATAGGTAA AGTTTTTAATTTTTAGGTTTGTCTGTAGG ATTAAATATTAATCAAAATAATATAGAAG AGAAAAAAAAGCTTATGAATGTGATATT TTATATTCTACCAATAGTGAATTAGGATTT GATTATTTAAGAGACAATATGGAAATGAA ATTTTCTAATGTTTTGATGAAAAGAAAATA TAATTATGCAATTTTAGATGAAGTTGATTC GATTTTAATAGATGAAGGAAGAACTCCTT TAATTATTTCTAATCAAAAGAAACAAAATG TTCATTTTTATATGGATTTCAGATCGTTTTG TTAGAAAATTTAAAGAACACATTATATAA TTGATTTTGAATATAAACTATAGAATTAA CAGAATCAGGAATTAAGAAAGCAGAAATT TTTTTCAAACATAAGATCTTTATAATCCT AAAAATTATATTTTATTACACTGTATAAAA AATGCTTTAAAGCTCATTTTACTTTAGAA AAAAACAAAGATTATTTAGTAGAAAAAA CAAAGTTTTAATTATTGATCATTTTACAGG AAGAATTTACATGGTCGCCAATTTAGTG AAGGTTTGCATCAAGAA	TCTTCTGTTTTGCCTGCTTATTTGAATGCT TTAAGCGGGGAAAGTGTCATATTGTCAC TGTTAATGAATATTTAGCTGATAGAGAAG CTAATGGATTGATAGGTAAGTTTTTAAA TTTTTAGGATTATCTGTAGGATTAATATT AAATCAAAAAATATTGAAGCAAAAAACA AGCTTATGAATGTGATATTTTGTATTCTAC TAATAGTGAGTTAGGATTTGATTATTTAA GAGATAATATGGAAATGAAATTTTCTAAT ATTTTAATGAAAAGAAAATATAACTATGCA ATTTTAGATGAAGTTGATTCAATTTTGATT GACGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTT TAATCAAAACAAAACAAAATATTCAATTTTA TAGGGATTTCAGATCGTTTTGTTAAAAAAC TGAAAGAGGATCATTATCTTATTGATTAA GAATCTAAACTATAGAATTAACGGAATC AGGAATTAAGAAAGCGGAAATTTTTTTTC AAACAAAAGATCTTTATAATTCGAAAAATT ATATTTTATTACATTGTATTAAAAACGCTT TAAAGCTTATTTTATTTTAGAAAAAATA AAGATTATTTAGTAGAAAAAGATAAAGTTT TAATTATCGATCATTTTACAGGAAGAATTT TGCATGGACGTCATTTAGTGAAGGTTTG CATCAAGA

Las secuencias se compararon con las depositadas en base de datos del GenBank con el uso de la herramienta bioinformática Blast-N disponible en la página del NCBI. Los resultados obtenidos en la segunda etapa de análisis confirman, hasta el momento, que los cebadores del gen *SecA* que se han estado utilizando, junto con las modificaciones que se le realizaron a las condiciones de PCR son capaces de amplificar ADN de palmas infectadas por los fitoplasmas del 16SrIV-A y 16SrIV-D. En la Tabla 3.8 se aprecia el nivel de identidad de las secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBank. Las secuencias consenso de los productos amplificados, fueron alineadas y comparadas con las encontradas en la base de datos del GenBank y en base a eso se diseñaron cebadores específicos para la amplificar plantas infectadas con los fitoplasmas de las cepas -A y -D.

Tabla 3.8. Análisis de similitud de las secuencias consenso obtenidas con el gen *SecA*, comparadas con las encontradas en la base de datos del Gen Bank.

Secuencia	Accesión del GenBank	% identidad	% cobertura	Valor de <i>E</i>
<i>C. nucifera</i> 16SrIV-A <i>SecA</i>.	EU267187.1 Palm Lethal Yellowing Phytoplasma protein Translocase subunit (<i>SecA</i>) gene, complete cds.	99.27%	99%	0.00
	KF751386.1 Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D <i>SecA</i> (<i>SecA</i>) gene partial cds.	92,54%	99%	0.00
<i>A. merrillii</i> 16SrIV-D <i>SecA</i>.	EU267187.1 Palm Lethal Yellowing Phytoplasma protein Translocase subunit (<i>SecA</i>) gene, complete cds	90.80%	97%	0.00
	KF751386.1 Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D <i>SecA</i> (<i>SecA</i>) gene partial cds.	96.79%	97%	0.00
<i>P. datylifera</i> 16SrIV-D <i>SecA</i>.	EU267187.1 Palm Lethal Yellowing Phytoplasma protein Translocase subunit (<i>SecA</i>) gene, complete cds	90.80%	97%	0.00
	KF751386.1 Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D <i>SecA</i> (<i>SecA</i>) gene partial cds	96.79%	97%	0.00

