

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA EN
PLANTAS**

**Detección y caracterización de fitoplasmas
del grupo del Amarillamiento Letal en
diferentes especies de palmeras en
Yucatán.**

TESIS QUE PRESENTA:

BIOL. ROBERTO CARLOS VÁZQUEZ EUÁN


**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.
2010**



Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen 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 y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



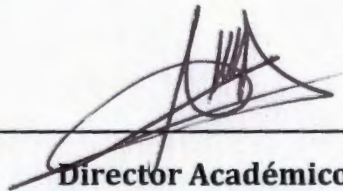
Biol. Roberto Carlos Vázquez Euán



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Detección y caracterización de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmeras en Yucatán" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín y del Dr. Tomás González Estrada, dentro de la Opción Doctorado directo, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Para los efectos que sean necesarios,



Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

CONTENIDO

Agradecimientos	i
Dedicatorias	iii
Relación de abreviaturas	v
Resumen	xii
Abstract	ix
Introducción general	1
Capítulo 1. Antecedentes	5
1.1. Fitoplasmas	5
1.1.1. Descubrimiento y origen de los fitoplasmas.....	5
1.1.2. Clasificación de los fitoplasmas basada en análisis de RFLPs.....	6
1.1.3. Taxonomía provisional de los fitoplasmas.....	7
1.1.4. Características generales y moleculares de los fitoplasmas.....	8
1.1.5. Ciclo de vida de los fitoplasmas.....	10
1.1.6. Síntomas inducidos por los fitoplasmas.....	11
1.1.7. Medidas de control de la dispersión de las enfermedades causadas por fitoplasmas.....	12
1.1.8. Hospedantes alternantes.....	12
1.2. Amarillamiento letal del cocotero	13
1.2.1. Fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero.....	13
1.2.2. Proyecto para salvaguardar la producción del cocotero.....	15
1.3. Objetivos	17
1.3.1. Objetivo general.....	17
1.3.2. Objetivos específicos.....	17
1.4. Literatura citada	18
Capítulo 2. Occurrence of a lethal yellowing group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico.	23
Abstract	23
Introduction	24
Materials and Methods	25
Sampling and evaluation of palms	25
DNA extraction and PCR assay	25
Analysis of PCR products	26
Sequencing and phylogenetic analysis of cloned rDNA products	26
Results	27
Phytoplasma detection.....	27
Phytoplasma identification and characterization.....	29
Symptom progression on <i>Sabal mexicana</i>	32
Discussion	35
References	38
Capítulo 3. Detección de fitoplasmas del grupo 16SrIV en insectos <i>Myndus crudus</i>	41

3.1. Insectos vectores de fitoplasmas.....	41
3.1.1. <i>Myndus crudus</i>	41
3.2. Material y métodos.....	42
3.2.1. Captura de insectos.....	42
3.2.2. Extracción de ADN de insectos.....	42
3.2.3. Análisis de detección de AL en insectos por PCR.....	43
3.2.4. Análisis por RFLPs de los segmentos amplificados por PCR anidado.....	44
3.2.5. Clonación de los segmentos amplificados, secuenciación y análisis filogenético.....	44
3.3. Resultados.....	46
3.3.1. Captura de insectos y detección de AL por PCR.....	46
3.3.2. Análisis de RFLPs del gen 16S ADNr amplificado por PCR anidado de fitoplasmas del AL.....	47
3.3.3. Análisis de la secuencia del gen 16s ADNr de fitoplasmas aislados en <i>M. crudus</i>	48
3.4. Discusión y conclusiones.....	50
3.5. Literatura citada.....	52
Capítulo 4. Proteínas membranales de los fitoplasmas.....	57
4.1. Diversidad y función de las proteínas membranales de los fitoplasmas.....	57
4.2. Materiales y métodos.....	59
4.2.1. Diseño de iniciadores.....	59
4.2.2. Amplificación por PCR de las proteínas membranales.....	59
4.2.3. Clonación de los segmentos amplificados, secuenciación y análisis de resultados.....	60
4.3. Resultados.....	61
4.3.1. Amplificación por PCR de los genes codificantes de las proteínas transportadoras ABC.....	61
4.3.2. Amplificación por PCR de los genes del complejo <i>Sec</i> y <i>amp</i>	63
4.3.3. Clonación y secuenciación.....	65
4.4. Discusión y conclusión.....	66
4.5. Literatura citada.....	67
Capítulo 5. Conclusiones generales.....	73
Perspectivas.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Amplification of phytoplasma 16S rDNA, from <i>Sabal mexicana</i> , <i>Pseudophoenix sargentii</i> , <i>Thrinax radiata</i> and <i>Cocos nucifera</i> by a nested PCR.....	27
Figura 2.2. Representative restriction fragment profiles of phytoplasmas 16S rDNA amplified from symptomatic palms by a nested PCR	28
Figura 2.3. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from representative phytoplasmas in the coconut lethal yellows (16SrIV) group and other phytoplasma group.....	30
Figura 2.4. Appearance and progression of foliar decay symptoms on adult and young <i>S. mexicana</i> and <i>P. sargentii</i> infected with group 16SrIV phytoplasmas.....	32
Figura 2.5. Average number of green leaves on phytoplasma infected and uninfected <i>Sabal mexicana</i> over an 18 month period.....	33
Figura 3.1. Muestras positivas de insectos capturados en distintos puntos del estado de Yucatán.....	46
Figura 3.2. Análisis de RFLPs del gen 16S ADNr amplificado por PCR anidado de insectos <i>M. crudus</i> de distintos puntos del Estado de Yucatán..	47
Figura 3.3. Árbol filogenético construido usando el método neighbor-joining con las secuencias del gen 16S ADNr ribosomal de 46 secuencias de fitoplasmas y <i>Acholeplasma palmae</i>	48
Figura 4.1. Gel de agarosa al 1% con el iniciador ABC 1 de muestras positivas y negativas de distintas plantas.....	59
Figura 4.2. Gel de agarosa al 1% con el iniciador ABC 2 de muestras positivas y negativas de distintas plantas.....	60
Figura 4.3. Gel de agarosa al 1% con el iniciador ABC 3 de muestras positivas y negativas de distintas plantas.....	61
Figura 4.4. Gel de agarosa al 1% con el iniciador secY-64F/ secY-1985 de muestras positivas y negativas de distintas plantas.....	61
Figura 4.5. Gel de agarosa al 1% con el iniciador para el gen Amp de muestras positivas y negativas de <i>C. nucifera</i> , <i>T. radiata</i> , <i>P. sargentii</i> y <i>S. mexicana</i>	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Analysis of four palm species with and without foliar discoloration symptoms at four sites in Yucatan State, Mexico for evidence of phytoplasma infection by a nested PCR assay.....	27
Cuadro 2.2 Percent identity between the sequences of the amplicons obtained by PCR for phytoplasma detection from the DNA samples of palms of different species.....	29
Cuadro 3.1. Lista de los fitoplasmas y de <i>Acholeplasma palmae</i> , de los cuales se utilizó la secuencia del gen 16S ADNr para la construcción del árbol filogenético.....	44
Cuadro 3.2. Número de insectos positivos a AL por PCR anidado y totales capturados en distintos sitios del estado de Yucatán.....	45
Cuadro 4.1. Secuencias de los iniciadores de los genes membranales utilizados en el presente trabajo.....	57
Cuadro 4.2. Ausencia/presencia de bandas amplificadas con los distintos pares de iniciadores.....	62
Cuadro 4.3. Comparación de las similitudes de los genes 16S ADNr y SecY entre los fitoplasmas aislados de distintas especies de palmas..	63

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín y el Dr. Tomás González, a quienes agradezco toda la confianza y el apoyo que me brindaron cada uno en su tiempo.

A los integrantes del comité evaluador de la tesis de doctorado por sus opiniones y correcciones al presente escrito: Dr. Luis Sáenz, Dra. Virginia Herrera, Dr. Jairo Cristóbal, Dr. Oscar Moreno, Dr. Fredy Ortiz, Dr. Tomás González y Dr. Carlos Oropeza Salín

Un agradecimiento especial a la QBB. María Narvaez por su invaluable apoyo y asesoramiento en los trabajos realizados en esta tesis.

Al M. C. Iván Córdova.

A todos los integrantes y compañeros del laboratorio de cocotero de la Unidad de Biotecnología: Antonio, Carlos, Rafael y en especial a Ana Collí y Germán Nic Matos por su apoyo en el trabajo de laboratorio y campo.

A los integrantes y compañeros del laboratorio del Dr. Tomás González de la UBBMP, en especial al M.C. Luis Carlos Gutiérrez.

A CONACYT por la beca 185733

El trabajo realizado en esta tesis fue financiado parcialmente por "Common fund for Commodities" (clave CICY C93), bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Oropeza.

Dedicatorias

A Lyndia

Gracias por impulsarme, inspirarme, acompañarme, pero sobre todo, Gracias por amarme

A mis hijos: Dana y Beto

Porque al final del día, todo es por ustedes

A mis padres: María C. Euán Martín y Rafael Vázquez Mena

Mis hermanos: Bruno, Martín y Fátima

Su apoyo de principio a fin en mi educación no es posible de agradecer en solo un párrafo: Gracias

Relación de abreviaturas

µL: microlitro
ABC: "ATP-binding cassette"
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AL: Amarillamiento letal
Amp: Antigenic membrane protein
ARN: Ácido ribonucleico
ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia
Blast: "Basic local alignment search tool"
CFC: "Common fund for commodities"
CICY: Centro de Investigación Científica de Yucatán
COI: Citocromo oxidasa
CPY: Carludovica palmata yellowing
CTAB: Cetil trimetilamonio bromuro
EDTA: Ácido etilendiamino tetracético
I_{dp}A: Immunodominant protein A
I_{mp}: Immunodominant protein
IRPCM: "International Research Programme for Comparative Mycoplasmaology"
Kb: kilobase
MgCl₂: Cloruro de magnesio
mL: mililitro
MLO: Organismo tipo micoplasma o "Mycoplasmalike organism"
NaCl: Cloruro de sodio
NaOCl: Hipoclorito de sodio
NCBI: "National center for biotechnology information"
nm: nanometro
°C: Grados celsius
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa o "Polimerase chain reaction"
PMUs: "Potencial mobile units"
ADNr: ADN ribosomal
RFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o "Restriction fragment length polymorphism"
rpm : Revoluciones por minuto
SDS: Lauril sulfato de sodio
SVM: "Sequence variable mosaics"
TBE: 90mM Tris-borato, 2mM EDTA
TPD: Texas pheonix decline
Tris: tris hidroximetiaminometano – Trizma base
UV: ultravioleta

Resumen

Durante 2004 a 2008 se observaron algunas palmas de *Sabal mexicana* con síntomas parecidos a los inducidos por fitoplasmas, un análisis por PCR anidado del gen 16Sr confirmó la infección por fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal (16SrIV) 18 de 53 palmas muestreadas, cinco de las cuales murieron durante el tiempo del estudio. Los perfiles obtenidos por RFLPs reveló que una de ellas tenía un fitoplasma del subgrupo 16SrIV-A y las otras 17 palmas de *S. mexicana* de distintas localidades de Yucatán estaban infectadas con fitoplasmas parecidos a los de *Carludovica palmata* leaf yellowing (CPY) y Texas Phoenix palm decline (TPD), del subgrupo 16SrIV-D, el análisis filogenético de las secuencias confirmó el resultado anterior. Se analizaron otras especies colectadas en las cercanías a las palmas de *S. mexicana* y los fitoplasmas aislados de una *Thrinax radiata* y una *Pseudophoenix sargentii* también pertenecieron al subgrupo 16SrIV-D. Se analizaron por PCR anidado 1809 insectos, 23 de los cuales resultaron positivos a AL, los análisis filogenéticos y los patrones de la digestión enzimática del gen 16Sr de los fitoplasmas aislados mostraron la existencia de las mismas dos cepas encontradas en las palmas, por lo que los insectos *Myndus crudus* son los vectores potenciales de los fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D. Con el propósito de caracterizar y clasificar mejor a los fitoplasmas del 16SrIV, se analizaron otros genes, además del gen 16Sr, el mejor resultado se obtuvo en la amplificación y secuenciación del gen SecY de fitoplasmas aislados en *Cocos nucifera*, *T. radiata* pertenecientes al subgrupo 16SrIV-A y de fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-D aislados de una palma de *P. sargentii* y un insecto *M. crudus*, la comparación de las secuencias mostró una menor similitud que con el gen 16Sr entre los subgrupos, reforzando la existencia de las dos cepas de fitoplasmas del grupo 16SrIV en Yucatán.

Abstract

During the period 2004-2008 were observed guano palms (*Sabal mexicana*) with symptoms resembling those associated to phytoplasma infection. Lethal yellowing (LY) group phytoplasma was detected by nested PCR. An amplification product was observed in 18/53 plants and five of the positive plants died. The restriction profiles obtained following separate digestion with three endonucleases revealed that phytoplasmas infecting *S. mexicana* from different localities in Yucatan were similar to strains composing the coconut lethal yellowing phytoplasma (16SrIV) group, and 17 of the infected palms contained phytoplasmas co-identical to *Carludovica palmata* leaf yellowing (CPY) and Texas Phoenix palm decline (TPD) phytoplasma, both members of the 16SrIV-D subgroup, one *S. mexicana* harboured palm LY phytoplasma (16SrIV-A subgroup). Sequence analysis of 16S rDNA confirmed that the closest related phytoplasmas were those associated with CPY and TPD phytoplasmas. Other palms species nearby to *S. mexicana* were analyzed too, phytoplasmas isolates from one *Thrinax radiata* and one *Pseudophoenix sargentii* belong to 16SrIV-D subgroup. 1809 insects were analyzed by nested PCR, 23 of which were positive for AL, phylogenetic analysis and enzymatic digestion patterns of 16S rDNA gene of phytoplasma isolates showed the existence of these two strains found in the palms previous mentioned, so that insects *M. crudus* are potential vectors of phytoplasmas belongs to subgroups 16SrIV-A and 16SrIV-D. With the purpose of improving the characterization and classification of phytoplasmas of group 16SrIV detected in this work, we analyzed three genes encoding membrane proteins of lethal yellowing phytoplasma: *ArtI*, *Amp* and *SecY* encoding the arginine transporter *ArtI*, the antigenic membrane protein *Amp* and the protein translocase subunit *SecY*, respectively. *SecY* of phytoplasmas isolated from *C. nucifera* and *T. radiata* (subgroup 16SrIV-A) and phytoplasmas isolated from *P. sargentii* and an insect *M. crudus* (16SrIV-D) were cloned and sequenced, the alignments were compared and the results showed a lower similarity than the obtained with the 16S gene, which reinforced the notion of the existence two lineages of phytoplasmas of group 16SrIV in palms and insects *M. crudus* in Yucatan.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los fitoplasmas son procariotes endocelulares fitopatogénicos sin pared celular que son transmitidos por insectos y que habitan en las células del floema. Hasta el momento no se han podido cultivar *in vitro* por lo que su caracterización es insuficiente (Lee *et al.*, 2000). Aunque el genoma de los fitoplasmas es extremadamente pequeño, es muy poco lo que se conoce de su genoma, actualmente, los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) son usados comúnmente para su detección y caracterización, la mayoría de ellos por el gen 16Sr y la región espaciadora 16/23S, a partir de los cuales se han clasificado (Smart *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2002; IRPCM, 2004; Martini *et al.*, 2007).

El uso del gen 16S ADNr ha sido muy útil para clasificar a los fitoplasmas a nivel de género o niveles taxonómicos más elevados, sin embargo, debido a su naturaleza altamente conservada, no es útil para resolver relaciones filogenéticas a nivel de especie y por tanto, fitoplasmas cercanamente relacionados se pueden percibir como idénticos, aún cuando éstos no compartan nichos ecológicos, sean transmitidos por diferentes vectores o estén asociados con plantas hospedantes distintas en varias regiones geográficas (Fox *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2006; Martini *et al.*, 2007). Para estudios epidemiológicos o con propósito de cuarentena, es necesario tener un sistema de clasificación que permita distinguir fitoplasmas que son ecológicamente distintos, por lo que la identificación de genes nuevos y preferiblemente menos conservados puede revelar una mayor variabilidad (Kakizawa *et al.*, 2006; Hodgetts *et al.*, 2008).

El fitoplasma del Amarillamiento Letal (AL) infecta a por lo menos 40 palmas de importancia ornamental y/o comercial, de modo especial y catastrófica a *Cocos nucifera*, una planta de gran importancia agronómica, usualmente los síntomas tempranos en todas las palmas son similares, aunque en algunas de ellas, principalmente en las silvestres, solo es posible detectar la presencia del fitoplasma mediante pruebas moleculares (Howard y Harrison, 1999). *Sabal mexicana* es una especie que no se encuentra entre las especies susceptibles al fitoplasma del amarillamiento letal (McCoy *et al.*, 1983), sin embargo en los años de 2004 y 2005 se observó en el Jardín Botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) la muerte de tres palmeras de esta especie después de haber presentado síntomas parecidos a los causados por fitoplasmas. Estas palmeras se analizaron por PCR anidado con iniciadores específicos del grupo de fitoplasmas del AL y resultaron positivas. Posteriormente se observó un mayor número de palmeras de esta especie con sintomatologías similares.

Los objetivos del presente trabajo fue determinar si los síntomas observados en individuos de *S. mexicana* estaban asociados a fitoplasmas, identificarlos y clasificarlos por métodos moleculares como la amplificación por PCR, los patrones surgidos del análisis de RFLPs, así como por la secuenciación del gen 16S ADN y el análisis filogenético de las secuencias aisladas de *S. mexicana* y otras especies de palmeras ubicadas alrededor de *S. mexicana* infectadas. También se evaluó la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrIV en insectos *Myndus crudus* capturados en *S. mexicana* y otras especies de palmeras diagnosticadas tanto positivas como negativas a fitoplasmas.

Del mismo modo, se caracterizaron distintos genes involucrados en la interacción planta-hospedante-vector, como son *Amp*, *SecY* y *ArtI*, los cuales permitan desarrollar nuevos sistemas de análisis por PCR para clasificar mejor a los fitoplasmas del grupo 16SrIV detectados en Yucatán, México, aislados de distintas palmas hospedantes.

LITERATURA CITADA

- Fox, G., J. Wisotzkey and P. Jurtshuk. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol.* 42:166–170.
- Harrison, N., W. Marie, P. Jones, M. Carpio, M. Castillo, M. Doyle and C. Oropeza. (2002). 16rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann. Appl. Biol.* 141: 183 – 193.
- Hodgetts J, N. Boonham, R. Mumford, N. Harrison and M. Dickinson. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 1826-37
- Howard FW, Harrison NA. Lethal yellowing of palms, (1999). <http://flrec.ifas.ufl.edu/pdfs/LethalYellowingOfPalms.pdf> Edited by A.M. Meerow.

- IRPCM. (2004). '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1243 – 1255.
- Kakizawa, S., K. Oshima and S. Namba. (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology.* 14: 254 – 256.
- Lee, I., D. Gundersen-Rindal and A. Bertaccini. (1998). Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology.* 88: 1359 – 1366.
- Lee, I., R. Davis and D. Gundersen-Rindal. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology.* 54: 221 – 255.
- Lee, I., Y. Zhao and K. Bottner. (2006). SecY gene sequences analysis for finer differentiation of diverse strain in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular probes.* 20: 87 – 91.
- Martini, M., M. Lee, K. Bottner, Y. Zhao, S. Botti, A. Bertaccini, N. Harrison, L. Carraro, C. Marcone, A. Khan and R. Osler. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 2037–2051
- McCoy, R., F. Howard, J. Tsai, H. Donselman, D. Thomas, H. Basham, R. Atilano, F. Eskafi, L. Britt and M. Collins. (1983). Lethal yellowing of palms. *Univ. Florida Agri. Exp. Sta. Tech. Bull no.* 834.
- Schneider, B., K. Gibb and E. Seemuller. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology.* 143: 3381- 3389.
- Smart, C., B. Schneider, C. Blomquist, L. Guerra, N. Harrison, U. Ahrens, H. Lorenz, E. Seemüller and C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl Environ Microbiol,* 62: 2988–2993.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1.1. Fitoplasmas

1.1.1. Descubrimiento y origen de los fitoplasmas

Hasta finales de la década de los sesentas del siglo pasado se creía que las enfermedades con síntomas de amarillamiento y enanismo en plantas eran inducidas por virus, aunque ninguna partícula viral había podido asociarse definitivamente con estos síntomas (Welliver, 1999), no fue hasta 1967 cuando se descubrió que unos microorganismos sin pared celular eran los causantes de las enfermedades de amarillamiento y los llamaron "organismos tipo micoplasmas (MLO, por sus siglas en inglés)", precisamente por su parecido con los micoplasmas. Este hallazgo condujo a un drástico cambio en el entendimiento de la etiología de muchos tipos de enfermedades con síntomas de amarillamiento, enanismos y entre otros que aún no habían podido ser atribuidos claramente a algún patógeno (Doi *et al.*, 1997 citado por Lee *et al.*, 2000). Solo fue hasta 1994, cuando la caracterización de estos organismos había avanzado considerablemente, se consideró que los MLOs formaban claramente un grupo monofilético y que por tanto, merecían un nombre propio, se adoptó el nombre de "fitoplasmas" para denotarlos colectivamente (Welliver, 1999).

Los fitoplasmas pertenecen al grupo de los mollicutas (del latín *molis*: suave y *cutis*: piel), los cuales representan un grupo filogenéticamente coherente de patógenos que colonizan un amplio espectro de hospedantes y vectores, mostrando una rígida especificidad tanto hacia sus hospedantes, vectores y por el tejido que infectan (Fletcher *et al.*, 1998; Razin *et al.*, 1998). Los mollicutas, y por tanto los fitoplasmas, están relacionados filogenéticamente con las eubacterias Gram-positivas (Woese, 1987) de las cuales evolucionaron retrógradamente por una drástica reducción de su genoma, resultando en la pérdida de muchas de sus habilidades biosintéticas, incluyendo aquellas rutas más comunes y consideradas esenciales para cualquier organismo vivo, como consecuencia de su vida parasítica (Mushegiam y Koonin, 1996; Chambaud *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2004). Los estudios filogenéticos sugieren que el ancestro común de los fitoplasmas es *Acholeplasma laidlawii* (Bertaccini, 2007).

1.1.2. Clasificación de los fitoplasmas basada en análisis de RFLPs

A pesar de todo lo que actualmente se sabe de los fitoplasmas, estos aún no han podido ser aislados y cultivados *in vitro* y por consiguiente, los criterios fenotípicos usualmente utilizados para clasificar taxonómicamente a los demás procariotas no han podido aplicarse a los fitoplasmas y ha limitado que su caracterización sea principalmente por el uso de la biología molecular, no obstante, ésta ha permitido construir una clasificación confiable de estos organismos (Davis y Sinclair, 1998; Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2006).

Los primeros sistemas de identificación y clasificación de los fitoplasmas se basaron en la especificidad de la transmisión de los vectores, la gama de especies hospedantes y la expresión de síntomas por parte del hospedante. El desarrollo de las pruebas moleculares tales como los anticuerpos monoclonales y policlonales, la clonación de fragmentos específicos del ADN del fitoplasma y el desarrollo de iniciadores específicos para fitoplasmas utilizados en la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y los análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), han permitido detectar e identificar con mayor eficacia una gran cantidad de distintos fitoplasmas y realizar estudios de sus interrelaciones genéticas (Davis y Sinclair, 1998; IRPCM, 2004).

