



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DE
AMARILLAMIENTO LETAL POR MEDIO DE PCR EN
TIEMPO REAL USANDO UNA SONDA TAQMAN
PARA EL GEN *groEL*.

Tesis que presenta

SANDRA CECILIA KU RODRÍGUEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

Octubre de 2011

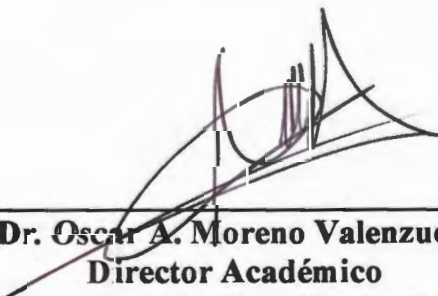




RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal por medio de PCR en tiempo real usando una sonda TaqMan para el gen groEL fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, dentro de la Opción Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:  _____

Nombre: Sandra Cecilia Ku Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Sáenz Carbonell por dirigir este trabajo, así como los valiosos consejos, tiempo y paciencia dedicado para realizar y finalizar este trabajo.

Al maestro Iván Córdova por su apoyo invaluable en la realización de este trabajo, que me dirigió en la parte experimental y teórica, gracias a su experiencia y conocimientos se concluyo con éxito en el tiempo establecido.

A los miembros del comité tutorial Dr. Carlos Oropeza, Dra. Sara Luz Nahuat por su tiempo otorgado; por sus recomendaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Centro de investigación Científica de Yucatán por permitirme realizar mi maestría en sus instalaciones y a los profesores por transmitirme sus conocimientos.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado con la beca de manutención No. 224497;

Al grupo de cocotero por su amabilidad y coordinación en el uso de los equipos.

Un agradecimiento especial para mis hijos Israel y Juan P. Quienes son para mí el mayor tesoro en este mundo

A Juan por su paciencia y valiosa ayuda en la terminación de este trabajo

Agradezco grandemente el apoyo de mi familia, mi madre Leidy Rodríguez, a mi padre Francisco Ku y mis hermanos quienes siempre han estado a mi lado en todo momento, gracias Sari por el cuidado amoroso hacia mis hijos.

INDICE	i
LISTADO DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE CUADROS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
 CAPITULO I: ANTECEDENTES	 9
El Cocotero	9
1.1.1 Descripción taxonómica	9
1.1.2 Cultivo	10
1.1.3 Usos e importancia económica	11
1.2 El amarillamiento letal	13
1.2.1 Distribución del AL	13
1.2.2 Sintomatología de AL en cocotero	14
1.3 Fitoplasmas	15
1.3.1 Características generales	15
1.3.2 Formas de detección de fitoplasmas	17
1.4 Reacción en cadena de la polimerasa	18
1.4.1 Fundamento teórico de la PCR	18
1.4.2 Fundamento teórico de la PCR anidada	20
1.4.3 Fundamento teórico de la PCR en tiempo real	22
1.4.4 Detección de fitoplasma usando la técnica de PCR en tiempo real	25
1.5 El gen <i>groEL</i>	26
1.5.1 Detección del fitoplasma del AL mediante el gen <i>groEL</i>	26
1.6 Justificación	27
1.7 Hipótesis	28
1.8 Objetivos	28
1.8.1 Objetivo general	28
1.8.2 Objetivos específicos	28
1.9 Referencias Bibliográficas	29
 CAPITULO II: DISEÑO DE CEBADORES Y DE LA SONDA TaqMan	 33
2.1 Introducción	33
2.2 Materiales y métodos	34
2.3 Resultados	36
2.4 Discusión	38
2.5 Referencias Bibliográficas	40
 CAPITULO III: OPTIMIZACIÓN DE PARAMETRO DE LA PCR EN TIEMPO REAL	 43
3.1 Introducción	43
3.2 Materiales y métodos	44
3.2.1 Determinación de la temperatura de alineación	44
3.2.3 Determinación de la correlación lineal y sensibilidad	44
3.2.4 Determinación de especificidad	45