En la Figura 3.13 se observa un alineamiento múltiple de las secuencias que obtuvimos con los cebadores del gen *SecA* con las encontradas en la base de datos; el alineamiento se realizó utilizando la herramienta Clustal-W, se observaron zonas semejantes, así como variables dentro del alineamiento.

```

EU267187.116SrIV-A (SecA) CAAGGAAAAATAGCTGAAATGAAACTGGAGAAGGTAAACCTTGACTTCTGTCTTACCT
KF751386.116SrIV-D (SecA) -----GAGATGAAACTGGAGAAGGTAAACCTTAACTTCTGTCTTGCCCT
IV-A C. núcifera -----TCTCTGTCTTGCCCT
IV-D A. merrillii -----TGCAT-CTAGA-----TT--CTTCTGTCTTGCCCT
IV-D P. datylifera -----TGCAT-CTAGA-----TT--CTTCTGTCTTGCCCT
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) GCTTATTGAATGCTTAAAGCGGGAAAGTGTTCATATTGTCACTGTTAATGAATATTTA
KF751386.116SrIV-D (SecA) GCTTATTGAATGCTTAAAGCGGGAAAGTGTTCATATTGTCACTGTTAATGAATATTTA
IV-A C. núcifera GCTTATTGAATGCTTAAAGCGGGAAAGTGTTCATATTGTCACTGTTAATGAATATTTA
IV-D A. merrillii GCTTATTGAATGCTTAAAGCGGGAAAGTGTTCATATTGTCACTGTTAATGAATATTTA
IV-D P. datylifera GCTTATTGAATGCTTAAAGCGGGAAAGTGTTCATATTGTCACTGTTAATGAATATTTA
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) GCTGATAGAGAAGCTAATGGATT-GATAGGTAAAGTTTTTAATTTTTTAGGATTATCTGT
KF751386.116SrIV-D (SecA) GCTGATAGAGAAGCTAATGGATT-GATAGGTAAAGTTTTTAATTTTTTAGGATTATCTGT
IV-A C. núcifera GCTGATAGAGAAGCTAATGGATT-GATAGGTAAAGTTTTTAATTTTTTAGGATTATCTGT
IV-D A. merrillii GCTGATAGAGAAGCTAATGGATT-GATAGGTAAAGTTTTTAATTTTTTAGGATTATCTGT
IV-D P. datylifera GCTGATAGAGAAGCTAATGGATT-GATAGGTAAAGTTTTTAATTTTTTAGGATTATCTGT
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) AGGATTAATATTAATCAAAA-AATATTGAAGCAAAAAACAAGCTTATGAATGTGATA
KF751386.116SrIV-D (SecA) AGGATTAATATTAATCAAAA-AATATTGAAGCAAAAAACAAGCTTATGAATGTGATA
IV-A C. núcifera AGGATTAATATTAATCAAAA-AATATTGAAGCAAAAAACAAGCTTATGAATGTGATA
IV-D A. merrillii AGGATTAATATTAATCAAAA-AATATTGAAGCAAAAAACAAGCTTATGAATGTGATA
IV-D P. datylifera AGGATTAATATTAATCAAAA-AATATTGAAGCAAAAAACAAGCTTATGAATGTGATA
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) TTTTCTATTCTACTAATAGTGAATTAGGATTGATTATTTAAGAGACAATATGGAATGA
KF751386.116SrIV-D (SecA) TTTTCTATTCTACTAATAGTGAATTAGGATTGATTATTTAAGAGACAATATGGAATGA
IV-A C. núcifera TTTTCTATTCTACTAATAGTGAATTAGGATTGATTATTTAAGAGACAATATGGAATGA
IV-D A. merrillii TTTTCTATTCTACTAATAGTGAATTAGGATTGATTATTTAAGAGACAATATGGAATGA
IV-D P. datylifera TTTTCTATTCTACTAATAGTGAATTAGGATTGATTATTTAAGAGACAATATGGAATGA
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) AATTTTCTAATATTTTATGAAAAGAAAATATAATATGCAATTTTAGATGAAGTTGATT
KF751386.116SrIV-D (SecA) AATTTTCTAATATTTTATGAAAAGAAAATATAATATGCAATTTTAGATGAAGTTGATT
IV-A C. núcifera AATTTTCTAATATTTTATGAAAAGAAAATATAATATGCAATTTTAGATGAAGTTGATT
IV-D A. merrillii AATTTTCTAATATTTTATGAAAAGAAAATATAATATGCAATTTTAGATGAAGTTGATT
IV-D P. datylifera AATTTTCTAATATTTTATGAAAAGAAAATATAATATGCAATTTTAGATGAAGTTGATT
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) CAATTTTGATGACGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTCTAATCAAAACAAAACAAATG
KF751386.116SrIV-D (SecA) CAATTTTGATGATGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTCTAATCAAAACAAAACAAATG
IV-A C. núcifera CAATTTTGATGACGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTCTAATCAAAACAAAACAAATG
IV-D A. merrillii CGATTTTATAGATGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTCTAATCAAAACAAAACAAATG
IV-D P. datylifera CGATTTTATAGATGAAGGAAGAACTCCTTTAATTATTTCTAATCAAAACAAAACAAATG
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) TTCATTTTATATGGATTGAGATCGTTTGTGTAAGAAATGAAAGAGGATCATTATCTTA
KF751386.116SrIV-D (SecA) TTCATTTTATATGGATTGAGATCGTTTGTGTAAGAAATGAAAGAGGATCATTATCTTA
IV-A C. núcifera TTCATTTTATATGGATTGAGATCGTTTGTGTAAGAAATGAAAGAGGATCATTATCTTA
IV-D A. merrillii TTCATTTTATATGGATTGAGATCGTTTGTGTAAGAAATGAAAGAGGATCATTATCTTA
IV-D P. datylifera TTCATTTTATATGGATTGAGATCGTTTGTGTAAGAAATGAAAGAGGATCATTATCTTA
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) TTGATTTGAATCTAAACTATAGAATTAACGAATCAGGAATTAAGAAAGCGAAATTT
KF751386.116SrIV-D (SecA) TTGATTTGAATCTAAACTATAGAATTAACGAATCAGGAATTAAGAAAGCGAAATTT
IV-A C. núcifera TTGATTTGAATCTAAACTATAGAATTAACGAATCAGGAATTAAGAAAGCGAAATTT
IV-D A. merrillii TTGATTTGAATCTAAACTATAGAATTAACGAATCAGGAATTAAGAAAGCGAAATTT
IV-D P. datylifera TTGATTTGAATCTAAACTATAGAATTAACGAATCAGGAATTAAGAAAGCGAAATTT
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) TTTTTCAAACAAAAGATCTTTATAATCTGAAAAATTATATTTTATTACATGTATAAAA
KF751386.116SrIV-D (SecA) TTTTTCAAACAAAAGATCTTTATAATCTGAAAAATTATATTTTATTACATGTATAAAA
IV-A C. núcifera TTTTTCAAACAAAAGATCTTTATAATCTGAAAAATTATATTTTATTACATGTATAAAA
IV-D A. merrillii TTTTTCAAACAAAAGATCTTTATAATCTGAAAAATTATATTTTATTACATGTATAAAA
IV-D P. datylifera TTTTTCAAACAAAAGATCTTTATAATCTGAAAAATTATATTTTATTACATGTATAAAA
***** **

EU267187.116SrIV-A (SecA) GATTACATCAAGCTTTAGAAGTTAAAGAAGGATGCACCGTTAAAGAAGAAACAGATATTT
KF751386.116SrIV-D (SecA) GATTACATCAAGCTTTAGAAGTTAAAGAAGGATGCACCGTTAAAGAAGAAACAGATATTT
IV-A C. núcifera GATTACATCAAG-----
IV-D A. merrillii GATTACATCAAG-----
IV-D P. datylifera GATTACATCAAG-----
***** **

```

Figura 3.13. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso con Clustal-W obtenidas con los cebadores que amplifican la región del gen *SecA* de las cepas de fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D con sus homologas encontradas en la base de datos del GenBank.