Así, la clasificación taxonómica de los fitoplasmas es la siguiente:

Super reino: Bacteria
Filum: Tenericutes
Clase: Mollicutes
Orden: Acholeplasmatales
Familia: Acholeplasmataceae
Genero: *Candidatus* Phytoplasma

Casi todos los fitoplasmas poseen dos operones de ARN ribosomales que parecen ser idénticos, conformados por los genes 16S y 23S, los cuales codifican para ARNt isoleucina y parte de la secuencia para ARNt alanina (Firrao *et al.*, 2005), en medio de ellos se encuentra una región espaciadora de aproximadamente 300 pb, la cual la diferencia de los dos genes mencionados (y de los demás mollicutas), ya que al no estar bajo una presión evolutiva considerable, es bastante variable comparado con los genes 16S y 23S, lo que resulta útil en su conjunto esta región genómica ribosomal para identificar y clasificar a los fitoplasmas.

Desde finales de la década de los 80's y principios de la década de los 90's del siglo pasado, el análisis de la región 16S a través de los patrones de los RFLPs permitió clasificar rápida y económicamente a los

fitoplasmas. Este esquema ha sido mejorado y aumentado y, en la actualidad se reconocen 18 grupos y más de 50 subgrupos (Gundersen *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2007).

Los análisis filogenéticos han coincidido con los esquemas basados en los patrones obtenidos con las enzimas de restricción, así como también con los análisis de la secuencia de estos mismos genes, por lo que dada la congruencia de los resultados conjuntos se ha propuesto que cada grupo represente al menos una especie distinta de fitoplasma (Lee *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007). Los avances recientes en la clonación de ADN y de secuenciación han reducido enormemente los costos de este tipo de análisis, mejorando también la exactitud de los datos analizados, por lo que es posible encontrar cientos de secuencias del gen 16S RNAr en las bases de datos públicas con NCBI (National Center for Biotechnology Information). Lo anterior permite simular digestiones de sitios de restricción *in silico* y generar patrones de RFLPs virtuales, los cuales son consistentes con los patrones obtenidos de RFLPs de la técnica estándar (Wei *et al.*, 2007). Utilizando dichos análisis computacionales se obtuvo una diferenciación y clasificación más rápida de los fitoplasmas, ya que con 17 enzimas distintas digiriendo *in silico* una región de 1.25 kb de la región 16S ribosomal en aproximadamente 800 secuencias, presentados en geles virtuales se logró obtener 10 nuevos grupos y numerosos subgrupos más, algunos de los cuales hasta el momento habían sido inclasificables (Wei *et al.*, 2007).

1.1.3. Taxonomía provisional de los fitoplasmas

Una especie bacteriana es definida de acuerdo a la recomendación del Comité Internacional de Sistemática de Bacterias, como aquellas cepas que comparten al menos el 70 % de ADN homólogo, basados en la secuencia completa del genoma bacterial. El nombramiento de una nueva especie requiere la descripción de la especie en un medio de cultivo bacteriológico, sin embargo, la descripción fenotípica y la homología del ADN total aplicada en los fitoplasmas no ha sido posible todavía. Hasta el momento solo dos fitoplasmas han sido secuenciados totalmente (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006), por tanto, se ha sugerido un sistema de clasificación provisional para los fitoplasmas usando el subfijo "*Candidatus*" (*Ca*) para agruparlos como género (IRPCM, 2004).

Las especies *Ca.* fitoplasma son definidas arbitrariamente con base al análisis del gen 16S ADN ribosomal y de acuerdo al Programa Internacional de Investigación para la Micoplasmología Comparativa, Grupo de Trabajo de Fitoplasmas y Espiroplasmas (IRPCM, 2004). Las especies pertenecientes al género *Ca.* fitoplasma tienen una secuencia única del gen 16S ADNr (CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT) que los distingue claramente como un grupo monofilético dentro de la Clase mollicuta (Firrao *et al.*, 2005). Por lo tanto, una especie *Ca.* Fitoplasma se refiere a una única

y sencilla secuencia de ADN del gen 16S ADNr (> 1200 pb) y una cepa puede reconocerse como nueva especie *Ca. fitoplasma* si su secuencia del gen 16S ADNr comparte <97.5% de similitud con cualquier otra secuencia del gen 16S ADNr descrita previamente como especie *Ca. fitoplasma* (IRPCM, 2004). Asimismo, dos fitoplasmas que comparten más del 97.5% de similitud del gen 16Sr ribosomal pero que claramente representan a poblaciones distintas, pueden ser declarados como diferentes especies *Ca. fitoplasma* si reúnen los siguientes criterios: i) Son transmitidos por vectores diferentes, ii) tienen hospedantes naturales distintos (o al menos su conducta es significativamente diferente en el mismo hospedante) y iii) existe evidencia de diversidad molecular. Se han descrito, siguiendo los mencionados criterios, 26 especies de *Ca. fitoplasmas* en total (IRPCM, 2004).

El progreso hacia un nuevo sistema taxonómico más formal de los fitoplasmas y el abandono del término *Candidatus* es una de las metas más buscadas, sin embargo, es necesario que se cumplan ciertos requisitos, siendo el objetivo primordial el de encontrar un criterio que reemplace a los usados actualmente para delinear y describir las especies *Ca. fitoplasma*. El uso de sistemas de marcadores moleculares multilocus puede aumentar la precisión en cuanto a la clasificación y descripción de los fitoplasmas y ayudar a resolver este problema (Lee *et al.*, 2006).

1.1.4. Características generales y moleculares de los fitoplasmas

Los fitoplasmas son organismos autoreplicativos carentes de los péptidoglucanos que forman la pared celular de las bacterias, rodeados únicamente por una membrana plasmática (Razin, 1978), también son organismos pleiomórficos rodeados de filamentos y con un diámetro medio que va de los 200 a los 800 nm (IRPCM, 2004), se distinguen por tener genomas con porcentajes de guaninas y citosinas muy bajos, que van del 23 al 29% (Glass *et al.*, 2000; Chambaud *et al.*, 2001; Papazisi *et al.*, 2003; Oshima *et al.*, 2002; 2004), el tamaño de sus cromosomas varía de 530 kpb a 1350 kpb (Marcone *et al.*, 1999). Además del cromosoma, los fitoplasmas poseen ADN extracromosomal, muy parecido a los plásmidos circulares, del cual, aunque se sabe muy poco, se conoce que juega un papel evolutivo muy importante en la patogenicidad y virulencia, ya que este ADN extracromosómico tiene la capacidad de recombinarse entre fitoplasmas distintos y crear diversidad genética, proveyendo el potencial para una rápida adaptación a nuevas condiciones ambientales (Nishigawa *et al.*, 2002). Otra característica particular de este grupo es que utilizan el codón UGA como codón de alto y no para codificar triptófano como los demás procariotas, incluyendo a los demás mollicutas (Hogenhout *et al.*, 2008).

La diversidad genómica de los grupos de fitoplasmas parece estar correlacionado con el hecho de que compartan vectores, plantas

hospedantes o ambos de manera natural, de modo que el nivel de intercambio de información genética entre cepas de fitoplasmas en un grupo dado esta determinado por tres vías, las interacciones entre el vector, la planta hospedante y el fitoplasma (Davis y Sinclair, 1998).

Considerando que los fitoplasmas tienen genomas muy pequeños, poseen características comunes únicas a pesar de las diferencias entre ellos (Davis *et al.*, 2007). Una de las similitudes de los fitoplasmas es la ausencia de genes integrantes de importantes rutas metabólicas, como por ejemplo, la ATP sintasa y la pentosa fosfato, las cuales están involucradas en la producción del ATP y la ribosa 5-fosfato, respectivamente (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006). En contraste a esas carencias, el genoma de los fitoplasmas contiene numerosos genes codificantes de proteínas transportadoras involucradas en la importación de sustancias que se encuentran en el citoplasma de la célula hospedante y debido a que los fitoplasmas no poseen los genes típicos relacionados con la patogenicidad encontrados en otras bacterias, es probable que tengan genes codificantes de factores de virulencia novedosos para los fitopatólogos, los cuales afectan las funciones celulares del hospedero e induciendo los síntomas observados en la planta (Kakizawa *et al.*, 2006; Hoshi *et al.*, 2009).

Estas características únicas del genoma de los fitoplasmas son resultado de una evolución reductiva durante la adaptación parasítica dependiente en un ambiente rico en nutrientes (Oshima *et al.*, 2002; 2004; Davis *et al.*, 2007), pero quizás la característica más importante compartida por los fitoplasmas hasta ahora encontrada es que contienen muchas secuencias multicopia y regiones hipervariables, franqueadas por genes constantes y regiones palindrómicas, organizadas en unidades potencialmente móviles (PMUs - Potential mobile units) (Bai *et al.*, 2006) y mosaicos de secuencias variables (SVM - sequence variable mosaics) (Jomantiene y Davis, 2006). Ambas agrupaciones genéticas tienen una composición similar, basada en la presencia de transposasas y proteínas codificadas por genes ancestrales asociados a fagos, por lo que se sugiere que en la evolución temprana de los fitoplasmas hubo un evento de transferencia genética horizontal (Bai *et al.*, 2006; Jomantiene y Davis, 2006; Davis *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008). Estos elementos móviles contienen genes codificantes de ADN helicasas, primasas y otros genes involucrados en la replicación, recombinación y reparación del ADN, transporte y metabolismo de nucleótidos, traducción y estructura ribosomal (Kakizawa *et al.*, 2006; Tran-Nguyen, 2008).

Muchos de los genes contenidos en las unidades móviles tienen secuencias señal hacia la superficie membranal, que incluyen tanto proteínas transmembranales como de secreción y de interacción con el hospedante. La duplicación de estos genes permite crear una plataforma potencial de plasticidad genómica, permitiéndole tener un mecanismo diferente para producir variabilidad y adaptarse a diversos ambientes tanto

en insectos como en plantas, siendo muy importante para los fitoplasmas si consideramos que carecen de los sistemas comunes de recombinación presentes en otros grupos de bacterias, además de determinar el tamaño del genoma final de los mismos (Bai *et al.*, 2006; Jomantiene y Davis, 2006; Kakizawa *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2007).

1.1.5. Ciclo de vida de los fitoplasmas.

Los fitoplasmas tienen una biología única, distinguible de todas las demás bacterias fitopatógenas, debido a que requieren diversos hospedantes para su replicación, sobrevivencia y dispersión; son de los pocos patógenos capaces de multiplicarse en organismos de dos reinos distintos: en las plantas (Reino Plantae) y en los insectos (Reino Animalia) (Bertaccini, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008). Incluso, aunque es necesaria la aplicación de estudios moleculares más precisos, todo parece indicar que también son capaces de infectar a hongos del género *Ramaria* (Reino Fungi) (Martín *et al.*, 2002). Todos los fitoplasmas que se conocen son transmitidos por insectos fitopatógenos (Hogenhout *et al.*, 2008).

En las plantas, los fitoplasmas se encuentran principalmente en los elementos del floema, un ambiente rico en nutrientes, que toman indiscriminadamente (Christensen *et al.*, 2004). Son transmitidos a las plantas por insectos succionadores de savia pertenecientes al orden de los Homópteros (Familias: Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae (Lee *et al.*, 1998; Bové y Garnier, 2002; Weintraub *et al.*, 2005). También existe evidencia de que algunos fitoplasmas son transmitidos a través de los embriones vegetales y la progenie de los insectos vectores (Córdova *et al.*, 2003; Weintraub *et al.*, 2005).

Los fitoplasmas son transferidos a las células del floema por el vector y de allí se dispersan sistémicamente a toda la planta usando la continuidad del sistema vascular de la planta. Ya que los fitoplasmas son muy pequeños, estos pasan por los poros de los tubos cribosos (Christensen *et al.*, 2005). En los insectos, los fitoplasmas pueden encontrarse intra o extracelularmente en los tejidos del insecto, los patógenos deben atravesar las células intestinales, replicarse en varios tejidos del insecto, pasar a las células glandulares salivales, en orden de alcanzar la saliva del insecto para que de esa manera pueda ser introducido a una planta de nuevo (Hogenhout *et al.*, 2008).

Las maneras en que los fitoplasmas afectan a las plantas e insectos hospedantes son consistentes con su ciclo de vida, ya que los fitoplasmas dependen de las interacciones tanto con las plantas como con los vectores para su sobrevivencia y dispersión, estos parecen convertir a las plantas aún más atractivas para los vectores, aunque no se sabe cómo, sin embargo, los insectos prefieren tejidos u órganos vegetales jóvenes con un color verde amarillento para alimentarse y para colocar sus huevos y,

precisamente estas características sintomáticas son las provocadas por los fitoplasmas en las plantas hospedantes (Hogenhout *et al.*, 2008). Los fitoplasmas también pueden causar el apagamiento de las respuestas generales de defensa a insectos en las plantas, tales como las rutas de señalamiento de jasmonatos, por lo que se puede decir que los fitoplasmas manipulan a los vectores y a las plantas hospedantes para incrementar sus oportunidades de sobrevivencia y dispersión (Hogenhout *et al.*, 2008).

1.1.6. Síntomas inducidos por los fitoplasmas

Un gran número de enfermedades en cientos de especies de plantas son causadas por los fitoplasmas, incluyendo cultivos importantes para el hombre, como plantas de ornato y maderables, provocando con ello grandes pérdidas económicas a los productores (Lee *et al.*, 2000).

Las plantas infectadas por fitoplasmas exhiben una gran gama de síntomas que sugieren profundos disturbios en el balance de hormonas vegetales y reguladores del crecimiento, desordenes en las funciones del floema y alteración del contenido de la savia (Chang, 1998; Christensen *et al.*, 2005; Bertaccini, 2007). Estudios han mostrado que los fitoplasmas son capaces de secretar proteínas de virulencia que afectan las células vegetales, las cuales pueden estar relacionadas con los cambios hormonales observados (Hogenhout *et al.*, 2008). En general, los efectos causados por los fitoplasmas claramente son en detrimento de la planta, aunque algunas pueden ser resistentes o tolerantes a la infección (Lee *et al.*, 2000). Los síntomas inducidos por fitoplasmas son casi exclusivos de éstos, como es el caso de la blastomanía (proliferación de brotes axilares), virescencia (reverdecimiento de las flores) y filodia (modificación de los pétalos y sépalos en estructuras parecidas a hojas), obviamente los efectos son desastrosos para la producción de semillas y la reproducción de las plantas infectadas (Welliver, 1999).

Otros síntomas son elongaciones anormales o internudos muy delgados, enanismo generalizado, hojas decoloradas, amarillentas o rojizas, enrollamiento de hojas y caída prematura de frutos (Lee *et al.*, 2000). Los síntomas inducidos a las plantas varían de acuerdo al fitoplasma y con la etapa de infección, internamente también pueden causar necrosis en el floema y a menudo, un exceso en la formación de tejidos floemáticos, resultando en efectos secundarios como hinchamientos por la acumulación de carbohidratos en hojas maduras, disminución del contenido de almidones e inhibición de la fotosíntesis (Christensen *et al.*, 2005). Los síntomas causados por los fitoplasmas fue uno de los factores para nombrar a los patógenos que causaban la enfermedad, sin embargo, resultados de pruebas filogenéticas han revelado que fitoplasmas cercanamente relacionados pueden causar diferentes tipos de síntomas en las plantas infectadas y que dos fitoplasmas distintos pueden causar síntomas

similares, por lo que ahora es una forma de nombramiento en desuso (Lee *et al.*, 1998).

Los efectos de los fitoplasmas en los insectos no son conclusivos, pueden disminuir la adecuación y en algunos casos pueden causar la muerte prematura, aunque también se ha demostrado que en otros casos pueden prolongar la vida del insecto vector y aumentar su tasa de reproducción (Beanland *et al.*, 2000). Se propone que los fitoplasmas causan reacciones menos virulentas a sus hospedantes vectores. Una razón podría ser que el patógeno gana muy poco dañando a su vector, el cual constituye su único vehículo de transmisión (Christensen *et al.*, 2005).

1.1.7. Medidas de control de la dispersión de las enfermedades causadas por fitoplasmas

El control de la dispersión de enfermedades causadas por fitoplasmas es demasiado difícil, si no imposible, ya que no existen métodos curativos cuando la planta está infectada, la tolerancia o resistencia es rara y las estrategias clásicas de control incluyen: a) la erradicación de las plantas enfermas con el fin de disminuir la cantidad de inóculo, b) tratamientos con insecticidas para mermar las poblaciones del insecto vector, c) el uso de antibióticos como la oxitetraciclina, a la cual son sensibles los fitoplasmas, d) cuarentenas para evitar la propagación de los fitoplasmas por el movimiento de material vegetal infectado y e) la producción y uso de variedades e híbridos resistentes a fitoplasmas. Todas estas medidas han contribuido a disminuir la dispersión de los fitoplasmas, sin embargo, tanto el uso de insecticidas como el de antibióticos es poco recomendado por su alto costo y por el riesgo que representa en los casos en que los productos son para consumo humano (McCoy *et al.*, 1983; 1989; Bové y Garnier, 2002).

1.1.8. Hospedantes alternantes

La gama de plantas hospedantes para cada fitoplasma depende del comportamiento alimenticio del vector: a) insectos vectores monófagos, los cuales se alimentan de una sola especie de planta, transmitirán a los fitoplasmas solo en poblaciones de esa especie vegetal en particular, b) los insectos oligófagos, diseminarán el fitoplasma en pocas especies vegetales, en cambio, c) los insectos polífagos, que se alimentan de diferentes especies vegetales, transmitirán a los fitoplasmas a un mayor número de plantas (Lee *et al.*, 1998).

La evolución de los fitoplasmas es regida por las características ecológicas que permiten que surjan nuevas especies de fitoplasmas, ejemplos de éstos se dan cuando algunos fitoplasmas comparten tanto insectos vectores como plantas hospedantes y con el tiempo, las plantas

hospedantes pueden estar infectadas con dos o más fitoplasmas, la interacción y el intercambio horizontal de material genético entre estos fitoplasmas puede suceder y como resultado se da el surgimiento y evolución de nuevas cepas de fitoplasmas, ocasionalmente y cuando los insectos vectores polívoros se alimentan de estas plantas o insectos oligófagos se ven forzados a alimentarse de estas mismas plantas, aún cuando no son sus fuentes de alimentación habituales, por lo tanto, estas plantas no hospedantes pueden quedar infectadas por el fitoplasma o los fitoplasmas que poseen estos insectos, creándose nuevos nichos para fitoplasmas que pueden evolucionar independientemente de otras cepas de fitoplasmas, o pueden ser transmitidos nuevamente a las plantas de donde procedieron o nuevas plantas no hospedantes por los mismos u otros insectos (Lee *et al.*, 1998). Si los efectos causados por los patógenos en nuevos hospedantes no son severos y no causan una mortalidad elevada, se considera que son hospedantes alternos, y a diferencia de los hospedantes principales, éstos no son esenciales para la sobrevivencia del patógeno, pero podrían representar reservorios permanentes de fitoplasmas.

En general, aunque no es exclusivo, los fitoplasmas son más virulentos o dañinos en plantas cultivadas, causando pérdidas totales en algunos de ellos. Los hospedantes alternantes lo conforman plantas creciendo alrededor de los cultivos, pudiendo incluir entre estas a plantas nativas. Por supuesto, lo anterior es desde un punto de vista antropocéntrico, ya que se ha detectado que los fitoplasmas infectan a una gran cantidad de plantas nativas y es posible que esta interacción sea desde tiempo atrás, donde las interacciones de los vectores, planta y patógeno se han adaptado y establecido. Así, cuando se agregan cultivos en esas zonas, la oportunidad de los vectores y de los fitoplasmas que portan, se incrementan al tener una fuente de alimentación homogénea, continua, abundante y susceptible. Aún cuando se tengan programas de control de vectores y fitoparásitos es difícil erradicar el problema totalmente, ya que los hospedantes alternantes constituyen una fuente de inóculo permanente, e incluir a este tipo de hospedantes a dichos programas, es en la mayoría de los casos, imposible.

1.2. Amarillamiento letal del cocotero

1.2.1. Fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero

En las últimas cinco décadas del siglo pasado el amarillamiento letal del cocotero (AL) se convirtió en la más severa enfermedad que afecta a *C. nucifera*, matando a millones de palmas en la regiones del Caribe y el Golfo de México, lo que ha tenido como resultado severas pérdidas de producción para los cientos de miles de personas que dependían directa o indirectamente del cultivo de esta planta (Arellano y Oropeza, 1995;

Zizumbo, 1998; Oropeza *et al.*, 2005). En las costas del Pacífico, se han detectado en cocotero fitoplasmas del grupo del AL, pero distintos a los encontrados en esta especie en Yucatán (Harrison *et al.*, 2002) El AL es diseminado por el insecto *Myndus crudus* Van Duzee (Homoptera: Cixiidae) (Howard *et al.*, 1982; Arellano y Oropeza, 1995).

El cocotero es un cultivo que se introdujo a México por lo menos en cuatro ocasiones independientes durante la época colonial (1539 – 1810), variando las fechas en que fueron traídos, los sitios de origen de las palmas y los lugares del país en donde fueron cultivados. Estos hechos dieron como consecuencia que exista en el país una variabilidad confirmada por técnicas genéticas, isoenzimáticas, morfofisiológicas y moleculares, que permiten agrupar a *C. nucifera* en cinco ecotipos distintos que varían en la susceptibilidad hacia el AL (Oropeza y Zizumbo, 1997; Zizumbo *et al.*, 2009). Las poblaciones de cocotero en la Península de Yucatán están conformadas por el ecotipo llamado “Alto del Atlántico” y son las más susceptibles al AL, por el contrario, el ecotipo “Enano Malayo” fue el más resistente de los cinco grupos. En los otros tres ecotipos “Alto del Pacífico” numerados del 1 al 3, se encontró una susceptibilidad diferenciada, ubicándose entre aquellos valores de los dos ecotipos ya mencionados, teniendo el ecotipo 3 mayor mortalidad, seguida de los ecotipos 1 y 2 (Zizumbo *et al.*, 2009).

Los primeros síntomas visuales de la enfermedad de las plantas afectadas por el AL es la caída prematura de la mayoría de los frutos independientemente del estado de desarrollo en que se encuentren, le sigue el necrosamiento de las inflorescencias, donde aquellas que son afectadas inicialmente muestran una necrosis parcial que se extiende hacia las nuevas inflorescencias conforme la enfermedad progresa. Las flores masculinas mueren y ningún fruto se forma de las inflorescencias afectadas. Después empiezan a amarillentarse las hojas más viejas, extendiéndose eventualmente hasta las hojas medias y hasta a las hojas más jóvenes que se encuentran en la parte superior de la planta. Las hojas adquieren después un color marrón, se desecan y mueren, permanecen colgando por algunos días y finalmente caen, quedando únicamente el tronco “desnudo” (Harrison y Oropeza, 2008).

Dada la severidad de los casos, se estableció un programa de rehabilitación consistente en el reemplazamiento de las poblaciones locales susceptibles en Jamaica por un híbrido de dos palmas resistentes (Enano Malayo Amarillo x Alto de Panamá), conocido como MayPan, lo cual resultó en el método más eficiente para enfrentar al amarillamiento letal. Este mismo programa se extendió a otros países afectados por el AL, incluyendo México. Desafortunadamente, a mediados de la década de los ochentas se observaron pérdidas considerables de ecotipos resistentes como el Enano Malayo y los híbridos MayPan en el estado de Florida, E.U.A. (Howard *et al.*, 1987). Recientemente la propagación del AL en Jamaica, ha eliminado a

dos terceras partes de algunas poblaciones de Enanos Malayos y la variedad MayPan (Harrison *et al.*, 2002). El estudio de la heterogeneidad de la región 16S ADNr no mostró variabilidad entre los fitoplasmas causantes de estas pérdidas con relación a los fitoplasmas a los cuales las palmas son resistentes (Harrison *et al.*, 2002).