3.3 Resultados	46
3.3.1 Determinación de la temperatura de hibridación	46
3.3.2 Correlación lineal	47
3.3.3 Sensibilidad del sistema	47
3.3.4 Especificidad de la sonda TaqMan LYgroEL	47
3.4 Discusión	50
3.5 Referencias Bibliográficas	52
 CAPITULO IV: COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD POR PCR-ANIDADO Y PCR-TIEMPO REAL	 53
4.1 Introducción	54
4.2 Materiales y métodos	54
4.2.1 Extracción de ADN	54
4.2.2 Serie de diluciones de ADN	54
4.2.3 PCR anidado convencional	54
4.2.4 PCR en tiempo real	55
4.3 Resultados	56
4.4 Discusión	58
4.5 Referencias Bibliográficas	61
 CAPITULO V: DETECCIÓN DE FITOPLASMAS DE AL EN EMBRIONES E INSECTOS	 63
5.1 Introducción	63
5.2 Materiales y métodos	65
5.2.1 Material biológico	65
5.2.1.1 Embriones de <i>C. nucifera</i>	65
5.2.1.2 Insectos <i>Myndus crudus</i>	65
5.2.2 Extracción de ADN	66
5.2.3 PCR anidado convencional	66
5.2.4 PCR en tiempo real	67
5.3 Resultados	67
5.3.1 Detección de AL en embriones	67
5.3.2 Detección de AL en muestras de insectos	69
5.4 Discusión	71
5.5 Referencias Bibliográficas	74
 CAPITULO VI: DISCUSIÓN GENERAL	 77
6.1 Conclusiones generales	80
6.2 Referencias Bibliográficas	81

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ADN:** Acido desoxirribonucleico.
- AL:** Amarillamiento Letal.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ASHY:** Amarillamiento del fresno o Ash Yellows,
- AY:** Aster yellows.
- BGWL:** Hoja blanca de pasto Bermuda o Bermuda grass white leaf,.
- BLTVA:** Virescencia transmitida por insectos o Beet leafhopper-transmitted virescence agent
- BN:** bosque negro o *bois noir*.
- C:** centígrados.
- Ca.:** *Candidatus*.
- Ct:** Ciclo umbral o threshold cycle
- CTAB:** Bromuro de cetil-trimetil-amonio.
- dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato.
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.
- EY:** Elm Yellow fitoplasma del Amarillamiento del olmo
- FAM:** 6-carboxyfluoresceína.
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación o Food and agriculture Organization of the United Nations.
- FD:** flavescencia dorada.
- FRET:** Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o fluorescence resonance energy transfer.
- HCl:** acido clorhídrico.
- JMB.** jajubi escoba de bruja o Jujube witches's broom.
- MGB:** minor groove binder
- min:** minutos.
- MPV:** Viriscencia mexicana de la vicaria o Mexican Periwinkle virescence
- NaCl:** cloruro de sodio
- NaClO:** hipoclorito de sodio
- NCBI:** National Center Biotechnology Information.
- NFQ:** non-fluorescent *quencher*.
- nM:** nanomolar
- nm:** nanomoles
- pb:** pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa o Polymerase Chain Reaction.

PPWB: Escoba de bruja del gandul o Pigeon pea witches's broom,

PWX: Durazno del oeste X o Peach western X

rRNA: Ácido Ribonucleico ribosómico o Ribosomal ribonucleic acid

s: segundos

SGP: Petalo-verde de la fresa o Strawberry green-petal

Taq: *Thermus aquaticus*.

TE: amortiguador Tris y EDTA.

TLD: Declinamiento letal de Tanzania o Tanzania lethal decline coconut.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

UV: Luz ultravioleta

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la PCR.....	20
Figura 2. Representación esquemática de la PCR-anidada en la detección de fitoplasmas <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> causante del amarillamiento letal en cocotero.....	22
Figura 3. Representación esquemática de una PCR en tiempo real con una sonda TaqMan.....	24
Figura 4. Secuencias que presentan homología al gen LY groEL comparadas en el Genebank.....	36
Figura 5. Secuencias homólogas al fragmento del gen LY groEL; la flecha indica la sección en donde fue diseñada la sonda TaqMan; las bases del gen LY groEL difieren en esta sección con respecto a las de otras secuencias.....	37
Figura 6. Representación gráfica de la región que amplifica la sonda TaqMan LYgroEL y cebadores.....	38
Figura 7. Curvas de Ct que presenta la PCR-tiempo real con temperaturas 58, 61 y 64 para seleccionar la temperatura óptima de alineamiento con la sonda TaqMan LYgroEL.....	46
Figura 8. Grafica de la correlación lineal obtenida con el Ct contra el logaritmo de la cantidad de ADN.....	47
Figura 9. Ensayo de especificidad de la sonda TaqMan LYgroEL con los diversos fitoplasmas.....	48