En la segunda etapa de análisis de muestras de ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16srIV-A y 16SrIV-D se corroboran los resultados obtenidos en las secuencias de los estudios previos realizados de la primera etapa, ya que las secuencias que se obtuvieron de las palmas de *C. nucifera* infectadas con la cepa -A y *A. merrillii* infectada con la cepa -D mostraron el mismo comportamiento al momento de realizar los estudios bioinformáticos correspondientes de las mismas y en base a eso se llevó acabo el desarrollo de cebadores específicos capaces de amplificar ambas cepas de fitoplasmas, mediante el programa Primer 3 Plus. En este caso también se amplificó ADN de otra especie de palma que al igual que la palma de cocotero y la *A. merrillii* es considerada de importancia económica, los estudios previos realizados al ADN de esta especie de palma con el gen 16S ARNr resultó positiva a la cepa –D, por lo que se decidió evaluar con los cebadores del gen *SecA* para verificar los resultados obtenidos con el gen 16S ARNr. La secuencia consenso que obtuvo del producto amplificado se comparó con las depositada en la base de datos del GenBank y coincidió en un 96.76 % de identidad con el gen de Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D *SecA* (*SecA*) gene partial cds ([KF751386.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KF751386.1)) que se encuentra depositado en la base de datos del GenBank. Con las secuencias que se obtuvieron se diseñaron cebadores específicos para amplificar las dos cepas de fitoplasmas de interés (IV-A y IV-D) reportados en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Cebadores específicos del gen *SecA*, para amplificar ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Cebadores	Subgrupo
F1secA: ATGCTTTAAGCGGGGAAAGT	IV-A y IV-D
F2secA: TCACTGTTAATGAATATTTA	IV-A y IV-D
R1secA: CCTTGTCTTCCTGAACGTCCT	IV-A y IV-D
R2secA: ACTGATTGTCAATCCTTCTG	IV-A y IV-D

Con estos nuevos cebadores que se diseñaron se busca amplificar un fragmento más grande del gen *SecA* de ambas cepas de fitoplasmas, ya que nos será más favorable para al momento de desarrollar la filogenia, mostrándonos relaciones filogenéticas un poco más abierta entre los diferentes subgrupos que conforman el grupo IV de fitoplasmas que causan la enfermedad del Amarillamiento Letal en palmas.

3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN SECY

Se amplificó el gen *SecY* con ADN de palmas positivas al amarillamiento letal de las cepas -A y -D. Los productos de PCR visualizados en un gel de agarosa, señala que las muestras presentan un perfil de amplificación diferente; los tamaños en las bandas varían notablemente en todas las muestras y la presencia de cierto número de bandas en cada carril no permite documentarlo como un dato verdadero, por lo que fue necesario realizar más ensayos (Figura 3.14).

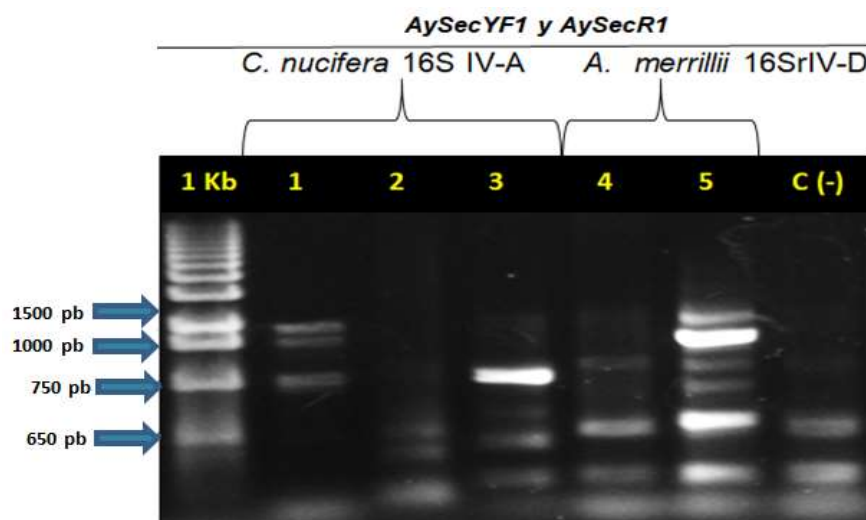


Figura 3.14. Productos de PCR anidado corridos en electroforesis en gel de agarosa usando los cebadores AySecYF1 y AySecYF2 en ADN de *C. nucifera* presentes en los carriles 1, 2,3 infectadas con el fitoplasma del 16SrIV-A y en ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D presente en los carriles 4 y 5 a una temperatura de alineamiento de 58 °C por un minuto. C (-) control negativo.

Se realizó un ajuste en la temperatura de alineamiento a 60°C, la cual anteriormente era de 58°C con el propósito de obtener un solo producto amplificado o varios, pero homogéneos y no variables. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar las bandas amplificadas con la modificación en la temperatura de hibridación. En la Figura 3.15 se distinguen los resultados obtenidos en esta prueba, realizada de igual forma con los cebadores del gen *SecY*.

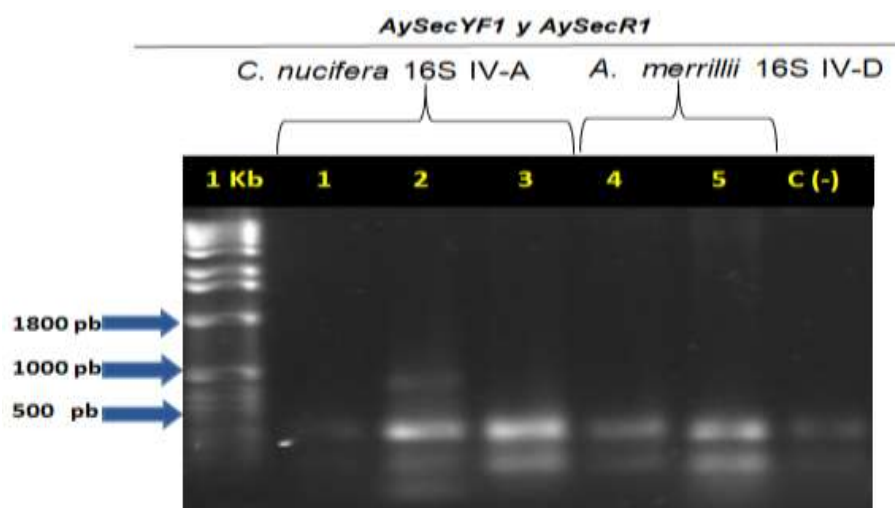


Figura 3.15. Gel de agarosa de los productos de PCR anidado usando los cebadores que amplifican el gen *SecY* con una temperatura de alineamiento de 60°C. En los carriles 1, 2, 3 se observa ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-A, en los carriles 4 y 5 se observa ADN de palma *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D. C (-) control negativo.