1.2.2. Proyecto para salvaguardar la producción del cocotero.

Debido a la importancia agronómica y etnobotánica de las palmeras de cocotero se creó un grupo internacional formado por Jamaica, Honduras y México, que con el apoyo de la organización CFC (Common Fund for Commodities) tiene el objetivo general de mejorar y mantener la producción de cocotero de una manera sustentable, particularmente de los pequeños productores. El plan de manejo de este grupo de países está integrado por varios componentes, entre estos componentes destacan: la investigación y desarrollo de medidas que permitan identificar y emplear germoplasma de cocoteros resistentes a la enfermedad. Estudios sobre epidemiología y optimización de métodos existentes y desarrollo de nuevos para la caracterización y detección del patógeno, que permita detectar a los patótipos nuevos, capaces de romper la resistencia de los ejemplares "resistentes".

El componente de epidemiología esta compuesto por objetivos que incluyen analizar otras especies de palmas nativas que coinciden o se intercalan en la distribución de los cultivos de *C. nucifera*, las cuales podrían comportarse como hospedantes alternantes y por tanto ser reservorios para el fitoplasma del AL y/o poseer fitoplasmas diferentes, los cuales en un momento dado puedan ser capaces de infectar a los cocoteros debido a la posibilidad de compartir a los insectos vectores, por lo tanto es posible que en una misma planta se encuentre fitoplasmas distintos simultáneamente, pudiendo provocar un intercambio de su información genética, lo cual ya ha sido comprobado con otros fitoplasmas (Nishigawa *et al.*, 2002) dando como resultado una mayor diversidad genómica que se traduzca en propiedades no conocidas de patologías en las plantas de la región.

El componente de optimización de métodos existentes y el desarrollo de nuevos métodos, tiene como objetivo particular: aplicar nuevas técnicas para detectar y caracterizar fitoplasmas que ya han sido clasificados, de modo que permita distinguir diferencias entre cepas que por los métodos comunes de diagnóstico se reportan como iguales y que sin embargo, son capaces de transmitirse e infectar de manera diferenciada a plantas con supuesta tolerancia o resistencia a la enfermedad, esto va desde utilizar nuevas herramientas de diagnóstico, hasta incrementar las regiones genómicas utilizadas comúnmente, de modo que se incluyan genes codificantes al azar, genes que se sabe poseen altos niveles de conservación, así como genes que debido a su naturaleza se encuentran

expuestos a altas presiones selectivas, como es el caso de los aquellos genes que codifican para proteínas membranales, las cuales pueden ser las responsables de la especificidad al hospedero (Kakizawa *et al.*, 2006).

La presente tesis forma parte de este proyecto internacional y tiene como objetivo detectar y caracterizar, por los métodos de PCR y RFLPs, cepas de fitoplasmas del AL extraídos de la palmera *Sabal mexicana*, la cual tiene una ubicación geográfica que se traslapa en los sitios donde también se encuentra palmeras de *C. nucifera* y que, en estudios preliminares, se detectó la presencia de un fitoplasma del grupo del amarillamiento letal. El análisis se extiende a otras palmas encontradas en los alrededores de *S. mexicana* para determinar si la cercanía provoca el intercambio de fitoplasmas del mismo tipo, así como a los insectos que se consideran los vectores del AL en cocotero para determinar si estos también podrían ser los vectores de fitoplasmas en las palmas estudiadas. El presente estudio comprendió la identificación y análisis de genes codificantes de proteínas asociadas a la membrana de fitoplasmas y que podrían tener un papel importante en la interacción hospedante/patógeno determinando con ello la especificidad al hospedante y, por lo tanto, podrían significar un aporte o complementación a los sistemas de clasificación que hasta ahora se encuentran en uso. El estudio de estas proteínas también podría sentar las bases para desarrollar nuevas estrategias de control a fitoplasmas del AL.

1.3.OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal en diferentes especies de palmeras en el estado de Yucatán.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrIV en especies de palmeras distintas a *Cocos nucifera*, con base a detección por PCR (amplificación de la región 16S-ADNr).
2. Evaluar la presencia de fitoplasmas del grupo del AL en insectos *Myndus crudus*, con base a detección por PCR (amplificación de la región 16S-ADNr).
3. Caracterizar a estos fitoplasmas con base al análisis por RFLPs y secuenciación de los amplicones de la región 16S-ADNr.
4. Evaluar el potencial para detectar y caracterizar fitoplasmas del grupo del AL por PCR de regiones de genes codificantes de proteínas membranales, como son Amp, SecY y ABC.

1.4.LITERATURA CITADA

- Arellano, J. and C. Oropeza. (1995). Lethal yellowing. *En: Lethal yellowing: research and practical aspect. Oropeza et al. (Eds.). pp. 1 – 15. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.*
- Bai, X., J. Zhang, A. Ewing, S. Miller, A. Jancso Radek, D. Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J. Campbell and S. Hogenhout. (2006). Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *J. Bacteriol.* 188: 3682–3696.
- Beanland, L., C. Hoy, S. Miller and L. Nault. (2000). Influenza of Aster Yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93:271-276
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: Diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience.* 12. 673 – 689.
- Bové J. and M. Garnier. (2002). Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant science.* 163: 1083 – 1098.
- Chambaud, I., R. Heilig, S. Ferris, V. Barbe, D. Samson, F. Gallison, I. Moszer, K. Dybvig, H. Wróblewski, A. Viari, E. Rocha and A. Blanchard. (2001). The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Research.* 29: 2145 – 2153.
- Chang, C. (1998). Pathogenicity of aster yellow phytoplasma and *spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology.* 88: 1347 – 1350.
- Christensen, N., K. Axelsen, M. Nicolaisen and A. Schulz. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science.* 10: 526 – 535.
- Christensen, N., M. Nicolaisen, M. Hansen and A. Schulz. (2004). Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1175–1184.
- Córdova, I., P. Jones, N. Harrison and C. Oropeza. (2003). *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease.- *Mol Plant Pathol.* 4: 99-108.
- Davis, R. and W. Sinclair. (1998). Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology.* 88: 1372 – 1376.

- Davis, R., R. Jomantiene and Y. Zhao. (2007). Dynamic structures in phytoplasma genomes: sequence-variable mosaics (SVMs) of clustered genes. *Bulletin of Insectology*. 60: 119-120.
- Firrao, G., K. Gibb and C. Streten. (2005). Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus phytoplasma*'. *Journal of Plant Pathology*. 87: 249-263.
- Fletcher, J., A. Wayadande, U. Melcher and F. Ye. (1998). The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology*. 88: 1351 – 1358.
- Glass, J., E. Lefkowitz, S. Glass, C. Heiner, E. Chen and G. Cassell. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealiticum*. *Nature*. 407: 757 – 762.
- Gundersen, D., I. Lee, S. Rehner, R. Davis and D. Kingsbury. (1994). Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176: 5244-5254.
- Harrison N. and C. Oropeza. (2008). Coconut lethal yellowing. In: Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas, N. Harrison, G. Rao y C. Marcone (Eds.). Studium Press, Houston, USA, pp 219-248.
- Harrison, N., W. Marie, P. Jones, M. Carpio, M. Castillo, M. Doyle and C. Oropeza. (2002a). 16rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of letal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann. Appl. Biol.* 141: 183 – 193.
- Hogenhout, S., K. Oshima, E. Ammar, S. Kakizawa, H. Kingdom and S. Namba. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol.* 9: 1 – 21.
- Hoshi, A., K. Oshima, S. Kakizawa, Y. Ishii, J. Ozeki, M. Hashimoto, K. Komatsu, S. Kagiwada, Y. Yamaji and S. Namba. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *PNAS*. 106: 6416-6421.
- Howard, F., R. Atilano, C. Barrant, N. Harrison, W. Theobald and D. Williams. (1987). Unusually high lethal yellowing incidence in Malayan Dwarf coconut palms on localized sites in Jamaica and Florida. *Journal Plant. Crops*. 15: 86 -100.
- Howard, F., R. Norris and D. Thomas. (1982). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Trop. Agric.* 60: 168 – 171.

- IRPCM. (2004). '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1243 – 1255.
- Jomantiene, R. and R. Davis. (2006). Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiol Lett.* 255: 59-65.
- Kakizawa, S., K. Oshima and S. Namba. (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology.* 14: 254 – 256.
- Lee, I., D. Gundersen-Rindal and A. Bertaccini. (1998). Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology.* 88: 1359 – 1366.
- Lee, I., R. Davis and D. Gundersen-Rindal. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology.* 54: 221 – 255.
- Lee, I., Y. Zhao and K. Bottner. (2006). SecY gene sequences analysis for finer differentiation of diverse strain in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular probes.* 20: 87 – 91.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. and Seemuller, E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology.* 89, 805–810.
- Martín, M., P. Daniels, E. Torres and T. Tellería. (2003). Detection and identification of phytoplasma DNA in symptomatic mushrooms of the genus *Ramaria* (O. Gonphales). *Anales Jard. Bot. Madrid.* 60: 11 – 18.
- McCoy, R., A. Caudwell, C. Chang, T. Chen, L. Chiykowski, M. Cousin, J. Dale, G. de Leeuw, D. Golino, K. Hackett, B. Kirkpatrick, R. Petzold, R. Sinha, M. Sugiura, R. Whitcomb, I. Yong, B. Zhu and E. Seemüller. (1989). Plant disease associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb, R. y J. Tully. Eds. *The mycoplasmas.* Academic Press. New York. pp. 545 – 640.
- McCoy, R., F. Howard, J. Tsai, H. Donselman, D. Thomas, H. Basham, R. Atilano, F. Eskafi, L. Britt and M. Collins. (1983). Lethal yellowing of palms. *Univ. Florida Agri. Exp. Sta. Tech. Bull no.* 834.
- Mushegian, A. and E. Koonin. (1996). A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *PNAS.* 93: 10268 – 10273.
- Nishigawa, H., K. Oshima, S. Kakizawa, H. Jung, T. Kuboyama, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba. (2002). Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a

trigger for the biological diversity of phytoplasma?. *Microbiology*. 148: 1389 – 1396.

Oropeza, C. and D. Zizumbo. (1997). The history of lethal yellowing in México. Pages 69-76, In: *International Workshop on Lethal Yellowing-like Diseases of Coconut*, Elmina, Ghana, November 1995. S. Eden-Green and F. Ofori (eds.) Natural Resources Institute, Chatham, UK.

Oropeza, C., J. Escamilla, G. Mora, D. Zizumbo and N. Harrison. (2005). Coconut lethal yellowing. In: *Status of Coconut Genetic Resources*. Batugal P, R. Rao and J. Oliver, (ed.). IPGRI-APO, Serdang, Malaysia, pp. 349–363.

Oshima, K., H. Miyata, O. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, H. Jung, K. Furuki, M. Yanazaky, S. Suzuki, T. Kuboyama, M. Ugaka and S. Namba. (2002). Minimal Set of Metabolic Pathways Suggested from the Genome of Onion Yellows Phytoplasma. *J. Gen. Plant Pathol.* 68 : 225-236

Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H. Jung, W. Wei, S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature genetics*. 36: 27 – 29.

Papazisi, L., S. Gorton, G. Kutish, P. Markham, G. Browning, K. Nguyen, S. Swartzell, A. Madan, G. Mebriac and S. Coary. (2005). The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Row. *Microbiology*. 149: 2307 – 2316.

Razin, S. (1978). The *Mycoplasmas*. *Microbiology Review* 42: 414 – 470.

Razin, S., K. Yogev and Y. Naot. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Review*. 62: 1094 – 1156.

Tran-Nguyen, L., M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt and K. Gibb. (2008). Comparative Genome Analysis of “*Candidatus* Phytoplasma australiense” (Subgroup *tuf*- Australia I; *rp-A*) and “*Ca. Phytoplasma asteris*” Strains OY-M and AY-WB. *J. Bacteriol.* 190: 3979–3991.

Wei Wei, Robert E. Davis, Ing-Ming Lee and Yan Zhao. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1855–1867.

Wei, W., R. Davis, R. Jomantiene and Y. Zhao. (2008). Ancient, recurrent phage attacks and recombination events shaped dynamic sequence-variable mosaic structures at the root of phytoplasma genome evolution. *PNAS*. 105:11827-11832.

- Weintraub, P. and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91-111.
- Welliver, R. (1999). Diseases caused by phytoplasmas. *Plant pathology*. 25: 17 – 22.
- Woese, C. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology review*. 51: 221 – 271.
- Zizumbo D, P. Colunga-GarcíaMarín, M. Fernández-Barrera, N. Torres-Hernández and C. Oropeza (2009). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 156: 23 – 33.
- Zizumbo, D. (1998). Diversidad del cocotero en México y su evaluación al amarillamiento letal. *Boletín de la sociedad botánica de México*. 62: 157 – 170.

Capítulo 2

Occurrence of a lethal yellowing group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucatan, Mexico

Roberto Vázquez-Euán¹, Nigel Harrison², María Narvaez¹ and Carlos Oropeza¹

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Unidad de Biotecnología, Yucatán 97200, México; ²University of Florida, Plant Pathology Department, Research and Education Center, Fort Lauderdale 33314, USA.

ABSTRACT

The occurrence of 16SrIV group phytoplasmas in palm species *Sabal mexicana* and *Pseudophoenix sargentii* is reported here for the first time. Palms showed leaf decay and leaf yellowing syndromes respectively. An amplification product (1.4 kb) was obtained in symptomatic *S. mexicana* (18 of 21) and *P. sargentii* (1 of 2) palms sampled in different locations in Yucatan State, Mexico, five of the positive *S. mexicana* and the positive *P. sargentii* palms died. The identity of the phytoplasmas isolated from these species was determined by RFLP profiling with restriction enzymes *AluI* and *HinfI*, showing there could be two phytoplasma strains of the 16SrIV group. In one *S. mexicana* palm, the profile was the same observed with these enzymes for phytoplasmas of 16SrIV-A subgroup, previously associated with *Cocos nucifera* palms, and in the rest of the palms including the *P. sargentii* palm the profile was for phytoplasmas of the 16SrIV-D subgroup. These identities were supported by analyses of the amplicons obtained by nested PCR by nucleotide-nucleotide BLAST analysis. Geographical distribution of the association *S. mexicana* / 16SrIV group phytoplasmas was found widely dispersed in Yucatan State. A potential role of *S. mexicana* palms as a permanent source of phytoplasma inoculum is suggested. Besides *P. sargentii*, other palm species *Thrinax radiata* and *Cocos nucifera* coexisting with *S. mexicana* palms were also sampled and analyzed.

Key words: *Sabal mexicana*, 16SrIV group, phytoplasmas, Yucatán

El presente capítulo ha sido sometido como artículo a la revista *Plant Disease*

INTRODUCTION

Phytoplasmas are plant pathogenic bacteria of the class *Mollicutes* that inhabit plant phloem and insects. They are associated with diseases of several hundred plant species (18, 15, 16, 11). They are poorly characterized because they are nonculturable and difficult to isolate (2, 28), and characterization relies primarily on molecular methods. Hence, using PCR assays - with primer pairs derived from rDNA sequences and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and sequencing of the conserved 16S *rRNA* gene (15, 16) they have been classified in a monophyletic clade consisting of 18 groups and more than 40 subgroups (27). The "*Candidatus* (*Ca.*) Phytoplasma" genus has been adopted for a formal classification of these bacteria (13).

The lethal yellowing disease (LY) that affects several palm species is caused by phytoplasmas classified within one of these groups, the 16SrIV group (19), comprising six subgroups: (a) 16SrIV-A that includes the coconut LY phytoplasma '*Ca. Phytoplasma palmae*' associated with most of the palm species affected by LY; (b) 16SrIV-B that includes a phytoplasma found in coconut in Tabasco near the Yucatan Peninsula; (c) 16SrIV-C that includes Tanzanian coconut LY phytoplasmas; (d) 16SrIV-D that includes *Carludica palmata* CPY phytoplasma (3) and *Phoenix canariensis*, *P. dactylifera*, *P. sylvestris* and *Syagrus romannosoffiana* with TPD phytoplasma (10, 11); (e) 16SrIV-E subgroup that includes phytoplasmas identified in coconuts in Dominican Republic (17) and '*Ca. Phytoplasma castanae*', associated with chestnut witches' broom disease in Korea (14); (f) finally 16SrIV-F a novel subgroup that includes a phytoplasma strain discovered in *Washingtonia robusta* palm (8).

Sabal mexicana is a palm species that grows on the coastal plain of the Gulf of Mexico, from the southern part of the State of Tamaulipas to the Yucatan Peninsula (22, 23). This palm is called "guano" by Mayan people, whom use it in many ways. For instance, as an ornamental plant in urban landscape, the trunk is used for rural construction, the leaves for house roofs and different parts for handicrafts. Therefore it is the main income source of many families and economically important in Mexico (1, 22). *S. mexicana* is a species reported as resistant to LY by McCoy *et al.* (19) and still there are no reports in the literature associating it with any 16SrIV group phytoplasmas. However, in 2004-2005 three *S. mexicana* palms in the Botanical Garden of Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), in Yucatán, México, developed leaf decay symptoms and died soon after. Preliminary analysis of DNA from these palms using nested PCR, with primers specific for LY group phytoplasmas (9), resulted in positive

detection. More *S. mexicana* palms have since acquired similar symptoms in CICY's premises and other sites in Yucatán.

Therefore, the purpose of the present this study was to determine if the symptoms in *S. mexicana* in CICY's botanical garden was caused by a 16SrIV group phytoplasma, if so, characterize it, and determine if the occurrence of this event was extended to other locations in Yucatan State and if it was spread to palms of other species co-existing with to infected *S. mexicana* palms.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and evaluation of palms. Tissue samples were collected from both *S. mexicana* palms showing pronounced leaf discoloration symptoms and from symptomless, presumably healthy palms. Palms were sampled by removing either portions of the newest as yet unfurled (spear) leaf or shavings from the interior basal stem using a portable electric drill as previously described (9). Samples were obtained during the course of surveys at four sites in Yucatan State in which affected palms were evident during 2004 to 2008. They included the Botanical Garden at CICY in Merida, Periferico urban landscapes in Merida (approximately 10 km from CICY), Chicxulub Puerto (40 km north of Merida) and at Ticul (100 km south of Merida). Basal stem samples were removed from coconut (*Cocos nucifera*), green thatch palm (*Thrinax radiata*) and Buccaneer palm (*Pseudophoenix sargentii*), with or without foliar yellowing symptoms, that were growing in close proximity to symptomatic *S. mexicana* palms. In order to monitor symptom progression on *S. mexicana*, sites were revisited on a monthly basis for 18 months to collect data on numbers of green leaves, fruits and inflorescences present on symptomatic and symptomless palms.

DNA extraction and PCR assay. Samples (3 g) of leaf or stem tissues were ground separately to a fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Nucleic acids were then extracted from the pulverized tissues by the CTAB method of Doyle and Doyle (5). Aliquots of each final preparation resuspended in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) buffer were electrophoresed through standard 1% agarose gels using TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) as running buffer. DNA in gels was stained with ethidium bromide (EtBr), then visualized by UV transillumination and photographed.

DNA samples were each diluted 1:10, 1:100 and 1:1000 with sterile deionized water and 5 μ L of each dilution was used as template in a nested PCR assay following a previously described protocol (9). Briefly, initial

amplifications (35 cycles) were performed in 50 μ L reaction mixtures employing phytoplasma universal rRNA operon primer pair P1 (4) and P7 (24). Resulting products were diluted 1:20 or 1:40 with sterile deionized water, and 5 μ L of each dilution was then reamplified (35 cycles) with 16SrIV group-specific primer pair LY16Sf and LY16Sr (9). Aliquots (10 μ L) of final reaction products were electrophoresed through 1% agarose gels in TAE buffer and visualized as described above.

Analysis of PCR products. Aliquots of nested PCR products (5 μ L) were subjected to separate digestion with *AluI*, *HhaI* or *HinfI* restriction endonucleases at 37 $^{\circ}$ C for a minimum of 16 h. Products of digests were separated by electrophoresis through 8% nondenaturing polyacrylamide gels using TBE (90mM Tris-borate, 2 mM EDTA) as running buffer. DNA fragment profiles in gels were stained with EtBr and recorded as described above.

Sequencing and phylogenetic analysis of cloned rDNA products. Residual nested PCR products purified from 0.7 % agarose gels using a DNA Gel extraction kit (Millipore Corp., Bedford, MA) were ligated with vector pGEM-T (Promega, Madison, WI) and propagated in *Escherichia coli* XL1 Blue cells (Stratagene, La Jolla, CA) according to manufacturer's instructions. Recombinant plasmids were isolated from individual clones using a Plasmid Midiprep kit (Qiagen, Hilden, Germany). Cloned inserts were sequenced in full by a commercial service (Davis Sequencing, Inc. Davis, CA). To minimize potential sequencing errors, each insert was sequenced two or three times.

A database search of homologous sequences was performed by Blast analysis at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Phylogenetic interrelationships among palm-associated phytoplasmas, representatives of other phytoplasma groups (12) and *Acholeplasma palmae* were assessed based on partial 16S rRNA gene sequences (1308 bp). Sequences were aligned using ClustalW (26). A neighbor-joining tree was constructed from the aligned sequences using MEGA 4.0.1 software (25). *Acholeplasma palmae* was used as the outgroup to root the tree.

RESULTS

Phytoplasma detection

The nested PCR assay yielded a 1.4-kb fragment of phytoplasma 16S rDNA from a total of 18 of 21 (85.7%) diseased *S. mexicana* palms assayed from different locations in Yucatan State (Fig. 2.1). In the Botanical Garden at CICY, two mature, bearing *S. mexicana* palms with foliar decay symptoms were first observed in 2004 and a third developed similar symptoms during late 2005. All three palms tested phytoplasma positive and eventually died. Eighteen additional bearing palms that included five with and 13 without symptoms, were subsequently sampled at this site during 2006 and 2007. Phytoplasma infection of all five symptomatic palms was confirmed by nested PCR assay and one of these eventually died while all 13 symptomless palms produced negative results and have remained alive. Similarly, at Ticul, 3 of 6 (50%) mature *S. mexicana* palms with symptoms were found to contain phytoplasmas and one has since died whereas phytoplasmas were undetectable in all 8 mature palms lacking symptoms. In Chicxulub, only one mature palm with symptoms was observed during 2008. Although this palm tested positive for phytoplasma infection, it did not decline and die during the course of this study. In Periferico, Mérida, where 17 young, non-bearing palms were assayed for phytoplasma infection during 2006 and 2007, phytoplasmas were found in all six palms exhibiting prominent foliar discoloration symptoms, although none had died by the end of this study. Phytoplasmas remained undetected in all 11 young palms without symptoms and none developed symptoms during 2 years following sampling.

Other palm species that were co-existing with *S. mexicana* were also studied. In the Botanical Garden at CICY, a symptomatic *P. sargentii* palm with leaf yellowing symptoms was observed during 2006 and tested positive for phytoplasma and died whereas five symptomless *P. sargentii* palms at this location produced uniformly negative results when analyzed by nested PCR. Furthermore, at this same location, two *T. radiata* palms with foliar yellowing proved to be phytoplasma positive one of which subsequently died (fig. 2.1) while all seven additional symptomless *T. radiata* palms that were examined at this location produced uniformly negative results.