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cocotero.....	9
Cuadro 2. Palmas susceptibles al fitoplasma <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> causante del amarillamiento letal.....	13
Cuadro 3. Escala de severidad de ataque del AL en cocotero (Mc Coy et al, 1973).....	15
Cuadro 4. Técnicas más utilizadas en la detección de fitoplasmas.....	18
Cuadro 5. Literatura que describe el uso de la técnica de la PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas.....	25
Cuadro 6. Secuencia de un fragmento de 1,629 pb del gen <i>groEL</i> del fitoplasma que produce el amarillamiento letal. La secuencia fue proporcionada por el Dr. N. Harrison de la universidad de Florida.....	35
Cuadro 7. Detección de diferentes aislados de fitoplasmas y los resultados de detección por PCR anidado y PCR en Tiempo Real utilizando la sonda y los oligonucleótidos diseñados en el presente estudio.....	49
Cuadro 8. Comparación de la sensibilidad entre las técnicas de PCR-tiempo real y la PCR-anidada en cinco muestras de palmas con sus respectivas serie de diluciones, M son los marcadores de tamaño moleculares y E la eficiencia del sistema TaqMan.....	57
Cuadro 9. Embriones de palmas enfermas de amarillamiento letal analizadas por medio de PCR-tiempo real utilizando la sonda LYgroEL.....	68
Cuadro 10. Detección de AL en embriones de cocotero por medio de PCR-anidado que amplifica sobre el gen <i>groEL</i> y el gen <i>16S</i> y PCR-tiempo real sobre el gen <i>groEL</i>	69

Cuadro 11. Detección de AL en embriones de cocotero sanos con técnicas de PCR-anidado que amplifica sobre el gen <i>groEL</i> y el gen 16S y PCR-tiempo real sobre el gen <i>groEL</i>	69
Cuadro 12. Detección del fitoplasma causante de AL en insectos <i>Myndus Crudus</i> con técnicas de PCR-anidado que amplifica sobre el gen 16S y PCR-tiempo real sobre el gen <i>groEL</i>	70
Cuadro 13. Comparación entre el costo y tiempo del proceso de una muestra por PCR-tiempo real y PCR-anidado.....	71

RESUMEN

El Amarillamiento Letal (AL) es una enfermedad del cocotero y de otras palmas, causado por un patógeno conocido como fitoplasma *Candidatus Phytoplasma palmae*. El insecto vector es un fitófago conocido popularmente como "Chicharrita" (*Myndus crudus*); hasta la fecha no existe un control efectivo del AL, además de que los fitoplasmas no han podido ser cultivados *in vitro* lo que dificulta su estudio. La detección se realiza de manera indirecta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su modalidad de anidado que es una técnica sensible pero presenta inconvenientes como el tiempo requerido para realizarla debido a las dos rondas de amplificación, aunado a la posibilidad de obtener falsos positivos. En la actualidad se han desarrollado nuevas metodologías para detectar fitoplasmas entre ellas destaca el uso del PCR en tiempo real combinado con el uso de sondas TaqMan, que permite una detección rápida y sensible de patógenos de plantas. En el presente trabajo se diseñó una sonda TaqMan específica para el gen *groEL* del fitoplasma del amarillamiento letal.