Los resultados de los productos amplificados presentados en la figura anterior, muestran cierta mejoría al disminuir el número de productos amplificados en el gel, sin embargo, en el control negativo se logró apreciar un patrón similar de productos amplificados coincidiendo con las muestras positivas, pudiendo tratarse en determinado caso de posible contaminación de ADN en nuestro control que al momento de llevar a cabo la reacción amplifico en nuestro control de manera similar que las muestras. Sin embargo, se hicieron más ensayos con los cebadores de *SecY* para lograr establecer las condiciones correctas de PCR, por lo que se volvió a modificar la temperatura de alineamiento a 65°C junto con su tiempo, cambiando a 30 segundos (Figura 3.16).

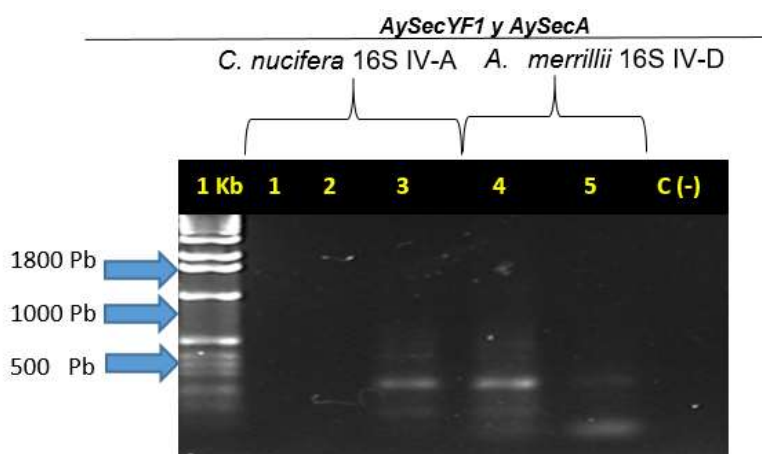


Figura 3.16. Carriles 1, 2, 3 se observa ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-A, en los carriles 4 y 5 se aprecia ADN de la palma *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D amplificadas con los cebadores del gen Secy con una temperatura de hibridación a 65°C.

Las modificaciones realizadas a la temperatura de alineamiento aumentándolas un poco, volvió más específica la reacción de PCR; es decir al aumentar ligeramente la temperatura se logró disminuir el número de productos amplificados buscando solamente amplificar el producto del tamaño correspondiente para estos cebadores según lo reportado por Lee, et al. (2006). Sin embargo, los productos presentaron un tamaño aproximadamente de 450 pb en base a nuestra escala GeneRuler 1kb Ladder, el cual no estuvo acorde con el tamaño reportado en la bibliografía.

Para los cebadores del gen *SecY* todavía se considera necesario seguir evaluando diferentes condiciones y también la posibilidad de aplicar gradientes de temperatura donde se pueda obtener un producto amplificado homogéneo y de un tamaño considerable, sí lo que se busca es la realización de una filogenia. Ya que los resultados que se obtuvieron con este conjunto de cebadores del *SecY* no fueron favorables para poder seguir evaluándolos, además por cuestión de tiempo no se pudo culminar realizando gradientes de temperatura en la temperatura de alineamiento que nos pudiera dar como resultado un producto amplificado del tamaño correspondiente para estos cebadores.

3.4 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *IMP*

Se amplificaron los cebadores del gen *IMP* de fitoplasmas IMP-532F1, IMP-257R1, IMP-586F2, IMP-2127R2 en PCR anidada contemplando las siguientes condiciones; 94°C por 2 min de desnaturalización, 58°C por 2 min de alineamiento y 72°C por tres min de extensión por un lapso de 35 ciclos y 72 °C 10 min en el ciclo final. Se obtuvieron productos amplificados de aproximadamente 1600 pb para algunas muestras, sin embargo, también se nota la presencia de una banda más pequeña con una intensidad similar, que se comparte en muestras que presentan una banda mayor y también se hace visible en muestras que no presentan el producto amplificado de mayor tamaño, por lo que ambos productos de PCR amplificados se procesaron y se mandaron a secuenciar. El tamaño y número de bandas fueron reproducibles cada vez que los ensayos se repetían (Figura 3.17).

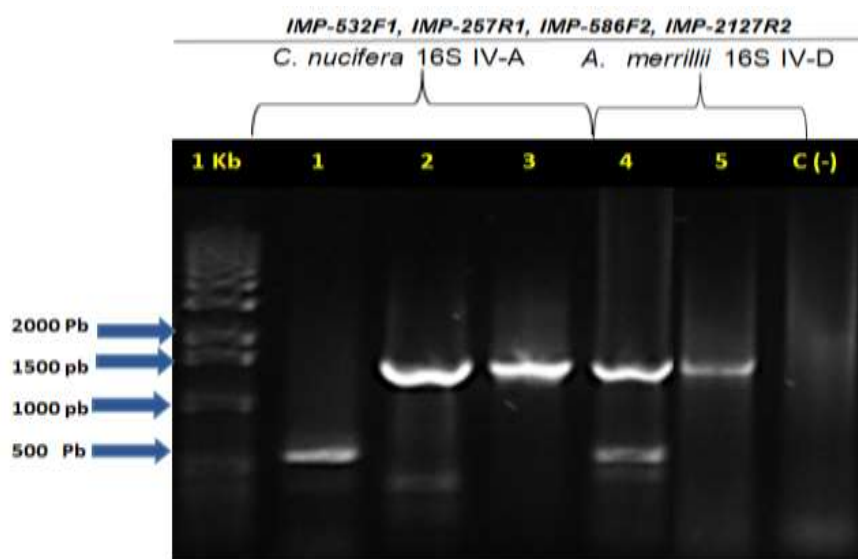


Figura 3.17. Productos de PCR amplificados con los cebadores IMP-532F1, IMP-257R1, IMP-586F2, IMP-2127R2. Los carriles 1, 2, 3, corresponden a ADN de *C. nucifera* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-A, mientras que los carriles 4 y 5 corresponden a ADN de *A. merrillii* infectado con el fitoplasma del 16SrIV-D.