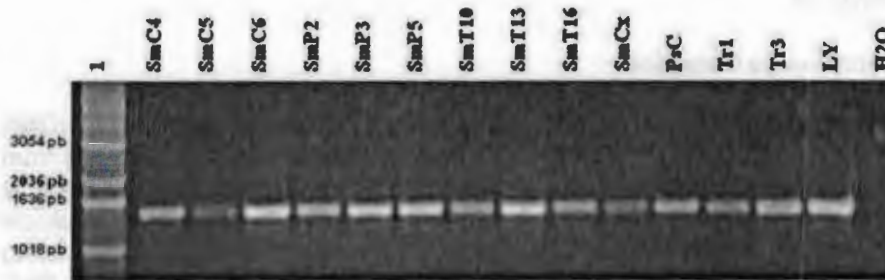


Figure 2.1. Amplification of phytoplasma 16S rDNA, from *Sabal mexicana* (Sm), *Pseudophoenix sargentii* (Ps), *Thrinax radiata* (Tr) and *Cocos nucifera* (Cn) by a nested PCR assay employing phytoplasma universal rRNA operon primer pair P1/P7 followed by LY16Sf/LY16Sr. H₂O = negative control; 1 = 1 kb DNA ladder.

In Chicxulub, three of seven (42.8%) *T. radiata* palms with leaf yellowing symptoms were found to contain phytoplasmas and one of these palms subsequently died. Of the four *C. nucifera* palms encountered with foliar yellowing symptoms (3 at Ticul; 1 at Chicxulub) only one palm at Ticul was phytoplasma positive although all four palms eventually died. The solitary diseased palm observed at Chicxulub was phytoplasma positive too and died. All seven *C. nucifera* without symptoms sampled at CICY for comparative purposes proved to be phytoplasma negative. Results of palm species evaluations for phytoplasma infection are summarized in Table 2.1.

Table 2.1. Analysis of four palm species with and without foliar discoloration symptoms at four sites in Yucatan State, Mexico for evidence of phytoplasma infection by a nested PCR assay employing phytoplasma universal rRNA operon primer pair P1/P7 followed by 16SrIV group-specific primer pair LY16Sf/LY16Sr.

Location	Palms with positive detection ^a / dead / total analyzed (with symptoms)											
	<i>Sabal mexicana</i>			<i>Pseudophoenix sargentii</i>			<i>Cocos nucifera</i>			<i>Thrinax radiata</i>		
	+	dead	Total ^b	+	dead	Total ^b	+	dead	Total ^b	+	dead	Total ^b
Mérida, CICY	08	04	21(08)	01	01	06(01)	00	00	07(00)	02	1	09(02)
Mérida, Periférico	06	00	17(06)	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ticul	03	01	14(06)	--	--	--	01	03	03(03)	--	--	--
Chicxulub	01	00	01(01)	--	--	--	01	01	01(01)	03	1	07(07)
Total	18	05	53(21)	01	01	06(01)	02	04	11(04)	05	2	16(9)

- (a) Nested PCR assay incorporating phytoplasma universal primer pair P1/P7 followed by 16SrIV group-specific primer pair LY16Sf/LY16Sr.
 (b) The number of palms with symptoms is indicated in parentheses. The difference in the totals represents those palms without symptoms.

Phytoplasma identification and characterization

Restriction fragment patterns generated by *Hha*I digestion of 16S rDNA products amplified by nested PCR revealed no apparent differences among phytoplasma strains detected in *S. mexicana* or in *P. sargentii*, *T. radiata* and *C. nucifera*. (Fig. 2.2). However, *Alu*I or *Hin*FI digests each revealed two distinct fragment profiles among palms. One profile was associated with 14 of 15 *S. mexicana* palms, a *P. sargentii* palm and one of two *T. radiata* palms while a second profile was associated with *C. nucifera* and one *T. radiata* palm, sampled at CICY as well as one *S. mexicana* palm sampled at Chicxulub (Fig. 2.2).

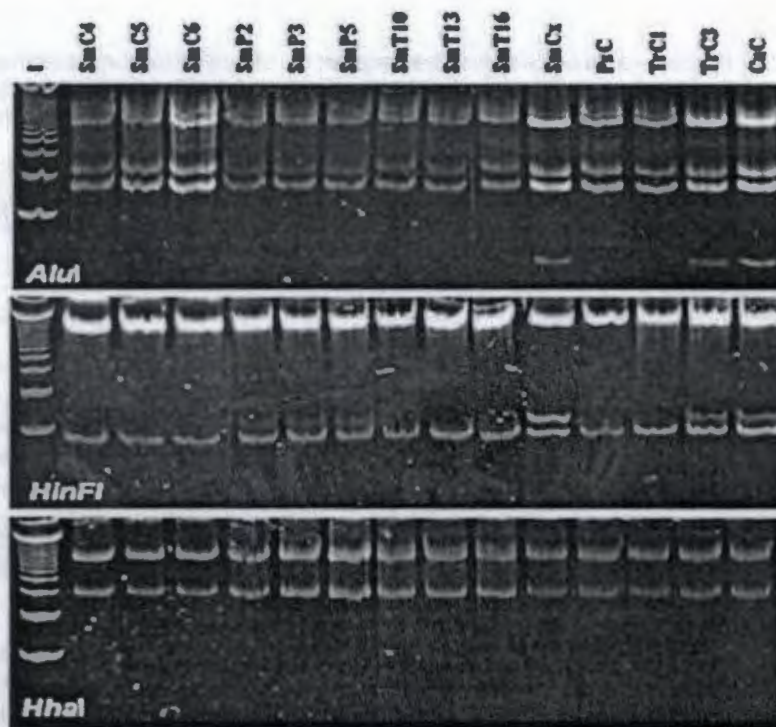


Figure 2.2. Representative restriction fragment profiles of phytoplasmas 16S rDNA amplified from symptomatic palms by a nested PCR assay incorporating rRNA gene operon primer pairs P1/P7 followed by 16SrIV group-specific primer pair LY16Sf/LY16Sr. PCR products were derived from *Sabal mexicana* (Sm), *Pseudophoenix sargentii* (Ps), *Thrinax radiata* (Tr), and *Cocos nucifera* (Cn) and digested with *Alu*I, *Hin*FI or *Hha*I endonuclease. 1 = 1 kb DNA ladder.

Of the rDNA sequences derived by nested PCR from 13 diseased *S. mexicana* palms, 12 (six from CICY, three from Periferico palm and three from Ticul palms) and from *P. sargentii* were all virtually identical differing by one or two bases only. Pairwise comparison of sequences by Blast analysis indicated that all 13 sequences were most similar (99.4-100%) to that of Texas Phoenix decline phytoplasma, a subgroup 16SrIV-D strain (GenBank accession AF434989). By comparison, sequences from *S. mexicana* palm SmCx (Chicxulub), coconut (Ticul) and *T. radiata* palm TrC2 (CICY) were most similar (99.9%, 99.9% and 99.8%, respectively) to that of coconut lethal yellowing phytoplasma (LY- Juno-C2 number accession AF498309), a known subgroup 16SrIV-A strain from Florida (Table 2.2).

Table 2.2. Percent identity between the sequences of the amplicons obtained by PCR for phytoplasma detection from the DNA samples of palms of different species: *Sabal mexicana* (Sm), *Pseudophoenix sargentii* (Ps), *Cocos nucifera* (Cn), *Thrinax radiata* (Tr).

	Sm CICY	Sm Periferico	Sm Ticul	Sm Chicxulub	LY Mexican Sabal	Cn Ticul	Ps CICY	TPD *	LY-Juno-C2*	Tr 1 CICY
Sm Periferico	99.8									
Sm Ticul	99.8	99.8								
Sm Chicxulub	99.4	99.2	99.4							
LY Mexican Sabal	99.7	99.7	99.9	99.3						
Cn Ticul	99.2	99.2	99.4	100	99.3					
Ps CICY	99.5	99.5	99.8	99.2	99.7	99.2				
TPD *	99.8	99.8	100	99.4	99.9	99.4	99.8			
LY- Juno-C2	99.1	99.1	99.3	99.9	99.4	99.9	99.1	99.3		
Tr 1 CICY	99.8	99.8	99.8	99.3	99.8	99.3	99.8	99.8	99.3	
Tr 2 CICY	98.9	98.9	99.2	99.8	99.3	99.8	98.9	99.2	99.8	99.42

* Reference sequences (source NCBI): TPD AF434989 and LY Juno-C2 AF498309.

Phylogenetic analyses of 16S rDNA from representative phytoplasmas detected in *S. mexicana* and other palm species during this study all clustered together with other members of the coconut lethal yellows phytoplasma subclade (6) (Fig. 2.3). Tree branching patterns indicated that phytoplasma strains infecting *S. mexicana* from Ticul (GU473588), *P. sargentii* (GU473591) and *T. radiata* from CICY (Tr1 GU473586) clustered together with other subgroup 16SrIV-D phytoplasma strains that included TPD and CPY whereas phytoplasmas strains infecting the *S. mexicana* from Periferico (GU473585) and from CICY (GU473587) were identical, sharing a single sub-branch suggesting that they might represent a new subgroup within the coconut lethal yellows group. Sequences of phytoplasmas strains

infecting *C. nucifera* at Ticul (GU473590) and Chicxulub, *T. radiata* (Tr2 GU473592) from CICY as well as *S. mexicana* at Chicxulub (GU473589), clustered together with the strains coconut LY phytoplasma from Florida and other members of subgroup 16SrIV-A (Fig 2.3).

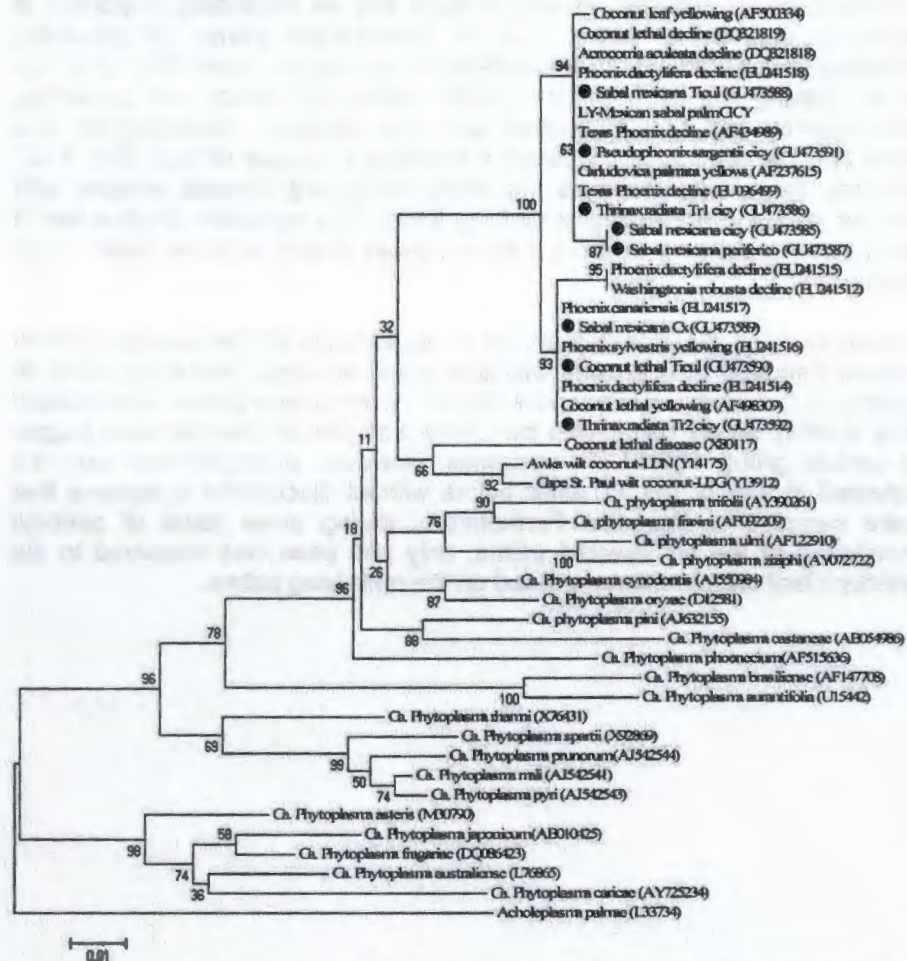


Figure 2.3. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from representative phytoplasmas in the coconut lethal yellows (16SrIV) group and other phytoplasma groups constructed by the neighbor-joining method. Phytoplasma strains sequences in this study are indicated by the symbol ●. Bootstrap values (used as an indicator of the reliability of the analysis) are shown on branches.

Symptom progression on *Sabal mexicana*.

The most pronounced symptom overall is the foliar decay on mature, bearing *S. mexicana* palms was discoloration, necrosis and loss of older leaves (Fig. 2.4A-B), which at the onset was essentially indistinguishable from that of natural leaf senescence associated with this palm species. However, as the disease developed there was an increasing proportion of decaying and dying leaves than in non-infected palms, progressively affecting younger leaves in the mid-crown and upper crown (Fig. 2.4C-D), finally leaving the palm without leaves. While leaf decay was occurring, inflorescence and fruit production was also affected. Inflorescences that were already developed produced a decreased number of fruit (Fig. 2.4E) whereas those inflorescences that were developing showed atrophy with smaller size and no fruiting at all (Fig. 2.4F). This symptom progression in adult bearing palms took more than two years ending with the death of the palm.

Excessive foliar discoloration similar in appearance of that associated with mature diseased *S. mexicana* was also found on small, immature palms at Periferico in Merida, a site where mature *S. mexicana* palms were absent (Fig. 2.4H-I). All six palms with symptoms sampled at this site were judged to contain group 16SrIV phytoplasmas. However, phytoplasmas were not detected in any of the 11 other palms without discernible symptoms that were sampled at this site. Furthermore, during three years of periodic monitoring of the six infected palms, only one palm was observed to die although leaf discoloration persisted on the remaining palms.

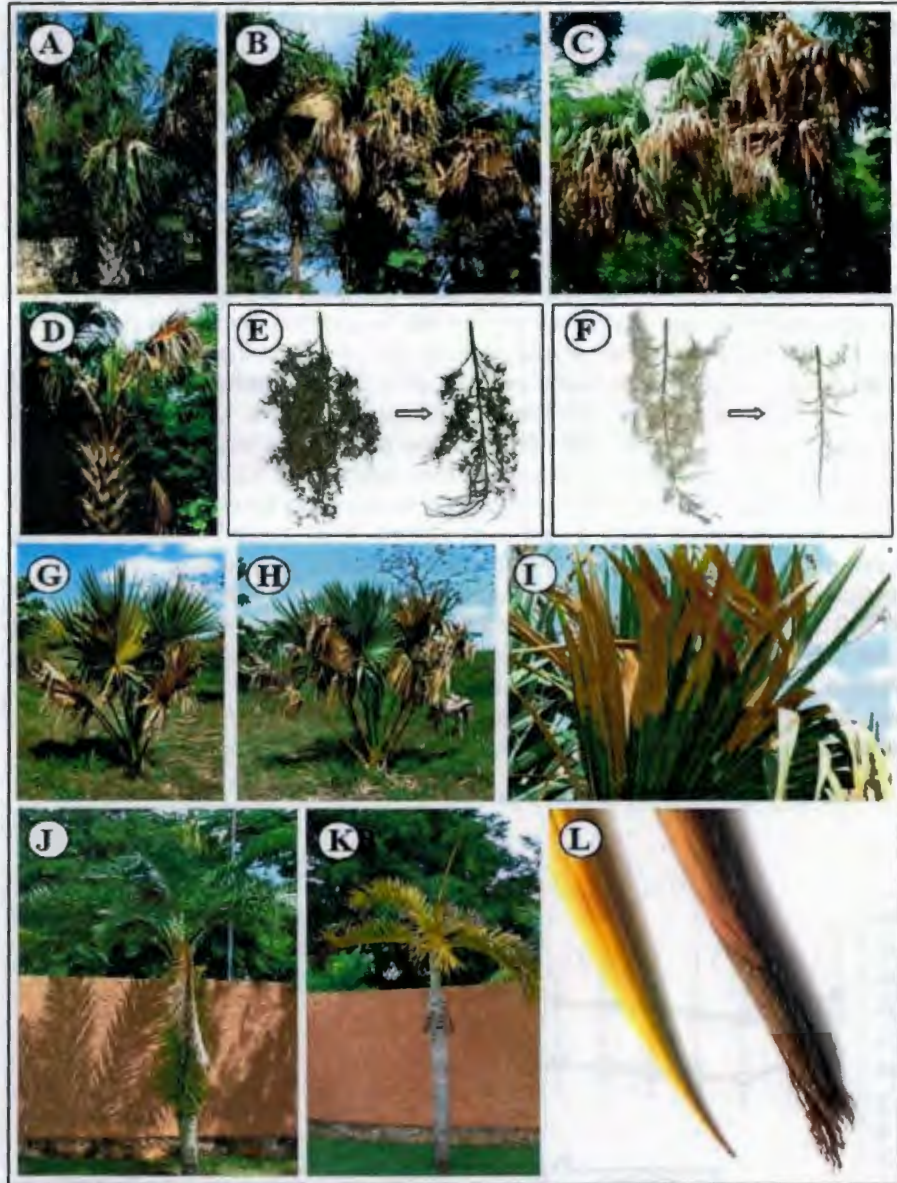


Figure 2.4. Appearance and progression of foliar decay symptoms on *S. mexicana* infected with group 16SrIV phytoplasmas. A palm lacking discernible symptoms showing mostly green leaves (A); foliar discoloration starting on basal, older leaves (B); progressive discoloration of younger leaves in the mid and upper crown (C); loss of most leaves from the crown prior proceeding palm mortality (D); and reduction in

fruit development (E) on an inflorescence showing atrophy (F). Foliar decay symptoms in young *S. mexicana* palms infected with LY phytoplasmas (G-H), detail (I). Foliar symptoms associated with phytoplasma infection of *P. sargentii*. Uninfected palm (J), infected palm (K), yellow coloration of inflorescence sheath from an uninfected palm contrasting with the discolored sheath and emerging inflorescence from an infected palm (L).

When leaf, inflorescence and fruit production was analyzed quantitatively on a monthly basis during an 18 month period, significant differences between known infected and uninfected mature palms were evident (Fig. 2.5). The average monthly number of green leaves supported by uninfected palms was 14.3 ± 0.68 whereas phytoplasma-infected palms retained 9.8 ± 0.80 green leaves, a significant lower number ($P = 0.05$). Similarly, the number of fruits per inflorescence on uninfected palms was $4,850 \pm 1,184$ and whereas the lower value of $2,212 \pm 801$ for infected palms was significantly different ($P = 0.03$). The measured decrease in the numbers of fruit per inflorescence appears to be a developmental response to infection by subgroup 16SrIV-D phytoplasmas rather than a result of natural fruit abortion which was not observed to occur in uninfected *S. mexicana* palms. In a related observation, the number of inflorescences that developed on each uninfected palm was 6.5 ± 0.58 as was significantly different ($P = 0.05$) to the value of 3.5 ± 0.52 obtained for infected palms. Furthermore, it is worth noting that none of the infected palms exhibiting symptoms from which this data was collected had died during the 18 month study period which ended in 2009 although foliar discoloration on these palms had continued to slowly intensify.

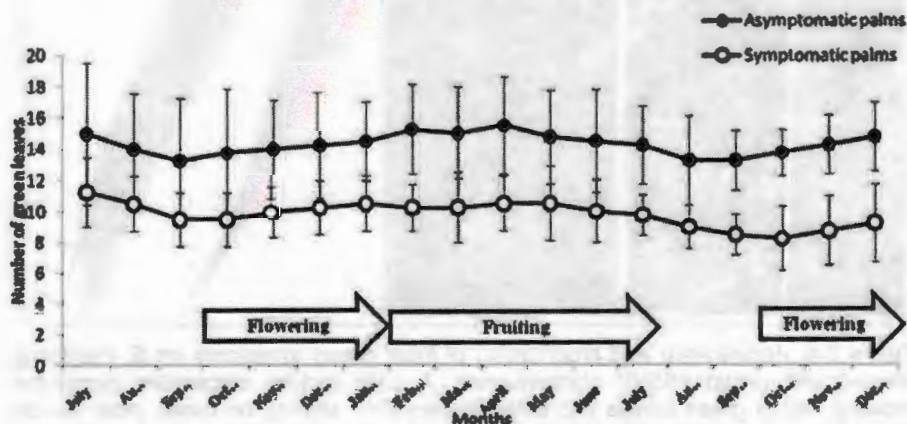


Figure 2.5. Average number of green leaves on phytoplasma infected and uninfected *Sabal mexicana* over an 18 month period. (n=4)

P. sargentii, *T. radiata* or *C. nucifera* co-existing with *S. mexicana* in the Botanical Garden at CICY and at one or more of the other sampling sites showed evidence of pronounced leaf yellowing (Table 2.1). In the case of *P. sargentii* (Fig. 2.4J) symptom development was observed on only one palm and included fruit drop, excessive yellowing of leaves (Fig. 2.4K), necrosis of inflorescence and spathe tissues (Fig. 2.4L) followed by mortality. Presence of a 16SrIV group phytoplasma in this palm was confirmed by nested PCR assay. Of the nine *T. radiata* palms in the Botanical Garden at CICY phytoplasma infections were confirmed in only two symptomatic palms, phytoplasmas were not detected in any of seven symptomless palms. Similarly, of seven *T. radiata* palms with leaf yellowing sampled at Chicxulub, three subsequently tested phytoplasma positive. Among infected palms, mortality of one palm only occurred at each site. Although symptoms observed on three *C. nucifera* palms at Ticul and a single palm located at Chicxulub were typical of those described for LY disease by Zizumbo *et al*, (29) phytoplasmas were detected in only one palm at each location. All four palms sampled at these two locations died during the course of this study.

DISCUSSION

The occurrence of phytoplasmas of the 16SrIV group have been reported in several palm species (19), however in some species such *S. mexicana* and *P. sargentii* infection by these phytoplasmas or any other type have not been reported previously in the scientific literature. The main focus of this study is the case of *S. mexicana* and the phytoplasmas invading it, but other palm species *P. sargentii*, *T. radiata* and *C. nucifera* that were coexisting with *S. mexicana* palms and showed leaf decay syndromes, were also studied with the interest in learning if phytoplasmas were present, and were the same or different strains. Palms studied included asymptomatic individuals because a previous report showed the occurrence of 16SrIV group phytoplasmas in asymptomatic *T. radiata* and *C. readii* palms (20). Here we report for the first time that *S. mexicana* and *P. sargentii* palms affected by leaf decay syndromes, which were associated with 16SrIV group phytoplasmas as evidenced by nested PCR, RFLP assays and nucleotide sequence analysis.

The symptoms observed in *S. mexicana* were similar to those caused by TPD (GenBank accession AF434989) in *Phoenix canariensis*, *P. dactylifera* and *P. sylvestris*, and *Syagrus romanzoffiana* (8, 10). In *C. nucifera* were as those already describe in the literature (29). In the case of *P. sargentii*, symptoms (spotted in only one single palm) and *T. radiata* observed were the typical symptoms of LY disease as those reported for *C. nucifera*. Therefore two patterns of symptoms were observed, one for *S. mexicana*,

and other for *P. sargentii*, *T. radiata* and *C. nucifera*, which seem to be independent of the type of phytoplasma infecting.

The identity of the phytoplasmas isolated from *S. mexicana* was studied. RFLP profiles obtained with restriction enzymes *AluI* and *HinfI* showed that it could be hosting two phytoplasma strains of the 16SrIV group. In one case, profiles were the same observed for these enzymes for LY-Fla phytoplasmas and 16SrIV-A subgroup (7, 20); and in the second case for TPD and CPY phytoplasmas and the 16SrIV-D subgroup (10). The first one was found in only one of the 10 positive *S. mexicana* palms analyzed (GU473589). In the other 9 palms, profiles were of subgroup D and co-existence of both strains was not found in any of the palms analyzed. These identities were supported by analyses of the amplicons obtained by nested PCR by nucleotide-nucleotide BLAST alignments using the NCBI database. However, phylogenetic analysis showed one more strain group for phytoplasmas from a *S. mexicana* palm at CICY (GU473585) and one at Periferico (GU473587), both clustered together in one separate branch, and then probably representing a new 16SrIV subgroup. The results also suggest that there is a more frequent association of subgroup D phytoplasmas than subgroup A phytoplasmas with *S. mexicana* palms, and that the 16SrIV group phytoplasmas can invade young and adult *S. mexicana* palms.

When analysis was carried out of samples from other palm species with leaf decay symptoms that were co-existing with *S. mexicana* palms, 16SrIV group phytoplasmas were also detected in them. In CICY's Botanical Garden we found a *T. radiata* palm with 16SrIV-A phytoplasmas, but also another *T. radiata* palm and a *P. sargentii* palm with 16SrIV-D phytoplasmas as those found in *S. mexicana* palms. Occurrence of 16SrIV-A phytoplasmas in *T. radiata* has already been reported, although in asymptomatic palms (20), but the 16SrIV-D phytoplasmas have not been reported before in this species; neither these phytoplasmas nor any other in *P. sargentii* palms. Therefore, these results show that 16SrIV-D phytoplasmas can be hosted by different palm species in Yucatan State. How extensive this could be in these species studied and if it occurs in other, remains to be determined. Interestingly, a *C. nucifera* palm and a *S. mexicana* palm in Ticul located at about 10 m from each other, were infected by 16SrIV group phytoplasmas but in the first palm it was subgroup A and in the second palm subgroup D, an observation that is consistent with the fact that in Yucatan State *C. nucifera* palms have been associated only with subgroup A phytoplasmas and never with subgroup D phytoplasmas. However, in the case of the Mexican Pacific Coast, *C. nucifera* palms have been associated with subgroup D phytoplasmas (9). Therefore, it will be important to carry out a more extensive survey of phytoplasmas occurring in *C. nucifera* palms in

Yucatan State to determine if subgroup D phytoplasmas can also be found in this species, and if that occurs what could the significance.

Regarding the source of the *S. mexicana* 16SrIV-D phytoplasmas, we may speculate about two possible origins. One could be related to the TPD phytoplasmas found in Texas and Florida (8, 10) since there is a very high homology between *S. mexicana* 16SrIV-D phytoplasmas and TPD phytoplasmas. We can also consider the CPY phytoplasmas isolated from *C. palmata* plants (3), since there is also a very high homology between *S. mexicana* 16SrIV-D phytoplasmas and CPY phytoplasmas. The original CPY phytoplasma outbreak was reported in Calkini, Campeche (3), a location close to Ticul, one of the sites where *S. mexicana* palms were found to be infected by 16SrIV-D phytoplasmas. The last possibility therefore, could be more likely because of the geographic proximity. Also it is important to consider that the development of symptoms in *S. mexicana* infected by 16SrIV-D phytoplasmas is lengthy, and the mortality is low according to casual observations during sampling in different sites, suggesting that the subgroup 16SrIV-D phytoplasma is a native strain rather than an exotic strain.

In the case of the 16SrIV-A phytoplasma found in a single *S. mexicana* palm in Chicxulub, it might have been transmitted from other palm species in this location that were affected by this phytoplasma, such as *T. radiata* and *C. nucifera*. How 16SrIV-A and 16SrIV-D phytoplasmas could be vectored into *S. mexicana* palms was not studied, but *Myndus crudus*, the cixiid vector of LY (12) was found visiting *S. mexicana* palms in all the locations studied, therefore it would be important to consider this insect for future evaluation as vector of the phytoplasma strains found in *S. mexicana* and other palm species reported here. This also might explain the geographic spread of the association of 16SrIV group phytoplasmas with *S. mexicana*. This association was found in CICY's premises in Merida, in Periferico also in Merida about 10 km away, and in Chicxulub and Ticul, located 40 km North and 100 km South from Merida respectively. No further locations were explored but considering what was found, it is reasonable to assume that a wider distribution could be possible, since *S. mexicana* together with *P. sargentii*, *Coccothrinax readii* and *T. radiata* are palm species widely distributed along the coasts of the Yucatan Peninsula (23). Then as previously proposed for *C. readii* and *T. radiata* (20, 21), *S. mexicana* palms might be considered as a potential permanent source of 16SrIV phytoplasmas inoculum, and thus a threat to *C. nucifera* and other palm species in Yucatan State. This is based on the following: (a) *S. mexicana* palms are widely distributed along the Yucatan Peninsula coasts; (b) the 16SrIV-A and 16SrIV-D subgroup phytoplasmas (and probably another one) have been found in *S. mexicana* palms; (c) this association is widely

distributed geographically; and (d) although some palms were positive (18 out of 21 symptomatic) and some died (5), most *S. mexicana* palms in locations were not affected. Also the finding of 16SrIV-D subgroup phytoplasmas in *T. radiata* and *P. sargentii* palms opens the possibility that these palm species could also be sources of inoculum of these phytoplasmas in Yucatan. Therefore, it will be necessary to continue researching these associations of 16SrIV phytoplasmas with *S. mexicana* and the other palm species to fully understand their importance as permanent sources of inoculum of phytoplasmas, and how extensive a threat they might pose to palms of social and economic importance such as *C. nucifera*.

Acknowledgements: The authors thank CONACYT (México, clave 185733) for a scholarship for R. Vázquez Euán and Common Fund for Commodities (Stadhouderskade 1072 AB Amsterdam, FIGOOF/22) for partial support of the research reported here.

REFERENCES

1. Caballero, J., A. Martínez y V. Gama. 2002. El uso y manejo tradicional de la palma de guano en el área maya de Yucatán. *Biodiversitas*. 39: 1-6.
2. Christensen, N., K. Axelsen, M. Nicolaisen and A. Schulz. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci*, 10: 526 – 535.
3. Cordova, I., C. Oropeza, H. Almeyda and N. Harrison. 2000. First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern Mexico. *Plant Dis.*, 84: 807.
4. Deng, S. and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J Microbiol Methods*, 14: 53-61.
5. Doyle, J., and J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15
6. Gundersen, D., I. Lee, S. Rehner, R. Davis and D. Kingsbury. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176: 5244-5254
7. Harrison, N., Cordova I., Richardson P., Dibonito R. 1999. Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: Oropeza C., Verdeil J., Ashburner G., Cardeña R., Santamaría J. (eds). *Current Advances in Coconut Biotechnology*, pp. 183-196. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
8. Harrison, N., E. Helmick and M. Elliott. 2008. Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Ann Appl Biol*, 153: 85-94.

9. Harrison, N., M. Narvaez, H. Almeyda, I. Cordova, M. Carpio and C. Oropeza. 2002. First report of group 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *Plant Pathol*, 51: 808.
10. Harrison, N., M. Womack and M. Carpio. 2002. Detection and Characterization of a Lethal Yellowing (16SrIV) Group Phytoplasma in Canary Island Date Palms affected by Lethal Decline in Texas. *Plant Dis*. 86: 676-681.
11. Hogenhout, S., K. Oshima, E. Ammar, S. Kakizawa, H. Kingdom and S. Namba. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol*. 9: 403-423.
12. Howard, F. 1995. Lethal yellowing vector studies. I. Methods of experimental transmission. Pp 43-57 in *Lethal Yellowing Research and Practical Aspects* (C. Oropeza, Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardefia and J.M. Santamaria, eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
13. IRPCM. 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 54: 1243-1255.
14. Jung, H., T. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, J. Lee, T. Hibi and S. Namba. 2002. 'Candidatus Phytoplasma castaneae', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 52: 1543-1549.
15. Lee, I., D. Gundersen-Rindal and A. Bertaccini. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88: 1359-1366.
16. Lee, I., R. Davis and D. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annu Rev Microbiol*, 54: 221-255.
17. Martinez, R., M. Narvaez, S. Fabre, N. Harrison, C. Oropeza, M. Dollet and E. Hichez. 2008. Coconut lethal yellowing on the Southern Coast of the Dominican Republic is associated with a new 16Sr IV group Phytoplasma. *Plant Pathol*, 57: 366.
18. McCoy, R., A. Caudwell, C. Chang, T. Chen, L. Chiykowski, M. Cousin, J. Dale, G.de Leeuw, D. Golino, K. Hackett, B. Kirkpatrick, R. Petzold, R. Sinha, M. Sugiura, R. Whitcomb, I. Yong, B. Zhu, E. Seemüller. 1989. Plant disease associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb, R. y J. Tully. Eds. *The mycoplasmas*. Academic Press. New York. pp 545- 640.
19. McCoy, R.E., F.W. Howard, M. Tsai, H.M. Donselman, D.L. Thomas, H.G. Basham, R.A. Atilano, F.M. Eskafi, L. Britt and M.E. Collins. 1983. Lethal yellowing of palms. *Univ. Florida Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.*, No 834. pp 100.
20. Narvaez, M., I. Cordova, R. Orellana, N.A. Harrison and C. Oropeza. 2006. First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata*

- and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Plant Pathol*, 55: 292.
21. Nic-Matos, J. 2007. Efecto de la presencia del amarillamiento letal en poblaciones de la palma *Thrinax radiata* en Yucatán. Tesis profesional. Instituto Tecnológico Superior del Estado de Yucatán, 48 p.
 22. Olvera-Fonseca, Silvia. 2004. Evaluation of the bromatological potential of seeds and fruits of *Sabal mexicana* mart. (arecaceae). *Econ Bot*, 58: 536-543.
 23. Quero, H. y S. Flores. 2004. Arecaceae: Taxonomía, Florística y etnobotánica. Fascículo 23 de la colección Etnoflora Yucatanense. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 119 p.
 24. Smart, C., B. Schneider, C. Blomquist, L. Guerra, N. Harrison, U. Ahrens, H. Lorenz, E. Seemüller and C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl Environ Microbiol*, 62: 2988–2993.
 25. Tamura K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24: 1596-1599.
 26. Thompson, J., D. Higgins and T. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680.
 27. Wei, W., R. Davis, I. Lee and Yan Zhao. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 1885-1867.
 28. Weintraub, P. and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91-111.
 29. Zizumbo D, Colunga-GarcíaMarín P, Fernández-Barrera M, Torres-Hernández N and Oropeza C (2009). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Genet Resour Crop Evol*. 156: 23 - 33.

Capítulo 3

Detección de fitoplasmas del grupo 16SrIV en insectos *Myndus crudus*.

3.1. Insectos vectores de fitoplasmas

Los fitoplasmas son parásitos endocelulares que se encuentran en las células del floema, por lo tanto, únicamente aquellos insectos que se alimentan a partir de estas células pueden, potencialmente, adquirir y transmitir a estos patógenos por lo que solo cinco familias de insectos han sido confirmadas como vectores de fitoplasmas: Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae y Derbidae (Weintraub y Beanland, 2006; Firrao *et al.*, 2007).

Algunos fitoplasmas tienen baja especificidad hacia el insecto vector por lo que pueden ser transmitidos por varios insectos, sin embargo, también existen fitoplasmas que son altamente específicos y que solo pueden ser transmitidos por una o unas pocas especies de insectos (Fletcher *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2006). Inicialmente un insecto adquiere los fitoplasmas al alimentarse de una planta hospedante infectada (período de adquisición) y lo transmite a una planta sana (período de inoculación) solo después de completar el periodo de latencia en el insecto (Firrao *et al.*, 2007). Los fitoplasmas se mueven a casi todos los órganos del insecto, desde el intestino que es a donde van a parar después de que el insecto los ha ingerido a partir de las células del floema gracias a su estilete, hasta la hemolinfa y las glándulas salivales, que es donde necesariamente deben colonizar para ser transmitidos a una nueva planta hospedante (Christensen *et al.*, 2005). Los efectos de los fitoplasmas en los insectos son ambiguos, aunque se ha encontrado una disminución en la adecuación en algunos insectos, mientras que en otros la infección por fitoplasmas puede representar una asociación benéfica, mostrando un incremento en su fertilidad y longevidad (Beanland *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005).

3.1.1. *Myndus crudus*

El cúlido *Myndus crudus* Van Duzee es un insecto que se alimenta del follaje de varias especies de palmeras, fue descrito por primera vez en Jamaica en 1907 y su distribución incluye el sur de Florida en Estados Unidos, Cuba, Islas Caimán, Jamaica, Trinidad y en áreas meridionales de América Tropical desde México, América Central hasta la parte norte de América del Sur (Howard *et al.*, 1982; Howard, 2006).

Myndus crudus se considera como el más probable vector del fitoplasma causante del amarillamiento letal según varios estudios que incluyen: a) experimentos de transmisión en jaulas realizados en Florida, E.U.A. (Howard *et al.*, 1982; 1984), b) detección de la presencia de *M. crudus* como la única especie común en sitios donde existían poblaciones de *C. nucifera* infectadas con AL, tanto en Jamaica como en Florida (Howard, 1980a; Howard y McCoy 1980), c) conteo de un mayor número de insectos de esta especie (de hasta 40 veces más alto) en sitios donde existen brotes de AL, comparado con sitios libres de esta enfermedad (Howard, 1980b), d) la consecuente disminución de la incidencia de AL en sitios que son asperjados con insecticidas para controlar las poblaciones de *M. crudus* (Howard y McCoy 1980) y e) la detección por PCR de fitoplasmas del AL en insectos *M. crudus* en Florida (Harrison y Oropeza 1997), aunque existe la probabilidad de que también otras especies de insectos puedan transmitir fitoplasmas del AL, como por ejemplo, especies del género *Cedusa*, en los cuales se ha detectado estos fitoplasmas por PCR (Brown *et al.*, 2006).

Este capítulo presenta el trabajo realizado para detectar la presencia de fitoplasmas del grupo del AL en insectos *M. crudus* de Yucatán, con base en la detección por PCR (amplificación de la región 16S-ADNr del genoma del fitoplasma), RFLPs y análisis filogenéticos, capturados en distintas especies de palmeras diagnosticadas tanto positivas como negativas al AL. En el capítulo anterior se demostró la presencia de al menos dos subgrupos de fitoplasmas presentes en el estado de Yucatán, el subgrupo 16SrIV-A y 16SrIV-D en distintas especies de palmeras. Este capítulo tiene como objetivo establecer si estos mismos subgrupos, también están presentes en insectos *M. crudus*, y por lo tanto ser considerados como los probables vectores de más de una cepa de fitoplasma en distintas especies de palmeras de las que se alimentan.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Captura de insectos

Se colectaron insectos de *M. crudus* adultos en cuatro sitios del estado de Yucatán, donde se ha confirmado la presencia de plantas positivas a AL. Los insectos se capturaron con tubos Falcón de 50 mL cuando estos se encontraban posados en las hojas de las palmeras con síntomas al AL y asintomáticas. Los insectos colectados se conservaron en etanol a 95 % a 4 °C de temperatura para los análisis genéticos posteriores. Un grupo del total de los insectos capturados fueron separados sexualmente en machos y hembras para determinar si existen diferencias en cuanto a la detección de fitoplasmas por sexo.

3.2.2. Extracción de ADN de insectos

El ADN de cada insecto se extrajo utilizando el método de extracción de alta salinidad de Paxton *et al.* (1996) en tubos Eppendorf de 1.5 mL debidamente etiquetados, a los cuales se les adicionó a cada uno 350 μ L de la solución SET buffer, posteriormente se le añadió 15.5 μ L de SDS (deodecil sulfato de sodio) y 6.6 μ L de proteinasa K. Inmediatamente después se agregó un insecto por cada tubo y se maceró con una punta de plástico esterilizada, al finalizar, las muestras fueron incubadas en baño María a 55° C por hora y media. Al terminar la incubación se aplicó a cada muestra 300 μ L de NaCl 6M y se agitó con ayuda de un vortex, inmediatamente se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm.

Durante el tiempo de centrifugación se etiquetaron un número igual de tubos eppendorf de 1.5 mL nuevos con los mismos datos que su correspondiente anterior. A cada de estos se les añadió 150 μ L de 0.01 Tris a pH 8. Cuando finalizó la centrifugación, se tomó de cada muestra centrifugada 550 μ L de sobrenadante, cuidando de no mover los residuos y, se le añadió a su tubo correspondiente. Terminado lo anterior, se les agregó a cada tubo 700 μ L de etanol absoluto y se colocó en refrigeración durante toda la noche o una hora, según se necesite. Finalizando la refrigeración, se centrifugaron las muestras a 10500 rpm durante 15 minutos. Al terminar, se decantó cada muestra cuidando no tirar la pastilla de ADN y se adicionó 1 mL de etanol al 70 % para lavar el ADN y se centrifugó nuevamente con igual número de revoluciones por minuto por 10 minutos. Nuevamente se decantó el alcohol y dejaron secar las muestras por 20 minutos. Al transcurrir este tiempo, se finalizó el procedimiento añadiendo 30 μ L de agua destilada esterilizada y se agitó suavemente para resuspender la pastilla de ADN, almacenándose las muestras a -4 °C para verificar que efectivamente se haya extraído el ADN, se realizó una electroforesis de un gel de calidad de agarosa en el que se colocaron las muestras correspondientes.

3.2.3. Análisis de detección de AL en insectos por PCR

Para realizar el análisis por PCR del ADN extraído de los insectos, primero se diluyó 1:10 con agua deionizada estéril. De esta dilución se utilizó 5 μ L como templado para la mezcla de PCR, junto con 2 μ L de dNTPs (1.25 mM), 5 μ L de buffer de PCR 10x, 5u/ μ L de enzima polimerasa, 2 μ L de cada iniciador (25 ng/ μ L) y aforado con agua ultrapura para alcanzar un volumen final de 25 μ L. La infección por fitoplasmas fue analizada inicialmente con el par de iniciadores P1 y P7 (Deng y Hiruki, 1991, Smart *et al.*, 1996). La amplificación por PCR fue realizada con los siguientes parámetros: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por ocho minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 90 segundos para desnaturalizar el ADN, 55 °C por 55 segundos para el alineamiento y 72 °C para la elongación de ADN. Para finalizar con un paso a 72 °C por 5

minutos para permitir la elongación de aquellos fragmentos que no lo hayan hecho completamente.

Con los productos obtenidos de la amplificación con los iniciadores anteriores, se realizó una dilución 1:20 y se utilizó 5 µL como templado para una mezcla de PCR anidado con las mismas cantidades de reactivos que la anterior reacción de PCR, cuyo volumen final también fue de 25 µL. Los iniciadores específicos del grupo del AL utilizados la cual LY16Sf y LY16Sr (Harrison *et al.*, 2002b) en una reacción de 35 ciclos de una desnaturalización a 94° C, 55 °C para la alineación y 72 °C para la elongación de ADN, cada uno por 40 segundos, con una desnaturalización inicial a 94 °C por dos minutos y una elongación final de 72 °C por 5 minutos. En ambas amplificaciones por PCR se utilizó una enzima polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen).

El DNA amplificado se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV.

3.2.4. Análisis por RFLPs de los segmentos amplificados por PCR anidado

Para los análisis de restricción se utilizaron tres enzimas distintas para cada uno de los insectos que resultaron positivos a AL por la amplificación del segmento 16S ADNr. Las enzimas utilizadas fueron *Hinf* I, *Alu* I y *Hha* I (Invitrogen). La digestión se realizó en viales eppendorf de 200 µL, en los cuales se colocó 1 µL de la enzima, 1 µL del buffer 10X respectivo, ocho µL de agua ultrapura y 5 µL del ADN amplificado por PCR anidado. Al terminar, se mezclaron ligeramente los viales y se incubaron toda la noche a 37 °C a baño maría, dejando que las enzimas digieran las muestras de ADN por al menos 16 horas. Las muestras digeridas fueron visualizadas en geles de acrilamida al 8 % con luz UV y se tomaron registros fotográficos para tener constancia de los resultados obtenidos.