Las secuencias que se obtuvieron de los productos amplificados con los cebadores del gen *IMP* no mostraron resultados favorables probablemente debido a que los clones enviados no tenían la pureza adecuada. Por lo que no se pudo realizar los análisis bioinformáticos correspondientes para este gen.

CAPÍTULO IV**DISCUSIÓN**

El amarillamiento letal es una enfermedad devastadora que afecta más de 40 especies de palmas (Oropeza y Harrison, 2008). El fitoplasma asociado a esta enfermedad se clasifica en el grupo 16SrIV (Lee et al., 1998), con diferentes subgrupos (Harrison y Oropeza, 2008). Los subgrupos predominantes en México son el 16SrIV-A y -D (Córdova et al., 2017). Sin embargo, existen palmas que presenta síntomas atípicos al subgrupo -A y -D como los reportados en el trabajo de Córdova et al. (2017), donde se encontraron tres tipos de síndromes que incluían como primer síntoma necrosamiento de las hojas (asociado a 16SrIV-A), necrosamiento de la hoja espada (asociado a 16SrIV-D) y apertura temprana de la hoja espada que fue asociada al subgrupo -D; además de estos síntomas se presenta el necrosamiento de las inflorescencias y caída de frutos. Al menos otros dos síndromes no fueron caracterizados, como el adelgazamiento del meristemo apical y hojas dobladas (Mota-Narvaez, 2015), por lo que se sospecha que podría haber más cepas de fitoplasmas asociados a esta enfermedad.

Por lo tanto, en la presente trabajos se estandarizó las condiciones para amplificar otros genes que pudieran ser de ayuda para establecer una mejor clasificación de los fitoplasmas del AL. Los resultados obtenidos en *GroEL* se permitió la amplificación de un producto de 1600 pb sin embargo, este solo se apreciaba en muestras de ADN de palmas infectadas con el fitoplasma 16SrIV-A y no en el del subgrupo -D; se realizaron modificaciones como la evaluación de gradientes de temperatura de hibridación culminando en la obtención de un producto amplificado en muestras infectadas con ambas cepas, siendo el producto de amplificación perteneciente subgrupo de fitoplasma 16SrIV-D ligeramente tenue, sin embargo el producto fue aislado y secuenciado.

Con el gen *GroEL* se esperaba la amplificación específica de fragmentos de ADN de fitoplasmas estudiar su variabilidad genética en cepas relacionadas con '*Candidatus Phytoplasma palmae*' de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D, tal y como lo señala Mitrović et al., (2011), donde lograron estudiar la variabilidad genética en 27 cepas relacionadas con '*Candidatus Phytoplasma asteris*' pertenecientes a diferentes subgrupos de 16SrI, de

las cuales 11 no habían sido estudiadas antes y ocho más tampoco se habían estudiado con otros genes más que con el 16S ARNr.

Los estudios de PCR realizados con los cebadores del gen *GroEL* lograron amplificar ADN de fitoplasmas de las cepas de referencia. En la primera etapa del proyecto se logró estandarizar las condiciones de PCR, y los productos obtenidos fueron mandados a secuenciar como ya se mencionó anteriormente. Las secuencias consenso que se obtuvieron en los primeros análisis mostraron un porcentaje de identidad de 100% con el gen *GroEL* del fitoplasma de cocotero del subgrupo -A que el grupo de investigación del laboratorio de cocotero previamente había depositado en la base de datos del GenBank. La secuencia consenso que se obtuvo de la muestra de palma infectada con el fitoplasma del subgrupo -D al ser comparada con la depositada en el GenBank mostró un porcentaje de identidad de un 99%.

Sin embargo, esto pudo deberse a que la secuencia que se encontraba depositada en el GenBank pertenece a fitoplasma de la cepa -A. Algo que no hay que dejar pasar es que en la primera etapa del proyecto las secuencias consenso que se obtuvieron solo fueron de un sentido faltando el complemento 5´- 3´ y por consiguiente se cree que por eso se obtuvo dicho resultado obtuvimos

Los resultados de los primeros ensayos con los cebadores de *GroEL* fueron bastante interesantes, sin embargo todavía fue necesario hacer más eficiente el método, por lo que se hizo un análisis in-silico de la secuencia *GroEL* que obtenida del GenBank, alineando los cebadores con la misma secuencia y de esa manera observar donde estos se alineaban correctamente y elegir una combinación que permitiera amplificar un fragmento un poco más pequeño pero de cierta manera considerable en cuanto su tamaño para la filogenia que se pretendía obtener. Se usó la combinación de los siguientes cebadores GroEL-F1, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2 en una reacción de PCR semi-anidada logrando la amplificación de muestras de ADN de palmas infectadas con las cepas -A y -D, siendo esto un resultado favorable para el estudios ya que en el caso del gen *GroEL* solo se había logrado amplificar muestras de ADN de palmas infectadas con el 16SrIV-A, por lo que el logro de establecer condiciones de PCR reproducibles, además de amplificar ambas cepas de fitoplasmas haciendo de los cebadores GroEL-F2, GroEL-R1, GroEL-F2,

GroEL-R2 unas herramientas útiles para la detección y caracterización de fitoplasmas del subgrupo IV.