3.2.5. Clonación de los segmentos amplificados, secuenciación y análisis filogenético

Con los productos amplificados por PCR anidado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 %. Las bandas observadas se cortaron y se purificaron utilizando columnas QIAGEN para purificación de ADN a partir de gel de agarosa siguiendo las indicaciones del proveedor. Cada producto purificado fue clonado en el vector pGEM-T Easy de Promega (el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina), utilizando el protocolo establecido por el fabricante. Con estos vectores se transformaron bacterias *E. coli* por choque térmico y estas se cultivaron en cajas Petri con medio LB solido con ampicilina y *X-gal*. Las colonias blancas de *E. coli*, las cuales deberían portar el plásmido con el inserto de interés, se seleccionaron y se sembraron en medio LB liquido con ampicilina y se

dejaron incubar toda la noche a 37 °C. Para purificar los plásmidos de las bacterias se utilizaron columnas QIAGEN siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Para verificar si los plásmidos transformados contenían el inserto deseado, éstos fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* para observar si los plásmidos liberaban el fragmento del tamaño esperado. Los productos de esta digestión enzimática fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y visualizados en un transiluminador de luz UV. Los plásmidos purificados de las clonas positivas fueron enviadas a secuenciar. Las secuencias obtenidas de los fitoplasmas aislados de los insectos fueron comparados nucleótido-nucleótido con el programa BLASTN 2.2.21 (Basic Local Alignment Search Tool) (Zheng *et al.*, 2000) en la base de datos Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para determinar su similitud con las secuencias ortólogas reportadas en dicha base de dato. Para el análisis filogenético, se alinearon las secuencias usando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) de los fitoplasmas aislados de nueve insectos de este estudio, así como otras 40 secuencias de otros fitoplasmas pertenecientes a los principales grupos y *Acholeplasma palmae* como grupo externo (Cuadro 3.1). La construcción del árbol filogenético se realizó usando el método Neighbor-Joining con las secuencias alineadas con el programa de software MEGA 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Accession Number	Species	Accession Number	Species
U00096	<i>Escherichia coli</i>	U00096	<i>Escherichia coli</i>
U00097	<i>Escherichia coli</i>	U00097	<i>Escherichia coli</i>
U00098	<i>Escherichia coli</i>	U00098	<i>Escherichia coli</i>
U00099	<i>Escherichia coli</i>	U00099	<i>Escherichia coli</i>
U01000	<i>Escherichia coli</i>	U01000	<i>Escherichia coli</i>
U01001	<i>Escherichia coli</i>	U01001	<i>Escherichia coli</i>
U01002	<i>Escherichia coli</i>	U01002	<i>Escherichia coli</i>
U01003	<i>Escherichia coli</i>	U01003	<i>Escherichia coli</i>
U01004	<i>Escherichia coli</i>	U01004	<i>Escherichia coli</i>
U01005	<i>Escherichia coli</i>	U01005	<i>Escherichia coli</i>
U01006	<i>Escherichia coli</i>	U01006	<i>Escherichia coli</i>
U01007	<i>Escherichia coli</i>	U01007	<i>Escherichia coli</i>
U01008	<i>Escherichia coli</i>	U01008	<i>Escherichia coli</i>
U01009	<i>Escherichia coli</i>	U01009	<i>Escherichia coli</i>
U01010	<i>Escherichia coli</i>	U01010	<i>Escherichia coli</i>
U01011	<i>Escherichia coli</i>	U01011	<i>Escherichia coli</i>
U01012	<i>Escherichia coli</i>	U01012	<i>Escherichia coli</i>
U01013	<i>Escherichia coli</i>	U01013	<i>Escherichia coli</i>
U01014	<i>Escherichia coli</i>	U01014	<i>Escherichia coli</i>
U01015	<i>Escherichia coli</i>	U01015	<i>Escherichia coli</i>
U01016	<i>Escherichia coli</i>	U01016	<i>Escherichia coli</i>
U01017	<i>Escherichia coli</i>	U01017	<i>Escherichia coli</i>
U01018	<i>Escherichia coli</i>	U01018	<i>Escherichia coli</i>
U01019	<i>Escherichia coli</i>	U01019	<i>Escherichia coli</i>
U01020	<i>Escherichia coli</i>	U01020	<i>Escherichia coli</i>
U01021	<i>Escherichia coli</i>	U01021	<i>Escherichia coli</i>
U01022	<i>Escherichia coli</i>	U01022	<i>Escherichia coli</i>
U01023	<i>Escherichia coli</i>	U01023	<i>Escherichia coli</i>
U01024	<i>Escherichia coli</i>	U01024	<i>Escherichia coli</i>
U01025	<i>Escherichia coli</i>	U01025	<i>Escherichia coli</i>
U01026	<i>Escherichia coli</i>	U01026	<i>Escherichia coli</i>
U01027	<i>Escherichia coli</i>	U01027	<i>Escherichia coli</i>
U01028	<i>Escherichia coli</i>	U01028	<i>Escherichia coli</i>
U01029	<i>Escherichia coli</i>	U01029	<i>Escherichia coli</i>
U01030	<i>Escherichia coli</i>	U01030	<i>Escherichia coli</i>
U01031	<i>Escherichia coli</i>	U01031	<i>Escherichia coli</i>
U01032	<i>Escherichia coli</i>	U01032	<i>Escherichia coli</i>
U01033	<i>Escherichia coli</i>	U01033	<i>Escherichia coli</i>
U01034	<i>Escherichia coli</i>	U01034	<i>Escherichia coli</i>
U01035	<i>Escherichia coli</i>	U01035	<i>Escherichia coli</i>
U01036	<i>Escherichia coli</i>	U01036	<i>Escherichia coli</i>
U01037	<i>Escherichia coli</i>	U01037	<i>Escherichia coli</i>
U01038	<i>Escherichia coli</i>	U01038	<i>Escherichia coli</i>
U01039	<i>Escherichia coli</i>	U01039	<i>Escherichia coli</i>
U01040	<i>Escherichia coli</i>	U01040	<i>Escherichia coli</i>
U01041	<i>Escherichia coli</i>	U01041	<i>Escherichia coli</i>
U01042	<i>Escherichia coli</i>	U01042	<i>Escherichia coli</i>
U01043	<i>Escherichia coli</i>	U01043	<i>Escherichia coli</i>
U01044	<i>Escherichia coli</i>	U01044	<i>Escherichia coli</i>
U01045	<i>Escherichia coli</i>	U01045	<i>Escherichia coli</i>
U01046	<i>Escherichia coli</i>	U01046	<i>Escherichia coli</i>
U01047	<i>Escherichia coli</i>	U01047	<i>Escherichia coli</i>
U01048	<i>Escherichia coli</i>	U01048	<i>Escherichia coli</i>
U01049	<i>Escherichia coli</i>	U01049	<i>Escherichia coli</i>
U01050	<i>Escherichia coli</i>	U01050	<i>Escherichia coli</i>
U01051	<i>Escherichia coli</i>	U01051	<i>Escherichia coli</i>
U01052	<i>Escherichia coli</i>	U01052	<i>Escherichia coli</i>
U01053	<i>Escherichia coli</i>	U01053	<i>Escherichia coli</i>
U01054	<i>Escherichia coli</i>	U01054	<i>Escherichia coli</i>
U01055	<i>Escherichia coli</i>	U01055	<i>Escherichia coli</i>
U01056	<i>Escherichia coli</i>	U01056	<i>Escherichia coli</i>
U01057	<i>Escherichia coli</i>	U01057	<i>Escherichia coli</i>
U01058	<i>Escherichia coli</i>	U01058	<i>Escherichia coli</i>
U01059	<i>Escherichia coli</i>	U01059	<i>Escherichia coli</i>
U01060	<i>Escherichia coli</i>	U01060	<i>Escherichia coli</i>
U01061	<i>Escherichia coli</i>	U01061	<i>Escherichia coli</i>
U01062	<i>Escherichia coli</i>	U01062	<i>Escherichia coli</i>
U01063	<i>Escherichia coli</i>	U01063	<i>Escherichia coli</i>
U01064	<i>Escherichia coli</i>	U01064	<i>Escherichia coli</i>
U01065	<i>Escherichia coli</i>	U01065	<i>Escherichia coli</i>
U01066	<i>Escherichia coli</i>	U01066	<i>Escherichia coli</i>
U01067	<i>Escherichia coli</i>	U01067	<i>Escherichia coli</i>
U01068	<i>Escherichia coli</i>	U01068	<i>Escherichia coli</i>
U01069	<i>Escherichia coli</i>	U01069	<i>Escherichia coli</i>
U01070	<i>Escherichia coli</i>	U01070	<i>Escherichia coli</i>
U01071	<i>Escherichia coli</i>	U01071	<i>Escherichia coli</i>
U01072	<i>Escherichia coli</i>	U01072	<i>Escherichia coli</i>
U01073	<i>Escherichia coli</i>	U01073	<i>Escherichia coli</i>
U01074	<i>Escherichia coli</i>	U01074	<i>Escherichia coli</i>
U01075	<i>Escherichia coli</i>	U01075	<i>Escherichia coli</i>
U01076	<i>Escherichia coli</i>	U01076	<i>Escherichia coli</i>
U01077	<i>Escherichia coli</i>	U01077	<i>Escherichia coli</i>
U01078	<i>Escherichia coli</i>	U01078	<i>Escherichia coli</i>
U01079	<i>Escherichia coli</i>	U01079	<i>Escherichia coli</i>
U01080	<i>Escherichia coli</i>	U01080	<i>Escherichia coli</i>
U01081	<i>Escherichia coli</i>	U01081	<i>Escherichia coli</i>
U01082	<i>Escherichia coli</i>	U01082	<i>Escherichia coli</i>
U01083	<i>Escherichia coli</i>	U01083	<i>Escherichia coli</i>
U01084	<i>Escherichia coli</i>	U01084	<i>Escherichia coli</i>
U01085	<i>Escherichia coli</i>	U01085	<i>Escherichia coli</i>
U01086	<i>Escherichia coli</i>	U01086	<i>Escherichia coli</i>
U01087	<i>Escherichia coli</i>	U01087	<i>Escherichia coli</i>
U01088	<i>Escherichia coli</i>	U01088	<i>Escherichia coli</i>
U01089	<i>Escherichia coli</i>	U01089	<i>Escherichia coli</i>
U01090	<i>Escherichia coli</i>	U01090	<i>Escherichia coli</i>
U01091	<i>Escherichia coli</i>	U01091	<i>Escherichia coli</i>
U01092	<i>Escherichia coli</i>	U01092	<i>Escherichia coli</i>
U01093	<i>Escherichia coli</i>	U01093	<i>Escherichia coli</i>
U01094	<i>Escherichia coli</i>	U01094	<i>Escherichia coli</i>
U01095	<i>Escherichia coli</i>	U01095	<i>Escherichia coli</i>
U01096	<i>Escherichia coli</i>	U01096	<i>Escherichia coli</i>
U01097	<i>Escherichia coli</i>	U01097	<i>Escherichia coli</i>
U01098	<i>Escherichia coli</i>	U01098	<i>Escherichia coli</i>
U01099	<i>Escherichia coli</i>	U01099	<i>Escherichia coli</i>
U01100	<i>Escherichia coli</i>	U01100	<i>Escherichia coli</i>

RESULTADOS

Los resultados de la secuenciación de los plásmidos de las bacterias transformadas se muestran en el Cuadro 3.1. Se observó que los plásmidos transformados contenían el inserto deseado, lo que se confirmó por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y visualizados en un transiluminador de luz UV. Los plásmidos purificados de las clonas positivas fueron enviadas a secuenciar. Las secuencias obtenidas de los fitoplasmas aislados de los insectos fueron comparados nucleótido-nucleótido con el programa BLASTN 2.2.21 (Basic Local Alignment Search Tool) (Zheng *et al.*, 2000) en la base de datos Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para determinar su similitud con las secuencias ortólogas reportadas en dicha base de dato. Para el análisis filogenético, se alinearon las secuencias usando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) de los fitoplasmas aislados de nueve insectos de este estudio, así como otras 40 secuencias de otros fitoplasmas pertenecientes a los principales grupos y *Acholeplasma palmae* como grupo externo (Cuadro 3.1). La construcción del árbol filogenético se realizó usando el método Neighbor-Joining con las secuencias alineadas con el programa de software MEGA 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Cuadro 3.1. Lista de los fitoplasmas y de *Acholeplasma palmae*, de los cuales se utilizó la secuencia del gen 16S ADN para la construcción del árbol filogenético.

Fitoplasma	GenBank No.	Fuente
Coconut lethal decline (CLDO)	DQ321819	Roca, M., Castillo, M. y Harrison.
Acrocomia aculeata decline (CPD)	DQ321818	Roca, M., Castillo, M. y Harrison.
Texas Phoenix decline (TPD)	AF434989	Harrison <i>et al.</i> , 2002a
Carludovica palmata yellows (CPY)	AF237615	Cordova <i>et al.</i> , 2000
Phoenix canariensis-LY (RMCo)	EU241517	Harrison <i>et al.</i> , 2008
Coconut lethal yellowing (LYF-C2)	AF498309	Narvaez <i>et al.</i> , 2005
Phoenix dactylifera decline (BCT-C5)	EU241514	Harrison <i>et al.</i> , 2008
Lethal yellowing Phoenix sylvestris (LYPS)	EU241516	Harrison <i>et al.</i> , 2008
Coconut lethal yellowing (LDT)	X80117	Tymon <i>et al.</i> , 1998
Coconut-LDN Awka wilt disease	Y14175	Tymon <i>et al.</i> , 1998
Coconut-LDG. Cape St. Pauls Wilt disease	Y13912	Tymon <i>et al.</i> , 1998
Ca. Phytoplasma trifolii (CP)	AY390261	Hiruki <i>et al.</i> , 2004
Ca. Phytoplasma fraxini (AshY1)	AF092209	Griffiths <i>et al.</i> , 1999
Ca. Phytoplasma ulmi (EY1)	AF122910	Griffiths <i>et al.</i> , 1999.
Ca. Phytoplasma ziziphi (JWB-Ko)	AY072722	Han,S.
Ca. Phytoplasma pini Pin127S	AJ632155	Schneider <i>et al.</i> , 2005
Ca. Phytoplasma brasiliense (HibWB26)	AF147708	Montano <i>et al.</i> , 2001
Ca. Phytoplasma aurantifolia (WBDL)	U15442	Zreik <i>et al.</i> , 1995
Ca. Phytoplasma cynodontis BGWL-C1	AJ550984	Marcone <i>et al.</i> , 2004
Ca. Phytoplasma oryzae RYD-J	D12581	Jung <i>et al.</i> , 2003
Ca. Phytoplasma phoenicium A4	AF515636	Verdin <i>et al.</i> , 2003
Ca. Phytoplasma castaneae	AB054986	Jung <i>et al.</i> , 2002
Ca. phytoplasma rhamni BAWB	X76431	Seemuller <i>et al.</i> , 1994
Ca. phytoplasma spartii	X92869	Marcone <i>et al.</i> , 1996
Ca. Phytoplasma prunorum ESFY-G1	AJ542544	Seemuller <i>et al.</i> , 2004
Ca. Phytoplasma mali AP15	AJ542541	Seemuller <i>et al.</i> , 2004
Ca. Phytoplasma pyri PD1	AJ542543	Seemuller <i>et al.</i> , 2004

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Captura de insectos y detección de AL por PCR

Se capturó y analizó un total de 1809 insectos durante 2007 y 2008, en diversos sitios del estado de Yucatán, 23 de los cuales resultaron positivos a fitoplasmas relacionados con amarillamiento letal por PCR anidado, es decir el 1.3 % del total. En el jardín botánico del CICY se capturaron un total de 567 insectos, de los cuales siete de ellos resultaron positivos a fitoplasmas, estos representa el 1.2 % del total de insectos de este sitio. En Hunucmá se detectó positivo un solo insecto de los 20 colectados (5 %). En el periférico de Mérida se colectaron 27 insectos pero ninguno de ellos se detectó como positivo a AL. En Chicxulub se analizaron dos grupos, uno de ellos de 59 insectos con un individuo diagnosticado

como positivo (1.7 %) y otro grupo de 1136 insectos de los cuales 14 resultaron positivos a AL (1.2 %). En cuanto a la detección de insectos positivos a AL por sexo, de un total de 184 hembras, dos resultaron positivas (1.1 %), mientras que siete machos dieron positivos a AL de un total de 489 analizados (1.4 %). El número de insectos positivos a AL por sitio, así como el porcentaje que representan los insectos positivos de cada sitio se puede ver en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Número de insectos positivos (+) a AL por PCR anidado y totales capturados en distintos sitios del estado de Yucatán.

Sitio de captura	Insectos + (% insectos + del total por sitio)	Hembras + / Total hembras (% insectos + por sexo)	Machos + / Total machos (% insectos + por sexo)	Insectos Totales (% total de insectos)
Hunucmá	1 (5%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)	20 (1.1%)
Chicxulub	1 (1.7%)	0/16 (0%)	1/43 (2.3%)	59 (3.7%)
Chicxulub	14 (1.2%)	No determinado	No determinado	1136 (62.8%)
Periférico de Mérida	0 (0%)	0/8(0%)	0/19 (0%)	27 (1.5%)
CICY	7 (1.2%)	1/150 (6.7%)	6/417 (1.4%)	567 (31.3%)
Totales	23 (1.3%)	2/184 (1.1%)	7/489 (1.4%)	1809 (100%)

Los 23 insectos positivos a AL por la amplificación por PCR anidado del gen 16S ADNr de los fitoplasmas aislados de ellos mostraron una banda de aproximadamente 1400 pb (ver fig. 3.1).

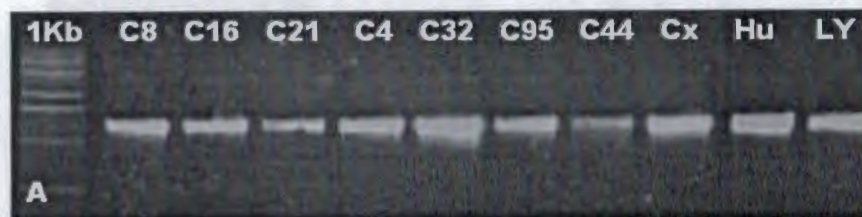


Figura 3.1. Muestras positivas de insectos capturados en distintos puntos del estado de Yucatán, las bandas marcadas con los números C8, C16, C21, C4, C32, C44 y C95 corresponden a insectos capturados en el jardín botánico del CICY, Cx de Chicxulub y Hu de Hunucma. LY muestra positiva de cocotero infectado con fitoplasmas. 1Kb) Marcador molecular

3.3.2. Análisis de RFLPs del gen 16S ADNr amplificado por PCR anidado de fitoplasmas del AL

Los análisis de RFLPs del gen 16S ADNr amplificados por PCR anidado de los 23 insectos dio como resultado dos patrones distintos de hidrólisis con las enzimas *AluI* y *HinfI*, los dos patrones diferentes coincidieron en las mismas muestras analizadas. La enzima *AluI* generó cuatro bandas para la muestra control de fitoplasmas aislados en *C. nucifera*, al igual que para las muestras de insectos CICY 8 (C8) y CICY 21 (C21), Hunucmá (Hu) y todos los insectos procedentes de Chicxulub (Cx). Por su parte, los fitoplasmas aislados de los demás insectos del CICY (C4, C16, C32 y C95) y el control de una muestra de fitoplasmas aislados de *S. mexicana* del CICY, generaron solo tres bandas. Los mismos dos grupos formados por *AluI*, también se formaron con la enzima *HinfI*, mostrando para el primer grupo tres bandas, mientras que para el segundo grupo solo dos bandas. De acuerdo a este resultado, las muestras del primer perfil pertenecen al subgrupo 16SrIV-A, mientras que las muestras del segundo perfil corresponden al subgrupo 16SrIV-D. La enzima *HhaI* generó solo dos bandas de manera uniforme en todos los individuos analizados (Fig. 3.2)

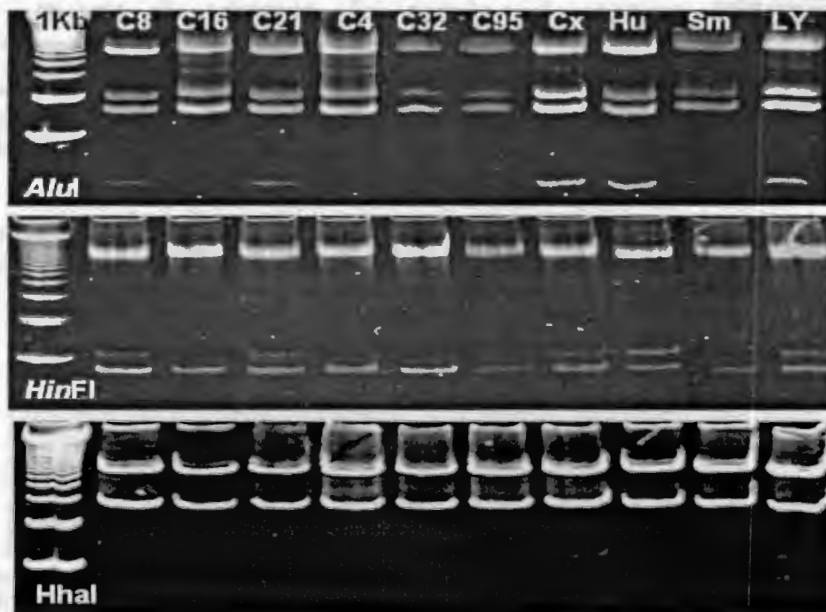
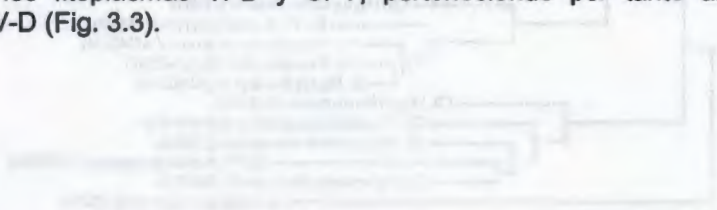


Figura 3.2. Análisis de RFLPs del gen 16S ADNr amplificado por PCR anidado de insectos *M. crudus* de distintos puntos del Estado de Yucatán. Las muestras 8, 16, 21, 4, 32 y 44 corresponden al CICY, en Mérida, Cx a Chicxulub y Hu a Hunucma. LY+ es un control positivo de AL aislado de *C. nucifera*.

3.3.3. Análisis de la secuencia del gen 16s ADNr de fitoplasmas aislados en *M. crudus*.

Se obtuvo la secuencia del gen 16S ADNr de fitoplasmas aislados en 22 de los insectos diagnosticados positivos de los cuales seis correspondieron al CICY, uno a Hunucmá y 15 a Chicxulub puerto. De los seis insectos positivos aislados en el CICY, cuatro de ellos (insectos 4, 16, 32 y 95) dieron como resultado una mayor similitud al alinear sus secuencias en BLAST con fitoplasmas aislados de la palma *Phoenix canariensis* (AF434989) del estado de Texas, E.U.A. (de 98.20 hasta 99.85 %), un fitoplasma perteneciente al subgrupo 16SrIV-D, mientras que las secuencias de los fitoplasmas aislados de insectos de Hunucmá, dos del CICY (8 y 21) y todos los procedentes de Chicxulub tuvieron una similitud mayor con los fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A (de 99.78 hasta 99.92 %), específicamente con el fitoplasma aislado de *C. nucifera* de Florida, E.U.A. (AF498309), el cual es considerada la cepa típica del AL.

El análisis filogenético dio como resultado un árbol en que todas las secuencias obtenidas de este trabajo quedaron dentro del grupo 16SrIV, donde la cepa típica del AL se considera la especie de fitoplasma representante, que a su vez encabeza el subgrupo 16SrIV-A. En el mismo clado quedaron las secuencias de fitoplasmas de los insectos *Myndus crudus* 4, 21T5, 23T5 y 34T5 de Chicxulub, formando una de las principales subclados, mientras que las secuencias de los fitoplasmas de los insectos *M. crudus* 16, 32 y 95 forman otro clado importante en el árbol, junto con las secuencias de los fitoplasmas TPD y CPY, perteneciendo por tanto al subgrupo 16SrIV-D (Fig. 3.3).



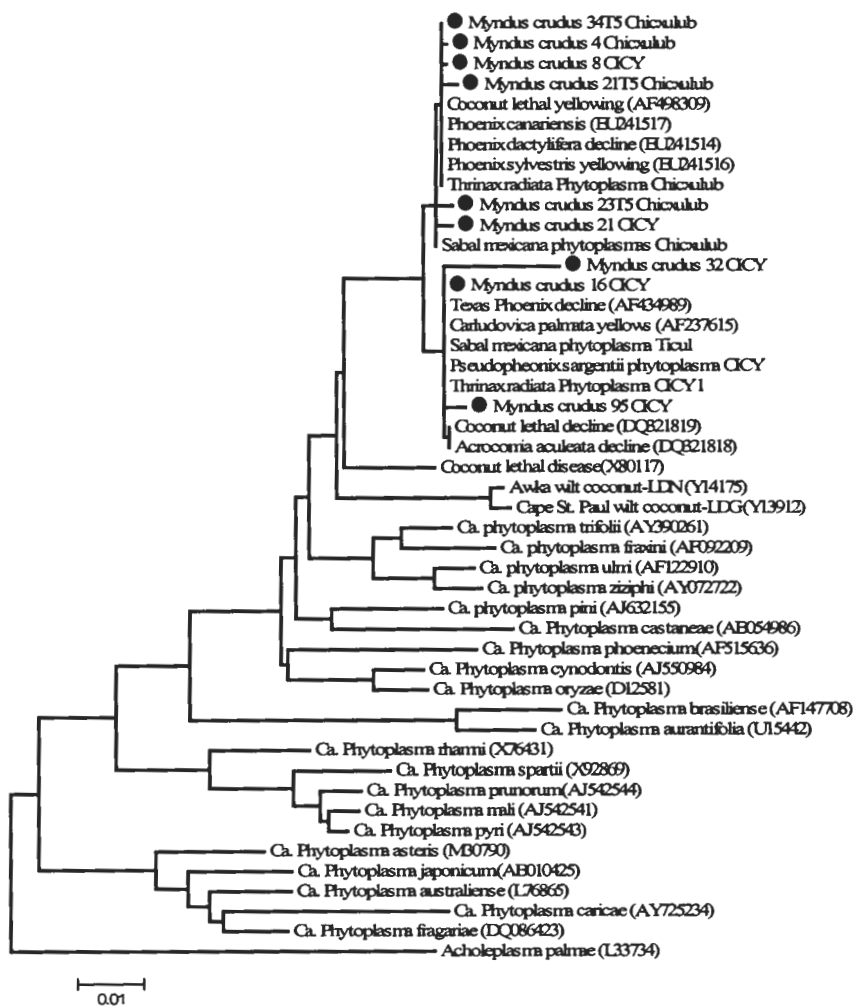


Figura 3.3. Árbol filogenético construido usando el método neighbor-joining con las secuencias del gen 16S ADNr ribosomal de 46 secuencias de fitoplasmas y *Acholeplasma palmae* como grupo externo.

3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Solamente el 1.3 % de los insectos analizados resultó positivo al fitoplasma del AL, sin embargo, este porcentaje es mayor por nueve veces al detectado en vectores de AL en Tanzania, donde solo se encontraron siete individuos positivos de un total de 5000 insectos analizados, representando solo 0.14 % (Mpunami *et al.*, 2000), no obstante, el porcentaje es menor al encontrado en insectos del género *Cedusa*

analizados en Jamaica, en el que se detectaron 13 insectos positivos a AL de un total de 43 analizados, es decir, 30 % (Brown *et al.*, 2006). Una de las razones por lo que es mayor el porcentaje de insectos positivos al fitoplasma en este estudio puede ser debido a que se utilizó la técnica de PCR anidado, la cual es más sensible que la técnica de PCR estándar, que fue la utilizada en Tanzania. No se puede explicar la diferencia de porcentajes del estudio de éste trabajo comparado con el realizado con insectos del género *Cedusa* en Jamaica, ya que en ambos se utilizó la misma técnica. No obstante, durante 2005 y 2006, en un estudio previo de detección de fitoplasmas del AL en insectos capturados en el jardín botánico del CICY, se detectaron 34 positivos de un total de 269 insectos analizados (12.6 %) durante un brote importante de palmas infectadas con fitoplasmas del AL (datos no publicados). El análisis de los insectos en el presente trabajo, se realizó durante los dos años siguientes, cuando la incidencia de palmas infectadas había disminuido. Dado lo anterior, se puede inferir que el porcentaje de insectos positivos detectados depende de la magnitud del número de palmas infectadas en el sitio del cual se realiza la colecta de insectos vectores potenciales.

En el presente estudio se demostró la existencia de dos cepas de fitoplasmas en insectos *M. crudus*, una perteneciente al subgrupo 16SrIV-A y otra al subgrupo 16SrIV-D, mediante el análisis de hidrólisis con enzimas de restricción, lo cual coincide con las mismas cepas de fitoplasmas detectadas en diferentes especies de palmeras en los sitios en que fueron colectados los insectos (ver capítulo anterior), por lo cual, es posible que estos insectos sean los vectores potenciales de dichas cepas de fitoplasmas. Tanto el análisis de alineamientos múltiples BLASTN, como el análisis filogenético concordaron con la identificación y existencia de las dos cepas de fitoplasmas del grupo 16SrIV mencionadas, aunque se pudo observar que el porcentaje de similitud de las secuencias de los fitoplasmas entre los insectos y las secuencias que resultaron como más similares, es menor con respecto al porcentaje de similitud encontrado entre las palmeras analizadas del capítulo dos, es decir, aunque las secuencias de los fitoplasmas obtenidas de los insectos de los dos grupos aquí detectados, alinearon de primero con sus respectivas secuencias de los fitoplasmas considerados típicos de cada grupo, hubo más variabilidad que con los fitoplasmas aislados de las palmeras. El árbol filogenético construido en este estudio es claro al separar las secuencias de los fitoplasmas aislados de los insectos en los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D, igual que con las otras pruebas. La primera cepa de fitoplasma se ha encontrado regularmente en el estado de Yucatán, si embargo, la segunda cepa solo se había detectado en el estado de Campeche en plantas de *Carludovica palmata* (Córdova *et al.*, 2000).

La evidencia de la existencia de dos cepas de fitoplasmas del grupo 16SrIV en Yucatán detectadas en insectos vectores del AL *M. crudus* hace necesario darle un seguimiento a la búsqueda y detección permanente de fitoplasmas en estos insectos en un mayor número de sitios, especialmente en lugares donde hay la presencia de palmeras hospedantes tanto introducidas como nativas, aún cuando no presenten los síntomas característicos del AL y no hayan sido detectadas positivas a fitoplasma por métodos moleculares, ya que la detección oportuna puede permitir realizar las acciones necesarias para controlar la diseminación de la enfermedad entre las distintas poblaciones de palmas.

Excepto en Florida, E.U.A. hasta el momento no existen estudios de transmisión de AL exitosos en otros sitios y los ensayos de transmisión experimental con decenas de miles de insectos en jaulas no permiten afirmar contundentemente que otras especies de insectos cercanos genética o fenotípicamente a *M. crudus* no estuvieran involucrados en la transmisión del AL. En este momento, en el grupo de cocotero de la Unidad de Biotecnología se están realizando ensayos de transmisión de fitoplasmas en *C. nucifera* por insectos *M. crudus*, tanto a nivel de campo en Tabasco, México, como a nivel de laboratorio con plántulas propagadas *in vitro* en el CICY, los resultados preliminares de este último estudio mostraron evidencia de que *M. crudus* puede transmitir fitoplasmas del AL (datos no publicados), lo cual abre las puertas para experimentar con otras especies de palmeras, incluyendo las especies nativas, así como demostrar si estos insectos son capaces de transmitir más de una cepa de fitoplasma.

En este trabajo no se detectaron las dos cepas de fitoplasmas en un mismo individuo, las cepas se aislaron en individuos distintos, por lo que necesario realizar estudios de variabilidad genética en insectos *M. crudus*, como por ejemplo, con genes mitocondriales, como el gen de la citocromo oxidasa (COI), los cuales son utilizados de manera rutinaria para clasificación de insectos, para poder determinar si la variabilidad en los fitoplasmas corresponde con la variabilidad en los insectos y esto genera una transmisión diferenciada de los fitoplasmas a distintos hospedantes o si por el contrario búsquedas más extensas pueden demostrar que un mismo individuo es capaz de portar a más de una cepa de fitoplasma del AL.

3.5. LITERATURA CITADA

- Beanland, L., C. Hoy, S. Miller and L. Nault. (2000). Influence of Aster Yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 271-276.
- Brown, S., B. Been and W. McLaughlin. (2006). Detection and variability of the lethal yellowing group (16Sr IV) phytoplasmas in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Ann Appl Biol.* 149: 53-62
- Christensen, N., K. Axelsen, M. Nicolaisen and A. Schulz. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10: 526 - 535.
- Cordova, I., C. Oropeza, H. Almeyda and N. Harrison. (2000). First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern Mexico. *Plant Disease.* 84: 807.
- Deng, S. and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable y non-culturable mollicutes. *J. Microbiol. Methods.* 14: 53-61.
- Firrao, G., M. Garcia-Chapa and C. Marzachi. (2007). Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host. *Frontiers in Bioscience.* 12: 1353-1375.
- Fletcher, J., A. Wayadande, U. Melcher and F. Ye. (1998). The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology.* 88: 1351 - 1358.
- Griffiths, H., W. Sinclair, C. Smart and R. Davis. (1999). The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: '*Candidatus phytoplasma fraxini*'. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1605-1614.
- Harrison, N. E. Helmick and M. Elliott. (2008). Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Ann. App. Biol.* 153: 85-94.
- Harrison, N. and C. Oropeza. (1997). Recent studies on detection of lethal yellowing disease phytoplasmas in the Americas, in: *Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina, Ghana, November 1995.* S. Eden-Green and F. Ofori (eds). Natural Resources Institute, UK.
- Harrison, N., W. Myrie, P. Jones, M. Carpio, M. Castillo, M. Doyle and C. Oropeza, (2002b). 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of Applied Biology.* 141:183-193.

- Harrison, N., M. Womack and M. Carpio. (2002a). Detection and Characterization of a Lethal Yellowing (16SrIV) Group Phytoplasma in Canary Island Date Palms affected by Lethal Decline in Texas. *Plant Disease*. 86: 676-681.
- Hiruki, C. and K. Wang. (2004). Clover proliferation phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1349-1353.
- Howard, F. (1980a). Attractiveness of date and coconut palms to *Myndus crudus* and other homopterans. *Proc Florida State Hort Soc.* 93:199-201.
- Howard, F. (1980b). Population densities of *Myndus crudus* Van Duzee (Homoptera: Cixiidae) in relation to coconut lethal yellowing distribution in Florida. *Principes*. 24:174-178.
- Howard, F. (2006). American Palm Cixiid, *Myndus crudus* Van Duzee (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha: Fulgoroidea: Cixiidae). University of Florida, IFAS, Florida A. & M. University Cooperative Extension Program, and Boards of County Commissioners Cooperating.
- Howard, F. and R. McCoy. (1980). Reduction in spread in mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm *Veitchia merrillii* by the use of insecticides. *J Econ Entomol.* 73:268-270.
- Howard, F., D. Williams and C. Norris. (1984). Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int J Entomol.* 26:331-338.
- Howard, F., R. Norris and D. Thomas. (1982). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Trop. Agric.* 60: 168 – 171.
- Jung, H., T. Sawayanagi, P. Wongkaew, S. Kakizawa, H. Nishigawa, W. Wei, K. Oshima, S. Miyata, M. Ugaki, T. Hibi, and S. Namba. (2003). 'Candidatus Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1925-1929.
- Jung, H., T. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, J. Lee, T. Hibi and S. Namba. (2002). 'Candidatus Phytoplasma castaneae', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1543-1549.
- Lee, I., D. Gundersen-Rindal and A. Bertaccini. (1998). Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*. 88: 1359 – 1366.

- Marcone, C., A. Ragozzino, B. Schneider, U. Lauer, C. Smart and E. Seemueller. (1996). Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches broom disease. *Plant Disease*. 80: 365-371.
- Marcone, C., B. Schneider and E. Seemuller. (2004). 'Candidatus Phytoplasma cynodontis', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1077-1082.
- Montano, H., E. Davis, E. Dally, S. Hogenhout, P. Pimentel and P. Brioso. (2001). 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1109-1118.
- Mpunami A., A. Tymon, P. Jones and M. Dickinson. (2000). Identification of potential vectors of the coconut lethal disease phytoplasma. *Plant Pathology*. 49, 355-361.
- Narvaez, M., I. Cordova, R. Orellana, N.A. Harrison and C. Oropeza. (2005). First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. *New Disease Reports*. 55: 592.
- Paxton, R., P. Thóren, J. Tengö, A. Estoup and P. Pamilo. (1996). Mating structure and nestmate relatedness in a comunal bee *Andrena jacobi* (Hymenoptera: Andrenidae) using microsátélites. *Molecular Ecology*. 7: 784 - 787.
- Schneider, B., E. Torres, M. Martin, M. Schroder, H. Behnke and E. Seemuller. (2005). 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 303-307.
- Seemuller, E. and B. Schneider. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1217-1226.
- Seemuller, E., B. Schneider, R. Maurer, U. Ahrens, X. Daire, H. Kison, H. Lorenz, G. Firrao, L. Avinent and B. Sears. (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 440-446.
- Smart, C., B. Schneider, C. Blomquist, L. Guerra, N. Harrison, U. Ahrens, H. Lorenz, E. Seemüller and C. Kirkpatrick (1996). Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.

- Suzuki, S., K. Oshima, S. Kakizawa, R. Arashida, H. Jung, Y. Yamaji, H. Nishigawa, M. Ugaki and S. Namba. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *PNAS*. 103: 4252–4257
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson, J., D. Higgins and T. Gibson. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Vol. 22: 4673 – 4680.
- Tymon, A., P. Jones and N. Harrison. (1998). Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Ann. Appl. Biol.* 132, 437-452.
- Verdin, E., P. Salar, J. Danet, E. Choueiri, F. Jreijiri, S. Zammar, B. Gelie, J. Bove and M. Garnier. (2003). 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 833-838.
- Weintraub, P. and L. Beanland. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 91–111.
- Zheng, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences". *J Comput Biol.* 7: 203-14.
- Zreik, L., P. Carle, J. Bove and M. Garnier. (1995). Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, 'Candidatus phytoplasma aurantifolia'. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 449-453.

Capítulo 4

Proteínas membranales en fitoplasmas

4.1 Diversidad y función de proteínas membranales de los fitoplasmas

Los fitoplasmas son organismos que hasta el momento no han podido ser cultivados *in vitro*, debido a ello, su clasificación actual está basada en el gen 16S ADNr y no en sus propiedades fenotípicas (Smart *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2002; IRPCM, 2004; Martini *et al.*, 2007). El uso de este gen ha sido muy útil para clasificar a los fitoplasmas a nivel de género o niveles taxonómicos más elevados, sin embargo, debido a su naturaleza altamente conservada, no es útil para resolver relaciones filogenéticas a nivel de especie y por tanto, fitoplasmas cercanamente relacionados se pueden percibir como idénticos (Fox *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004; Martini *et al.*, 2007), aún cuando éstos no compartan nichos ecológicos, sean transmitidos por diferentes vectores o estén asociados con plantas hospedantes distintas en varias regiones geográficas (Lee *et al.*, 2004).

Para estudios epidemiológicos o con propósito de cuarentena, es necesario tener un sistema de clasificación que permita distinguir fitoplasmas que son ecológicamente distintos, por lo que la identificación de genes nuevos y preferiblemente menos conservados puede revelar una mayor variabilidad (Streten y Gibb, 2003; Hodgetts *et al.*, 2008). En los fitoplasmas ya se han utilizado varios marcadores filogenéticos, tales como las proteínas ribosomales (rp), SecY, SecA, Tuf, 23S ADNr y la región intergénica 16-23S ADNr como herramientas moleculares complementarias, entre éstas, destacan los genes codificantes para las primeras dos proteínas, las cuales aportaron una diferenciación más fina acorde con las delimitaciones marcadas por características biológicas y/o ecológicas en grupos de fitoplasmas difíciles de clasificar por el gen 16S ADNr (Gundersen *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998; 2004; 2006; Martini *et al.*, 2002; Arnaud *et al.*, 2007; Botti y Bertaccini, 2007; Filippin *et al.*, 2007; Hodgetts *et al.*, 2008).

La incapacidad de cultivar a los fitoplasmas también genera que sea escaso el conocimiento acerca de la fisiología, bioquímica, biología molecular e interacción con sus hospedantes, por tal motivo, la genómica comparativa ha significado la única fuente para entender la biología de estas bacterias (García-Chapa *et al.*, 2004). La secuenciación completa del genoma de cuatro fitoplasmas ha permitido conocer algunas características fisiológicas y requerimientos nutrimentales de estos organismos al identificar genes claves que comparten entre ellos y también ha dado a conocer una

gran variabilidad en cuanto a los genes que posee cada uno (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2008)

Son varias las proteínas que están presentes en la membrana de los fitoplasmas y de manera genérica se le designa como inmunodominante a la que se encuentra en mayor cantidad (Berg *et al.*, 1999; Blomquist *et al.*, 2001; Barbara *et al.*, 2002). Todas las proteínas inmunodominantes se han clasificado en tres tipos: i) proteínas de membrana inmunodominantes (Imp), ii) proteína A membranal inmunodominante (IdpA) y iii) proteína antigénica de membrana (Amp). Los tres tipos de proteínas membranales son distintas y no homólogas entre cada uno de los grupos de fitoplasmas (Kakizawa *et al.*, 2006a). *Amp* (antigenic membrane protein) es el gen que codifica para la proteína más abundante que se encuentra expuesta al ambiente extracelular y se ha identificado en varios fitoplasmas (Kakizawa *et al.*, 2006b). Se desconoce la función de esta proteína, pero posiblemente está involucrada en la interacción vector-parásito, brindando la especificidad hacia el insecto (Suzuki *et al.*, 2006; Hoshi *et al.*, 2007).

Los tres componentes de Sec (SecA/Y/E) se han detectado en fitoplasmas, por lo que se sugiere que este sistema de translocación existe y es funcional en ellos, además de que es el mediador de la secreción de *Amp* hacia el periplasma (Oshima *et al.*, 2002; Kakizawa *et al.*, 2001; 2004; Wei *et al.*, 2004).

Los fitoplasmas tienen muy limitado su conjunto de genes, por lo que para su sobrevivencia dependen enormemente a la toma de variadas y numerosas sustancias del citoplasma de la célula hospedante por medio de diferentes sistemas transportadores, los cuales abundan en sus genomas (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2008), incluyendo Art, una familia de transportadores ABC (ATP-Binding cassette) involucrado en la importación de arginina (Higgins, 1995; Higgins y Linton, 2001; Davison y Chen, 2004; Oshima *et al.*, 2004). Los transportadores ABC están fuertemente asociados a los PMUs y posiblemente a ello se debe su gran cantidad y variabilidad en los fitoplasmas (Bai *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo consistió en encontrar y caracterizar en el ADN del fitoplasma del AL distintos genes involucrados en la interacción planta-hospedante-vector, como son *Amp*, *SecY* y *ArtI*, los cuales permitan desarrollar nuevos sistemas de análisis por PCR para caracterizar y clasificar mejor a los fitoplasmas del grupo del AL (16SrIV) detectados en Yucatán, México, aislados de distintas palmas hospedantes.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores a partir de la secuencias de los genes transportadores ABC de arginina *art1* correspondientes a la parte periplásmica o de unión a sustrato del fitoplasma del amarillamiento de la cebolla (onion yellow) depositadas en el GenBank: AP006628 y con éstos obtener las secuencias de los genes correspondientes a fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal. Los iniciadores diseñados se alinearon en el programa de BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) para verificar que la similitud sea únicamente con la secuencia del fitoplasma para la cual se diseñaron u otros fitoplasmas genéticamente cercanos y, descartar su unión con regiones genómicas de organismos distintos, especialmente de plantas monocotiledóneas. En el caso del gen *amp* se utilizaron los iniciadores diseñados por Kakizawa *et al.* (2004) y para las proteínas que conforman el complejo Sec, se utilizaron los iniciadores diseñados y proporcionados por el Dr. Nigel Harrison de la Universidad de Florida, E.U.A. (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Secuencias de los iniciadores de los genes membranales utilizados en el presente trabajo

Gen	Función / proteína	Iniciadores	Fuente
<i>Art1</i> (ABC1)	Importación de aa arginina	GAATATGCCTCCTTTATC TAAGTTCGCCTGTTGTAT	Diseño Propio
<i>Art1</i> (ABC2)	Importación de aa arginina	GAATACGCTCCTTTAGAATGGGT GGTTTCAAAGGTTTTGTGGTTG	Diseño Propio
<i>Art1</i> (ABC 3)	Importación de aa arginina	TTCATAATAATATCCCTCC CTAAAGTAAAAGAAGCAAAC	Diseño Propio
SecA	Proteína membranal	AGCTAGAGAAGCTGC TAA GT CTCCTGCTCCAGAATGTAAT	N. Harrison
SecY	Proteína membranal de translocación	CCTGGTAGTGGTAATGGTAA CAAGTATAACCGCCAAATCCC	N. Harrison
SecY	Proteína membranal de translocación	TCTCGTTCAGGAGGAAATGT CCGCCAAATCCTTTATAACC	N. Harrison
<i>Amp</i>	Proteína de secreción	AAGAATTCATATGCAAAATCAAAAACT CA AAGAGCTCGAGTTTATTGTTTTTTTAA	Kakizawa <i>et al.</i> , 2004

4.2.2. Amplificación por PCR de las proteínas membranales

La amplificación de los genes codificantes para proteínas membranales se realizó a partir del ADN total de las muestras de palmeras que dieron positivas a AL por PCR al gen 16S, también se utilizaron plantas que dieron resultados negativos a AL como control negativo. Las condiciones de amplificación con los iniciadores de los genes del complejo

Sec fueron las recomendadas por el Dr. Harrison, las cuales consisten en un ciclo de desnaturalización a 94° C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 92° C por un minuto, 60° C por dos minutos y 72° C por 3 minutos respectivamente, finalizando con una extensión 94° C por 10 minutos. Para la amplificación del gen de *Amp* se inició con una desnaturalización de 94° C por 10 minutos, 35 ciclos a 72° C por un minuto, 60° C por un minuto y 74° C por 80 segundos y una desnaturalización final a 74° C por 10 minutos. Para amplificar la secuencia del transportador ABC 3, se desnaturalizó a 94° C por 10 minutos, seguida de un minuto a 94° C, 50° C y 72° C por 35 ciclos, finalizando con una extensión a 72° C por 10 minutos. En el caso de los transportadores ABC 1 y 2 la única variación respecto al transportador anterior fue la temperatura de alineamiento a 55° C en lugar de 50° C.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando una enzima polimerasa de alta fidelidad (INVITROGEN) con el fin de disminuir las probabilidades de error en las cadenas obtenidas por el PCR.

4.2.3. Clonación de los segmentos amplificados, secuenciación y análisis de resultados

Los productos amplificados por PCR de las distintas proteínas se purificaron con columnas QIAGEN e insertados en el vector pGen T Easy (Promega) de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* por choque térmico y estas se plaquearon en cajas Petri con medio LB sólido con ampicilina y *X-gal*. Se seleccionaron las colonias blancas, ya que estas deben portar el plásmido con el inserto de interés y se sembraron en medio LB líquido con ampicilina y se dejaron incubar toda la noche a 37° C. Para purificar los plásmidos de las bacterias se utilizaron columnas QIAGEN siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Para comprobar si efectivamente la transformación fue con el inserto deseado, los plásmidos se digirieron con *EcoRI* para observar si los plásmidos liberaban el fragmento del tamaño correspondiente. Los productos de esta digestión enzimática se electroporaron en geles de agarosa al 2% y visualizados en un transiluminador de luz UV. De igual modo, los plásmidos purificados se diluyeron 1/50 y utilizando 2 µL de esta dilución se realizó un PCR con los iniciadores respectivos. Las muestras de las clonas que resultaron positivas se enviaron a secuenciar por triplicado para asegurar que las bases diferentes sean consistentes en al menos dos clonas secuenciadas. Las secuencias se alinearon en las base de datos Genebank con el programa de alineamientos múltiples NCBI BLAST para determinar si las secuencias obtenidas son ortólogas a las proteínas membranales correspondientes.

Las secuencias obtenidas de los fitoplasmas aislados de las distintas palmeras se compararon entre si para ver la similitud entre cada uno de ellos y así mismo comparar la similitud entre ellos con el gen 16S

ADNr. La construcción del árbol filogenético se realizó usando el método Neighbor-Joining con las secuencias alineadas con el programa de software MEGA 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007).

3.2. RESULTADOS

4.3.1. Amplificación por PCR de los genes codificantes de las proteínas transportadoras ABC

Se logró la amplificación con los iniciadores ABC 1, ABC 2 y ABC 3 a partir del ADN de diferentes especies de plantas. Sin embargo, no fueron resultados uniformes, en el caso del iniciador ABC 1 se amplificó más de una banda en algunas muestras y también se observaron bandas en aquellos individuos reportados como no positivos a fitoplasmas del grupo del AL y viceversa, lo que podría indicar una falta de especificidad del par de iniciadores diseñado para la secuencia de ABC correspondiente, posiblemente amplificando partes del genoma de la planta u otros parásitos presentes en la misma. En la Figura 4.1 correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa se pueden observar las bandas amplificadas por PCR de palmeras de *Cocos nucifera*, *Thrinax radiata*, *Pseudopheonix sargentii*, *Sabal mexicana* y *Catharantus roseus*, que van de tamaños de aproximadamente 1500 pb, la cual es la banda más nítida en las muestras que fueron amplificadas, 1000 pb y 400 pb. Las muestras consideradas como positivas en este y los siguientes geles se determinaron por PCR anidado del gen 16S ADNr.