Las secuencias consenso resultantes con la reacción de PCR semi-anidada de los cebadores del gen *GroEL* se compararon con las depositadas en la base de datos del GenBank y coincidieron en un 99% para el gen *GroEL* de cocotero del subgrupo IV-A y un 96% de identidad con las muestras infectadas con la cepa IV-D confirmando que los cebadores son capaces de discernir entre cepas de fitoplasmas que conforman el subgrupo IV, es decir que el conjunto de cebadores GroEL-F2, GroEL-R1, GroEL-F2, GroEL-R2, pueden ser considerados para amplificar ADN de fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D en primera estancia, pero algo que es aún más prometedor es el hecho de que también pueden ser usados para hacer una caracterización mucho más fina del grupo de fitoplasmas que causan el amarillamiento letal tal y como lo señala Mitrović et al. (2011) con el '*Candidatus Phytoplasma asteris*'

En lo que respecta al juego de cebadores que se evaluaron para el gen *SecA*, esto es TPD-SecAF1, TPD-SecAR1, TPD-SecAF2, TPD-SecAR2 proporcionado por el Dr. Nigel Harrison, estos no mostraron un patrón de amplificación homogéneo. El tamaño del producto amplificado que se obtenido no correspondía al reportado. Sin embargo, para tratar de mejorar en la obtención de los productos amplificado tratando de lograr hacer reproducible el método, se hicieron modificaciones en las condiciones de amplificación aumentado la temperatura de hibridación a 60°C, pero aun así no se logró obtener un producto amplificado de un tamaño considerable, pero sobre todo no se obtuvo una homogeneidad en el tamaño del mismo.

Los tamaños de los productos de amplificación del gen *SecA* fueron inconsistentes y no correspondían al tamaño esperado, por lo que se decidió realizar, una revisión bibliográfica más profunda. Hodgetts et al., (2008) reportaron el uso del gen *SecA* para una mejor resolución entre diferentes especies de fitoplasmas incluyendo el del grupo 16SrIV, el cual mostró buenos resultados. Las diferentes cepas de fitoplasmas que se analizaron, pero sobre todo a la hora de la caracterización filogenética mostraron la eficiencia del gen *SecA* como un excelente marcador molecular.

En base a los estudios realizados por Hodgetts y colaboradores, se tomaron los cebadores SecAfor1 (5'-GARATGAAAAGTGGGAAGG-3'), SecAfor2 (5'-GAYGARGSWAGAACKCCT3'), se descargó la secuencia del gen SecA de la base de datos del GenBank y se realizó un estudio in-silico de los cebadores TPD-SecA y los SecAfor; se alinearon mediante Clustal-W con el propósito de ver la región dentro del gen SecA donde los cebadores se alineaban bien y de esa manera usarlos para amplificar ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D.

Una vez estandarizado el método con los cebadores SecA se procedió al análisis de muestras de ADN de palmas infectadas con el fitoplasma del AL de los dos subgrupos de referencia, validando de este modo la reproducibilidad de los resultados obtenidos, en todos los casos se obtuvo un producto amplificado de aproximadamente de 683 pares de bases tanto en las muestras positivas al 16SrIV-A como a las muestras infectadas con la cepa perteneciente al subgrupo 16SrIV-D. Los productos amplificados se purificaron y fueron enviados a secuenciar. Al obtener las secuencias y después de realizar todos los estudios bioinformáticos correspondientes se concluyó en que efectivamente se habría amplificado ADN de fitoplasmas de ambos subgrupos, y al comparar las secuencias consenso se corroboró dicho resultado, ya que las secuencias presentaban un 99% de identidad con la secuencia del gen SecA de amarillamiento letal del subgrupo -A para las muestras caracterizadas como positivas al subgrupo 16SrIV-A con el gen 16S ARNr y las muestras caracterizadas como 16SrIV-D presentaron un 99% de identidad y 92% con la secuencia del gen SecA del subgrupo SecAIV-D.

En la segunda etapa de análisis de ADN de palmas infectadas con los fitoplasmas de los subgrupos 16srIV-A y 16SrIV-D se corroboró los resultados obtenidos en los ensayos realizados en la primera etapa del proyecto ya que las secuencias obtenidas de las palmas de *C. nucifera* infectadas con la cepa -A y *A. merrillii* infectadas con la cepa -D mostraron el mismo comportamiento al realizar los estudios bioinformáticos correspondientes; con base a eso se llevó a cabo el desarrollo de cebadores específicos capaces de amplificar ambas cepas de fitoplasmas mediante el programa Primer 3 Plus.

Del mismo modo en que se diseñaron los de gen *GroEL*, en este caso también se amplificó ADN de otra especie de palma que al igual que la palma de cocotero y la *A. merrillii* es considerada de importancia económica. Los estudios realizados al ADN de esta especie de palma con el gen 16SrRNA la confirmó como positivo a la cepa –D, por lo que de igual manera se evaluaron con los cebadores del gen *SecA* para verificar los resultados obtenidos con el gen 16SrRNA.

La secuencia consenso resultante del producto amplificado se comparó con las depositada en el GenBank y coincidió en un 96.76% de identidad con el gen de Sabal Palm decline phytoplasma strain 16SrIV-D *SecA* (*SecA*) gene partial cds ([KF751386.1](#)) depositado en la base de datos. Con las secuencias obtenida se diseñaron cebadores específicos para amplificar las dos cepas de fitoplasmas de interés (IV-A y IV-D) F1secA, F2secA y R1secA, R2secA.

Con el diseño de cebadores específicos se pretende realizar ensayos de amplificación de muestras problema y en base a las condiciones establecidas se cree que con estos se pudiera amplificar un fragmento mucho más grande, capaz de mostrarnos mucho más clara las diferencias entre las diferentes cepas que conforman el grupo IV de fitoplasmas causante del Amarillamiento Letal.

Los resultados de la amplificación del gen *SecY* no fueron los esperados para el juego de cebadores utilizados; en este caso (AySecYF1 y AySecYF2), mostraron resultados variables cada vez que se repetían los ensayos. Pese a los resultados obtenidos con este gen se propuso la búsqueda en la literatura de cebadores degenerados que pudieran ser usados en este estudio o también, de los productos amplificados que se lograron obtener, mandar a secuenciar cada uno de los diferentes productos y con las secuencias obtenidas diseñar alguno que nos pudiera servir en determinado caso. Para el caso particular de los cebadores que amplifican el gen *IMP*, estos mostraron reproducibilidad en los productos amplificados, sin embargo, los resultados de la secuenciación no mostraron ningún tipo de secuencia, lo que podría indicar que hubo un problema durante la clonación de los productos de PCR. Un punto importante que hay que considerar con este gen es el hecho de que es una proteína inmunodominante de membrana que puede estar sometida a presión de selección y por lo tanto pueden presentar variabilidad (Kakizawa *et al.*, 2006; Galetto *et al.*, 2007).

En la presente tesis se aislaron y caracterizaron genes como lo fueron *GroEL* y *SecA* que podrían permitir una diferenciación más fina de los subgrupos que conforman el grupo 16SrIV. Conocer las distintas cepas de fitoplasmas presentes en las palmas de cocotero y otras palmas sería de gran importancia ya que podríamos identificar posibles vectores de estos, realizar estudios epidemiológicos y desarrollar estrategias de manejo de la enfermedad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ Se amplificó ADN de fitoplasmas de las cepas –A y –D con los cebadores específicos de *GroEL* que se propusieron.
- ❖ Las secuencias del gen *GroEL* que se obtuvieron fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank y se obtuvo un porcentaje de identidad de 99% y 95% con la secuencia del gen *GroEL* del fitoplasma del subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D respectivamente.
- ❖ Las secuencias del gen *SecA* que se obtuvieron en la tercera etapa del proyecto fueron comparadas con las depositadas en la base de datos GenBank y se obtuvo un porcentaje de identidad de 99% y 95% con la secuencia del gen *SecA* del fitoplasma del subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D.
- ❖ Se establecieron las condiciones de amplificación para el gen *IMP*.
- ❖ Se culminó con el aporte de dos conjuntos de cebadores capaces de amplificar el ADN de fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-D y 16SrIV-D. Un paso importante para proponer una nueva filogenia del grupo IV de fitoplasmas causantes del amarillamiento letal.

PERSPECTIVAS

Con las secuencias obtenidas de los genes *SecA* de las cepas 16SrIV-A y -D se pueden diseñar sondas TaqMan marcadas con diferentes fluoróforos específicos para cada cepa y discernir por PCR multiplex ambas en una misma reacción. Es decir, obtendríamos una herramienta de mayor eficacia para la detección más rápida de palmas enfermas con el amarillamiento letal.

Se continuará trabajando en aislar y caracterizar el gen *IMP*, ya que es un gen que presenta variabilidad genética y puede ser una herramienta más para lograr una mejor diferenciación del grupo 16SrIV.

Los genes caracterizados en la presente tesis nos podrían ayudar para obtener una filogenia con mayor resolución de los fitoplasmas del grupo 16SrIV, que pueda contribuir para seguir entendiendo el patosistema de esta enfermedad letal de las palmas.

BIBLIOGRAFIA

- Bertaccini A, Lee, I-M (2018). Phytoplasmas: An Update: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma- Associated Diseases. 10.1007/978-981-134-0119-3_1.
- Borukhov S, Lee J, Laptenko O (2005). Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*, 55: 1315-1324.
- Brown ES, Been OB, McLaughlin AW (2007). The Lethal Yellowing (16SrIV) Group of Phytoplasmas. *Pest Technology* ©2007 Global Science Books.
- Cordova I, Almeida H, Harrison N. Oropeza C (2000). First Report of a Phytoplasma-Associated Leaf Yellowing Syndrome of Palm Jipi Plants in Southern México. *Plant Disease*. 84:807.
- Cordova I, Oropeza C, Puch Hau C, Harrison NA, Colli-Rodriguez A, Narvaez M, Nic-Matos G, Reyes C, Saenz 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. *Journal of Plant Pathology*. 96. 343-352. 10.4454/JPP.V96I2.031.
- Cavalche H, Castilla C, Sánchez J, Tovar PJ, Gutiérrez D, Hernández L, Berdugo MA, Ramírez J (2004). Avances en el estudio de la Marchitez Letal. *PALMAS - Vol. 25 No. Especial, Tomo II*.
- Cordova-Lara I, Narvaez-Mota L, Hau Puch C, Oropeza C, Sáenz L. (2017). Detection and identification of lethal yellowing phytoplasma 16SrIV-A and D associated with *Adonidia merrillii* palms in Mexico. *Australasian Plant Pathology Society Inc. Vol. 46*, pp: 389-396.
- Davis RE, Zhao Y, Dally EL, Lee IM, Jomantiene R, Douglas SM. (2013). '*Candidatus* Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 766–776.
- Duduk B, Bertaccini A (2011). Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade, Serbia DiSTA, Plant Pathology, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Italy. *Phytopathogenic Mollicutes Vol.1* (1).
- Duduk B, Calari A, Paltrinieri S, Duduk N and Bertaccini A (2009). Multi-gene analysis for differentiation of aster yellows phytoplasmas infecting carrots in Serbia. *Annals of Applied Biology*, 154(2): 219-229.

- García-Betancourth AC (2016). Aislamiento, patogenicidad y transmisión con *Scaphytopius marginineatus* (Stal) de un fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias Palmira, Colombia.
- Galetto LD, Bosco J, Fletcher Marzachí C (2007). Production of polyclonal and monoclonal antibodies specific against membrane proteins of '*Candidatus Phytoplasma asteris*', chrysanthemum yellows isolate. *Bulletin of Insectology*. 60: 211-212.
- Gutiérrez-Camarena G, Almaraz De La Torre R (2008). Fitoplasmas: Síntomas y Características Moleculares. Unidad de Morfología y Función; FES Iztacala. UNAM. Av. De los Barrios Núm. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla C. P. 54090 México.
- Gundersen D, Lee I, Rehner S, Davis R. Kingsbury D (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176: 5244-5254.
- Harrison NA, Womack M, Carpio ML (2002). Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group *Phytoplasma* in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis* 88(6):676–681.
- Harrison NA, Oropeza C (2008). Coconut lethal yellowing. In: Harrison NA, Rao GP, Marcone C (eds) *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*. Studium Press LLC, Houston, pp 219–248.
- Harrison NA, Elliot LM (2016). Phytoplasmas associated with date palm in the continental USA: three 16SrIV subgroups. University of Florida – IFAS, Fort Lauderdale Research and Education Center, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314, USA. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2016. 28(1): 17-23
- Harrison NA, Davis RE, Oropeza C, Helmick EE, 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 NA, Cordova I, Richardson P, DiBonito R (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: C Oropeza, JL Verdeil, GR Ashburner, R Cardeña, JM Santamaria, eds. *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 183– 96.
- Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N, Dickinson M (2008). *Phytoplasma* phylogenetics based on analysis of the *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of the '*Candidatus Phytoplasma*' species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1826–1837.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar D, Kakizawa S, Kingdom NH, Namba S (2008). *Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 403–423. doi: 10.1111/j.1364- 3703.2008.00472.x

- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team–Phytoplasma Taxonomy Group (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1243–1255.
- Jomantiene R, Maas JL, Takeda F, Davis RE (2002). Molecular identification and classification of strawberry phylloid fruit phytoplasma in group 16SrI, new subgroup. *Plant Disease*, 86(8): 920.
- Kakizawa SK, Oshima R, Namba S (2006). Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology*.14: 254 - 256.
- Kirkpatrick BC, Smart C, Blonquist C, Guerra L, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz, KH, Schnider B, Seemüller E (1994). Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16S/23S rRNA spacer sequences. *Proceedings of the 10^a international Congress of the Internacional Organization for Mycoplasmaology (IOM)* 261262.
- Lee I-M, Gundersen-Rindall DE, Davis RE, Bartoszky IM (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153-1169.
- Lee I-M, Zhao Y, Bottner KD (2006). SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol. Cell. Probes* 20, 87–91. doi: 10.1016/j.mcp.2005.10.001.
- Lee I-M, Parker BDK, Zhao Y, Davis ER, Harrison NA (2010). Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2887–2897.
- Lee I-M, Gundersen-Rindal D, Davis RE, Bottner KD, Marcone C, Seemueller E (2004). 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54: 1037-1048
- Liefting LW, Andersen MT, Beever RE, Gardener RC, Forster RLS (1996). Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of phormium yellow leaf phytoplasma. *Appl Environ Microbiol* 62: 3133–3139.
- Marcone C, Lee I-M, Davis RE, Ragozzino A, Seemüller E (2000). Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50(5): 1703-1713.
- Martínez R, Narvaez M, Vabre S, Harrison N, Oropeza C, Dollet M, Hichez E (2008) Coconut lethal yellowing on the southern coast of Dominican Republic is associated with a new 16SrIV group phytoplasma. *Plant Pathol* 57:366.
- Maejima K, Oshima K, Namba S (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J Gen Plant Pathol* 80:210–221.
- Mitrovic J, Contaldo N, Paltrinieri S, Mejia JF, Mori N, Bertaccini A, Duduk B (2011). The use of groEL gene for characterization of aster yellows phytoplasmas in field

collected samples. B. Insectol. 64(Supplement): S17S18.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1744-7348.2011.00472.x>

- McCoy RE, Howard WF, Tsai HJ, Doselman HM, Thomas LD, Basham HG, Atilano AR, Eskafi MF, Britt L, Collins EM (1983). Lethal Yellowing of Palms. University of the Florida, Institute of food and Agricultural Sciences, Agricultural Research and Education Center, 3205 S.W. College. Ave., FOR Lauderdale, FL 33314.
- Mota Narváez Luis Alberto. Detección e identificación de fitoplasmas en palmas kerpis (*Adonidia merrillii*) con síntomas asociados al amarillamiento letal del cocotero en Mérida Yucatán. Instituto Tecnológico de Conkal, 17 Marzo 2015. Luis Sáenz/Iván Córdova. Tesis licenciatura. Pp77
- Narvaez M, Cordova I, Orellana R, Harrison NA, Oropeza C (2006). First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* Palms in the Yucatán peninsula of México. Plant Pathol 55:292.
- Narvaez M, Córdova-Lara I, Reyes-Martínez C, Puch-Hau C, Mota- Narvaez L, Collí A, Caamal G, Harrison N, Sáenz L, Oropeza C (2016). Occurrence of 16SrIV subgroup-A phytoplasmas in *Roystonea regia* and *Acrocomia mexicana* Palms with lethal yellowing-like syndromes in Yucatán, México. J Phytopathol 164:1111–1115.
- Narváez M, Cordova I, Orellana R, et al.. First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. Plant Pathol. 2006;55:292.
- Ntushelo K, Elliott LM, Harrison NA (2013). Palm yellows phytoplasmas and their genetic classification. African Journal of Biotechnology. Vol. 12(22), pp. 3376-3382.
- Namba S (2011). Phytoplasmas: A century of pioneering research. Journal of General Plant Pathology. 77.10.1007/s10327-011-0341
- Nejat N, Vadamalai G, Davis RE, Harrison NA, Sijam K, Dickinson M, Abdullah S N, Zhao Y. (2013). 'Candidatus Phytoplasma malaysianum', a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). Int J Syst Evol Microbiol 63, 540–548.
- Nishigawa H, Miyata I-S, Oshima K, Sawayanagi T, Komoto A, Kuboyama T, Matsuda I, Tsuchizaki T, Namba S (2001). In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. Microbiology, 147, 507–513.
- Oropeza C, Cordova I, Chumba A, Narváez M, Sáenz L, Ashburner R, Harrison, NA (2011). Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. Annals of Applied Biology, 159, pp. 109–117.
- Oropeza C, Escamilla J, Mora G, Zizumbo D, Harrison NA (2005). Coconut lethal yellowing. Status of Coconut Genetic Resources. IPGRI-APO, Serdang, Malaysia: 349-363.

- Parrota AJ (1993). *Cocos nucifera* L. Palma de coco. Familia de las palmas: Palmae. SO-ITFSM-57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 7 p.
- Pérez-López E, Luna-Rodríguez M, Olivier CY, Dumonceaux TJ (2016). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 492–513.
- Roca MM, Castillo MG, Harrison NA, Oropeza C (2006) First report of a 16SrIV group phytoplasma associated with declining coyol palms in Honduras. *Plant Dis* 90:526.
- Sanchez Granados D, Rios López FG (2002). Manejo de la Palma de Coco (*Cocos nucifera* L.) EN MÉXICO. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. MéxicoTexcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.
- SAGARPA (2017). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, PescaAlimentación.<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/guerrero/boletines/Paginas/2017 B040.aspx>
- Schneider B, Seemuller E (1994). Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol* 60: 3409– 3412.
- Smart CB, Schneider C, Blonquist L, Guerra N, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz K, Seemuller E, Kirkpatrick B (1996). Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl. Envir. Microbiol.* 62: 2988-2993.
- Vázquez-Euán R, Harrison N, Narvaez M, Oropeza C (2011). Occurrence of a lethal yellowing group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico. *Plant Dis* 95:256–262.
- Vazquez- Euan R. (2010). Detección y caracterización de fitoplasma del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán México.
- Wei W, Davis RE, Lee I-M, Zhao Y (2007). A computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 1855-1867.
- <http://www.uniprot.org/uniprot/P10408> UniProtKB - P10408 (SECA_ECOLI).
- Zhao Y, Wei W, Lee I.-M, Shao J, Suo X, Davis RE (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2582–2593.