Figura 4.1. Gel de agarosa al 1% con el iniciador ABC 1 de muestras positivas (+) y negativas (-) de distintas plantas. 1- 7) *C. nucifera*, 8 - 10) *T. radiata*, 11 y 12) *P. sargentii*, 13 - 19) *S. mexicana*, 20 y 21) *C. roseus* y 22) H_2O .

Para el iniciador ABC 2 se mostró una mayor especificidad, tanto que solo dos muestras de *C. nucifera* positivas a AL amplificaron una banda de aproximadamente 300 pb, ninguna otra especie de palma positiva o negativa se amplificó banda alguna (Fig 4.2).



Figura 4.2. Gel de agarosa al 1% con el iniciador ABC 2 de muestras positivas (+) y negativas (-) de distintas plantas. 1- 4) *C. nucifera*, 5 y 6) *T. radiata*, 7 y 8) *P. sargentii*, 9 - 12) *S. mexicana* y 13) H_2O .

En el caso del iniciador ABC 3 para el gen *artI* que codifica para un transportador ABC de arginina, al igual que el iniciador ABC 1, presentó una inespecificidad muy alta, con la aparición de bandas de distintos tamaños entre las diferentes muestras, que van desde los aproximadamente 1700 pb hasta los 400 pb. De igual modo, estas bandas se presentaron tanto en plantas positivas como negativas (Fig. 4.3).

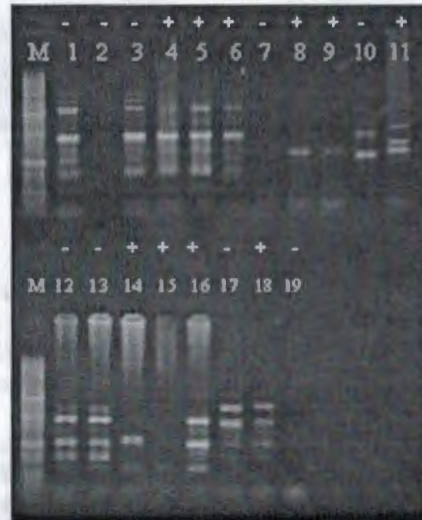


Figura 4.3. Gel de agarosa al 1% con el iniciador ABC 3 de muestras positivas (+) y negativas (-) de distintas plantas. 1- 6) *C. nucifera*, 7 - 9) *T. radiata*, 10 y 11) *P. sargentii*, 12 - 16) *S. mexicana*, 17 y 18) *C. roseus* y 19) H_2O .

4.3.2. Amplificación por PCR de los genes del complejo *Sec* y *amp*

De los tres pares de iniciadores del complejo *Sec*, solo el par *secY-64F/ secY-1985* dieron bandas positivas. Los resultados de la amplificación por este par de iniciadores dio una respuesta consistente en el sentido de que solo amplificaron para individuos reportados como positivos por la amplificación por PCR del gen 16S ADNr, estos fueron en *C. nucifera*, *T. radiata* y *P. sargentii*, más no amplificó ninguna banda en todas las palmeras de *S. mexicana* (Fig. 4.4).

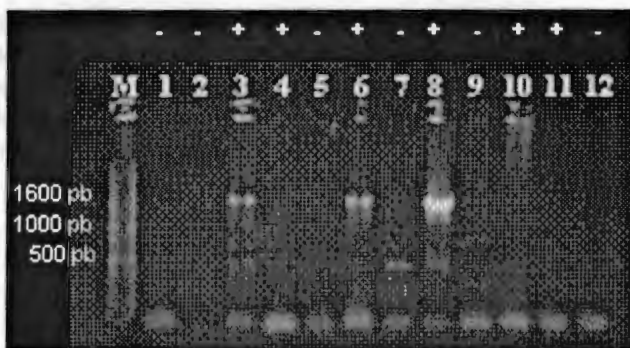


Figura 4.4. Gel de agarosa al 1% con el iniciador *secY-64F/ secY-1985* de muestras positivas (+) y negativas (-) de distintas plantas. 1- 4) *C. nucifera*, 5 y 6) *T. radiata*, 7 y 8) *P. sargentii*, 9 - 11) *S. mexicana* y 12) H_2O .

Dados los resultados en *C. nucifera*, *T. radiata* y *P. sargentii*, se realizó una nueva amplificación del ADN de estas palmeras con los iniciadores *secY-64F/ secY-1985* para este gen utilizando la enzima polimerasa de alta fidelidad, las bandas aparecidas se purificaron y enviaron a secuenciar.

En el caso del iniciador para el gen *Amp*, se obtuvo la amplificación de dos muestras de *C. nucifera* confirmadas como positivas a AL por PCR anidado del gen 16S ADNr, la banda observada fue de aproximadamente 400 pb, ninguna otra palma analizada mostro banda alguna (Fig. 4.5).

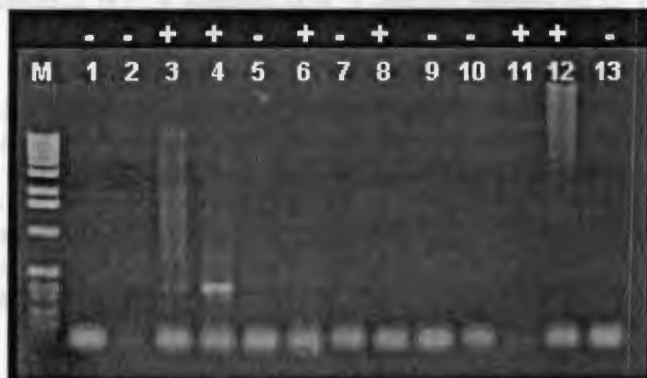


Figura 4.5. Gel de agarosa al 1% con el iniciador para el gen *Amp* de muestras positivas (+) y negativas (-) de: 1- 4) *C. nucifera*, 5 y 6) *T. radiata*, 7 y 8) *P. sargentii*, 9 - 12) *S. mexicana* y 13) H_2O .

Con los resultados de los iniciadores que dieron resultados positivos se realizó un cuadro de ausencias/presencias de bandas obtenidas con cada uno de ellos en cada una de las especies de palmas analizadas

(Cuadro 4.2). La presencia y ausencia de bandas definió al menos tres grupos de fitoplasmas entre todas las especies de palmas analizadas.

Cuadro 4.2. Ausencia (No)/presencia (Si) de bandas amplificadas con los distintos pares de iniciadores. En base a este patrón se puede observar la posible existencia de al menos tres cepas de fitoplasmas (marcadas como A, B o C).

Gen/Especie	<i>C. nucifera</i> (A)	<i>T. radiata</i> (B)	<i>P. sargentii</i> (B)	<i>S. mexicana</i> (C)
Art1(ABC2)	Si	No	No	No
SecY	Si	Si	Si	No
Amp	Si	No	No	No

4.3.3. Clonación y secuenciación.

Las secuencias obtenidas de los productos amplificados con los iniciadores SecY64 /SecY1985 efectivamente correspondieron al gen SecY, al alinearlas en las bases de datos públicas en la red con el programa de cómputo BLASTN. La secuencia de 1830 pb aislada de *C. nucifera* de Yucatán, México, incluye el gen completo de SecY y las secuencias parciales de los genes *rplO* e *infA*, los cuales se encuentran en los extremos del gen SecY. También se obtuvo la secuencia del gen SecY de las palmeras: *T. radiata*, *P. sargentii* y el vector *M. crudus*, la alineación en Blast de la secuencia de SecY del fitoplasmas aislado de *C. nucifera* tuvo una mayor similitud (98.46 %) con la secuencia correspondiente del fitoplasma del AL de *C. nucifera* de Florida (EU589247.1). La segunda mayor similitud la tuvo con los fitoplasmas Flavescence doree phytoplasma (AY197685.1) y Alder yellows phytoplasma (AY197684.1) ambos del grupo 16SrV y con los cuales tuvo una identidad de 69 %.

Las similitudes de las secuencias del gen SecY fueron de 91.83 % a 98.46 %, mientras que las mismas comparaciones de las identidades ente los mismos individuos analizados por el gen 16S fue de un 97.85 % hasta un 100 % (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Comparación de las similitudes de los genes 16S ADNr y SecY entre los fitoplasmas aislados de distintas especies de palmas. Similitud de la secuencia del gen 16S ADNr / Similitud de la secuencia del gen SecY

	<i>C. nucifera</i> Florida 16SrIV-A	<i>C. nucifera</i> Yucatán 16SrIV-A	<i>T. radiata</i> 16SrIV-A	<i>P. sargentii</i> 16SrIV-D
<i>C. nucifera</i> Yucatán 16SrIV-A	100 / 98.46			
<i>T. radiata</i> 16SrIV-A	99.77/ 97.10	99.85/ 98.25		
<i>P. sargentii</i> 16SrIV-D	99.32/ 91.93	99.31/ 91.94	99.08/ 91.83	
<i>M. crudus</i> (insecto) 16SrIV-D	98.20/ 92.92	98.07/ 93.57	97.85/ 93.56	98.43/ 98.69

Las identidades de las secuencias del gen *SecY* aislado de *P. sargentii* y *M. crudus*, los cuales tuvieron fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-D, determinados así por el gen 16S ADNr, fueron menores a 97.5 %, mientras que las secuencias del gen *SecY* de *C. nucifera* de Yucatán, México y Florida, E.U.A. además de *T. radiata* que de acuerdo a gen 16S ADNr tienen fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A, estuvieron por arriba de los 97.5 %.

4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los iniciadores utilizados mostraron diferencias con respecto a la sensibilidad hacia el gen para el cual fueron diseñados y de la especie de palma de la cual fueron aislados los fitoplasmas. Esta diferencia podría estar en función al tipo de fitoplasma que posee cada especie o el título de estos organismos en cada hospedante. Una posible explicación del por qué de la inespecificidad de los iniciadores diseñados para amplificar el gen *Amp*, es que esta proteína y en general, todas las proteínas inmunodominantes de membrana, son altamente variables y no muestran una similitud de aminoácidos entre los distintos grupos de fitoplasmas (Kakizawa *et al.*, 2006a; Galetto *et al.*, 2007). Lo mismo sucede con el gen *artI* que codifica para una proteína tipo transportador ABC (Galetto *et al.*, 2007). Estos tipos de proteínas se encuentran bajo una fuerte presión selectiva que no necesariamente está relacionada con el tiempo evolutivo (Kakizawa *et al.*, 2006a). Los iniciadores utilizados para este trabajo, se basaron en secuencias del fitoplasma Onion Yellow, el cual pertenece al grupo 16SrI. En contraste, los subgrupos definidos por el gen *SecY* siempre son consistentes y acordes con sus nichos ecológicos (Lee *et al.*, 2004).

Aún así, los resultados en su conjunto de las amplificaciones que resultaron positivas y su comparación por presencia y ausencia de bandas amplificadas, sugieren que podrían existir al menos tres tipos de fitoplasmas distintos; uno perteneciente al de *C. nucifera*, otro propio de *T. radiata* y *P. sargentii* y uno más de *S. mexicana*, aunque no existen pruebas moleculares suficientes para afirmar lo anterior.

La comparación de las secuencias del gen *SecY* exhibieron una importante variabilidad entre los fitoplasmas aislados de *C. nucifera* de Yucatán y de Florida, E.U.A. (EU589247.1), *P. sargentii*, *T. radiata* y un insecto *M. crudus*, no obstante, todos los fitoplasmas son pertenecientes al grupo del amarillamiento letal, considerada una sola especie, según la comparación de la identidad entre sí por el gen 16S ADNr, aunque la similitud con fitoplasmas de los otros grupos fue por mucho, más grande.

De acuerdo a las reglas para definir las especies de los fitoplasmas por la IRPCM (Internacional Research Programme for Comparative Mycoplasmaology), hay evidencia para suponer que el fitoplasma del subgrupo 16SrIV-D encontrado en *P. sargentii* y el insecto *M. crudus* analizado por la secuencia del gen *SecY*, corresponde a un nuevo fitoplasma al tener una identidad menor a 97.5 % comparado con los otros fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A. Es posible que este mismo fitoplasma se encuentre en *S. mexicana*, aunque con algunas variaciones debido a la imposibilidad de poder amplificarlos con los mismos iniciadores, aún cuando el gen 16S ADNr los define como una sola especie.

Los resultados de los análisis del gen *SecY* en otras especies de fitoplasmas apoyan la idoneidad de utilizarlo para complementar y definir la separación de cepas de fitoplasmas altamente relacionadas pero que difieren claramente en cuanto a sus características biológicas y ecológicas (Lee *et al.*, 2006). Pese a los resultados obtenidos en este capítulo, es necesario diseñar nuevos iniciadores que permitan obtener la secuencia del gen *SecY* en los fitoplasmas aislados de la palmera *S. mexicana*, de manera que se puedan comparar todas las secuencias obtenidas hasta el momento, que aunque están definidas como dos subgrupos (16SrIV-A y 16SrIV-D) por el gen 16S ADNr, posiblemente exista una mayor cantidad de subgrupos e incluso de especies distintas dentro del mismo grupo.

4.5. LITERATURA CITADA

Altschul, S., T. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. Lipman. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

- Arnaud, G., S. Malembic-Maher, P. Salar, P. Bonnet, M. Maixner, C. Marcone, E. Boudon-Padieu and X. Foissac. (2007). Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Appl. Envir. Microbiol.* 73: 4001-4010.
- Bai, X., J. Zhang, A. Ewing, S. Miller, A. Jancso Radek, D. Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J. Campbell and S. Hogenhout. (2006). Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *J. Bacteriol.* 188: 3682–3696.
- Barbara, D. A. Morton, M. Clark and D. Davies. (2002). Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology.* 148: 157–167
- Berg, M., D. Davies, M. Clark, H. Vetten, G. Maier, C. Marcone and E. Seemuller. (1999). Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology.* 145: 1937 – 1943.
- Blomquist, C., D. Barbara, D. Davies, M. Clark and B. Kirkpatrick. (2001). An immunodominant membrane protein gen from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology.* 147: 571 – 580.
- Botti. S and A. Bertaccini. (2007). Grapevine yellows in Northern Italy: molecular identification of Flavescence dore'e phytoplasma strains and of Bois Noir phytoplasmas. *Journal of Applied Microbiology.* 103: 2325-2330.
- Davidson, A. and J. Chen. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry.* 73: 241 – 268.
- Filippin, L., J. Jovic, V. Forte, T. Cvrkovic, I. Tosevski, M. Borgo and E. Angelini. (2007). Occurrence and diversity of phytoplasmas detected in clematis and their relationships with grapevine “flavescence dorée” phytoplasmas. *Bulletin of Insectology.* 60: 327-328.
- Fox, G., J. Wisotzkey and P. Jurtschuk. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol.* 42:166–170.
- Galetto, L., D. Bosco, J. Fletcher and C. Marzachi. (2007). Production of polyclonal and monoclonal antibodies specific against membrane

- proteins of '*Candidatus Phytoplasma asteris*', chrysanthemum yellows isolate. *Bulletin of Insectology*. 60: 211-212.
- García-Chapa, M., A. Battle, D. Rekab, M. Ruiz-Rosquete and G. Firrao. (2004). PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas. *J. Microbiol. Methods*. 56: 231 – 242.
- Gundersen, D., I. Lee, S. Rehner, R. Davis and D. Kingsbury. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176: 5244-5254.
- Harrison, N., W. Marie, P. Jones, M. Carpio, M. Castillo, M. Doyle and C. Oropeza. (2002). 16rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann. Appl. Biol.* 141: 183 – 193.
- Higgins, C. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell* 82: 693-696.
- Higgins, C. and K. Linton. (2001). The xyz of ABC transporters. *Science*. 293: 1782 – 1784.
- Hodgetts J, N. Boonham, R. Mumford, N. Harrison and M. Dickinson. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Candidatus Phytoplasma*'. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 1826-37
- Hoshi, A., Y. Ishii, S. Kakizawa, K. Oshima and S. Namba. (2007). Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *Bulletin of Insectology*. 60: 105-107.
- IRPCM. (2004). '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1243 – 1255.
- Kakizawa, S., K. Oshima and S. Namba. (2006a) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology*. 14: 254 – 256.
- Kakizawa, S., K. Oshima, H. Jung, S. Suzuki, H. Nishigawa, R. Arashida, S. Miyata, M. Ugaki, H. Kishino and S. Namba. (2006b). Positive selection acting on a surface membrane protein of plant-pathogenic bacteria, phytoplasma. *J. Bacteriol.* 188: 3424-3428.
- Kakizawa, S., K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H. Jung, T. Sawayanagi, T. Tsuchizaki, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba. (2001). Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1043–1050.
- Kakizawa, S.; K. Oshima; H. Nishigawa; H. Jung; W. Wei; M. Tanaka; S. Miyata; M. Ugaki and S. Namba. (2004). Secretion of

immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the *Sec* protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 150: 135-142.

- Kube, M., B. Schneider, H. Kuhl, T. Dandekar, K. Heitmann, A. Migdoll, R. Reinhardt and E. Seemüller. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics*. 9: 306-319.
- Lee, I., E. Dawn, R. Gundersen, R. Davis and I. Bartoszyk. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 48: 1153–1169.
- Lee, I., Y. Zhao and K. Bottner. (2006). *SecY* gene sequences analysis for finer differentiation of diverse strain in the aster yellow phytoplasma group. *Mol Cell Probes*. 20: 87 – 91.
- Lee, I., M. Martini, C. Marcone and S. Zhu. (2004). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 337–347.
- Martini, M., S. Botti, C. Marcone, C. Marzachi, P. Casati, P. Bianco, R. Benedetti and A. Bertaccini. (2002). Genetic variability among *Flavescence dorée* phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Mol Cell Probes*. 16: 197-203.
- Martini, M., M. Lee, K. Bottner, Y. Zhao, S. Botti, A. Bertaccini, N. Harrison, L. Carraro, C. Marcone, A. Khan and R. Osler. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57, 2037–2051
- Oshima, K., H. Miyata, O. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, H. Jung, K. Furuki, M. Yanazaky, S. Suzuki, T. Kuboyama, M. Ugaka and S. Namba. (2002). Minimal Set of Metabolic Pathways Suggested from the Genome of Onion Yellows Phytoplasma. *J. Gen. Plant Pathol*. 68 : 225-236
- Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H. Jung, W. Wei, S. Suziki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature genetics*. 36: 27 – 29.
- Schneider, B., K. Gibb and E. Seemüller. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*. 143: 3381- 3389.

- Smart, C., B. Schneider, C. Blonquist, L. Guerra, N. Harrison, U. Ahrens, K. Lorenz, E. Seemuller and B. Kirkpatrick. (1996). Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl. Envir. Microbiol.* 62: 2988–2993.
- Streten, C. and K. Gibb. (2003). Identification of genes in the tomato big bud phytoplasma and comparison to those in sweet potato little leaf-V4 phytoplasma. *Microbiology.* 149: 1797 – 1805.
- Suzuki, S., K. Oshima, S. Kakizawa, R. Arashida, H. Jung, Y. Yamaji, H. Nishigawa, M. Ugaki and S. Namba. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *PNAs.* 103: 4252–4257
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599.
- Tran-Nguyen, L., M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt and K. Gibb. (2008). Comparative Genome Analysis of "*Candidatus* Phytoplasma australiense" (Subgroup *tuf*- Australia I; *rp-A*) and "*Ca. Phytoplasma asteris*" Strains OY-M and AY-WB. *J. Bacteriol.* 190: 3979–3991.
- Wei W., S. Kakizawa, H. Jung, S. Suzuki, M. Tanaka, H. Nishigawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, T. Hibi, and S. Namba. (2004). An Antibody Against the SecA Membrane Protein of One Phytoplasma Reacts with Those of Phylogenetically Different Phytoplasmas. *Phytopathology.* 94:683-686.

Capítulo 5.

Conclusiones generales

Se detectaron 18 palmas de *Sabal mexicana* positivas a fitoplasmas del grupo 16SrIV en diferentes zonas del estado de Yucatán, lo cual indica que las palmas de esta especie son hospedantes de fitoplasmas del AL y posiblemente constituyen una fuente de inóculo permanente de fitoplasmas ya que el porcentaje de mortalidad de los individuos infectados es bajo.

Los perfiles de los RFLPs obtenidos de la región 16S ADNr amplificada por PCR anidado en 17 palmas de *S. mexicana* mostraron la existencia de una cepa diferente (16SrIV-D) a las detectadas en Yucatán y sólo el fitoplasma aislado de una palma de *Sabal mexicana* mostró un perfil similar a ésta. Los análisis filogenéticos confirmaron la coexistencia de éstas dos cepas en palmas de Yucatán.

Ambas cepas se detectaron en palmas de *Thrinax radiata* y en *Pseudophoenix sargentii* se aisló la cepa 16SrIV-D. Esta misma cepa no fue detectada en *C. nucifera*, lo cual sugiere que existe cierta especificidad de los patógenos hacia las plantas hospedantes.

Los síntomas observados en *S. mexicana* son del tipo de decaimiento, mientras que los registrados en *P. sargentii* son los típicos descritos para el AL en *C. nucifera*.

Se analizaron por PCR anidado a 1809 insectos *Myndus crudus* y 23 de ellos resultaron positivos a fitoplasmas del grupo 16SrIV (subgrupos A y D), aunque es un porcentaje bajo, la captura se realizó en zonas donde la incidencia de la enfermedad es muy baja, lo cual pudo haberse reflejado en el porcentaje de insectos positivos. Este resultado sugiere este insecto es vector potencial de ambas cepas de fitoplasmas.

Se obtuvo la secuencia del gen *SecY* del fitoplasma del AL aislado en *C. nucifera*, *T. radiata*, *P. sargentii* y el insecto vector *M. crudus*, las dos primeras clasificados como pertenecientes al subgrupo 16SrIV-A y las dos últimas al subgrupo 16SrIV-D, la similitud entre los individuos del mismo grupo fue mayor comparado con los individuos del otro grupo, lo cual confirma las diferencias entre las cepas de fitoplasmas aisladas. En *S. mexicana* no se obtuvo la secuencia del gen *SecY* de fitoplasmas aislados de la misma, lo cual sugiere la posibilidad de que sea diferente a los detectados a las otras especies de palmas y el insecto.

PERSPECTIVAS

La existencia de dos cepas de fitoplasmas del grupo 16SrIV en Yucatán detectadas tanto en palmas (*S. mexicana*, *P. sargentii* y *T. radiata*) como en insectos (*M. crudus*) hace necesario darle un seguimiento a la búsqueda y detección permanente de fitoplasmas en estos organismos con el propósito de detectar oportunamente brotes de la enfermedad del AL en palmas del estado de Yucatán e implementar las acciones necesarias para controlar la diseminación de fitoplasmas entre las distintas poblaciones de palmas.

Es importante determinar la variabilidad genética del insecto *M. crudus* y sí, la posible variabilidad, esta relacionado con la portación de una u otra cepa de fitoplasmas del grupo 16SrIV.

Dado que en *S. mexicana* no fue posible obtener la secuencia de *SecY* de fitoplasmas aislados de la misma, se sugiere la posibilidad de que sea diferente a los detectados a las otras especies de palmas y el insecto. Aunque no se puede afirmar hasta que se logre la amplificación y consiguiente secuenciación de este gen en *S. mexicana*, lo cual es necesario para definir si existe una mayor variabilidad de los fitoplasmas del grupo del AL en palmeras infectadas en Yucatán, México.