Se realizó el diseño *in silico* de la sonda, de tal manera que se amplificó de manera específica al gen *groEL*; después de obtener el diseño de la sonda (LYgroEL) se implementaron los parámetros para llevar a cabo en forma optima la PCR-tiempo real, la temperatura de alineación que se determinó fue de 61°C y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.988. La sonda fue específica para la detección del fitoplasma de AL ya que no amplificó diferentes cepas de fitoplasmas. Se comparó su sensibilidad con el PCR anidado y los datos mostraron que la PCR en tiempo real con la sonda TaqMan fue más sensible. Se probó el uso de la sonda con 128 extractos de ADN de embriones provenientes de palmas infectadas y se obtuvo un 88% de positivos en comparación con el 8% cuando se utilizó PCR anidada para el gen *groEL* y no se obtuvieron positivos por medio de PCR anidada en el gen *16S*. El ensayo con PCR en tiempo real no amplificó en el ADN de embriones sanos. La detección del fitoplasma del AL en 137 extractos de ADN de insectos *Myndus crudus* por PCR-tiempo real fue de un 4% en comparación con el 1.5 % de la PCR-anidada. Los resultados indican que la sonda es específica para la detección del fitoplasma de AL y más sensible que la PCR anidado.



ABSTRACT

Lethal yellowing (LY) is a disease of coconut and other palms caused by a pathogen known as phytoplasma, the vector is a sucking insect known as " planthoppers " (*Myndus crudus*). To date there is no effective control to LY. Furthermore, phytoplasmas have not yet been cultivated *in vitro* making it difficult to study. Therefore its detection is carry out by indirect approach using the polymerase chain reaction (nested-PCR). This is a sensitive technique it but present disadvantages as the long time it takes to perform it because two steps of amplification, also the possibility of false positives. Currently it has been developed new methods to detect phytoplasmas as the use of combined real-time PCR with TaqMan probes that allows a rapid and sensitive detection of plant pathogens. In this work was designed a TaqMan probe specific for the gene *groEL* of the lethal yellowing phytoplasma.

The probe was designed *in silico* so that the gene *groEL* was amplified in a specific manner. Once obtained the probe (LYgroEL) some parameters were implemented to perform real-time PCR, the temperature of alignment was determined to be 61°C and a correlation coefficient of 0.988 was obtained. The probe proved to be specific for the detection of phytoplasmas LY. Consequently it did not amplify other phytoplasma strains. Its sensitivity was compared with nested-PCR and the data showed that real-time PCR with TaqMan probe was more sensitive. The use of the probe was tested with 128 DNA extracts from embryos of infected palms and we obtained 88% positive amplification compared to 8% with *groEL* nested-PCR. Positives were not obtained using nested PCR on the 16S gene. The real-time PCR assay did not amplify the DNA of healthy embryos.

The detection of the phytoplasma of the LY in 137 extracts of DNA of the *Myndus crudus* insect by real time PCR was 4% as compared to 1.5% using nested PCR. The results indicate that the probe is specific for the detection of the phytoplasma of the LY and that it is more sensitive than the nested.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial una de las especies de plantas más representativas de las zonas costeras tropicales es el cocotero (*Cocos nucifera* L.). En América Latina y el Caribe la producción de coco contribuye con cerca del 10 % de la producción mundial, siendo México y Brasil los países productores más destacados (FAO, 2009). En México, la mayor superficie cultivada con cocotero se encuentra en áreas marginadas de los suelos costeros, no obstante se le considera como un cultivo de importancia económica y principalmente social, la mayor superficie cultivada se encuentra en las costas del Pacífico representando el 80 % del total de la superficie cultivada (Domínguez, 1999). Los principales productos son la nuez fresca y la copra para la obtención de aceite, sin embargo, existe una gran variedad de usos adicionales a partir de cada uno de los componentes de la planta (Mepba y Achinewhu, 2003; Oropeza, 2001).

México es el séptimo país productor de cocotero en el mundo (CONACOCO, 2010). En los últimos años la producción del cultivo del cocotero en nuestro país se ha visto disminuida, esto se debe principalmente a una baja productividad así como a una disminución en la superficie de cultivo. Los factores que han influido en la baja productividad son principalmente el aumento en la incidencia de plagas y enfermedades, pobre rendimiento de las plantaciones y el uso extensivo de plantas no seleccionadas de baja productividad, entre otros limitantes (CONACOCO, 2010; Harrison *et al.*, 1999; Seemuller *et al.*, 1998).

Entre las enfermedades que afectan al cocotero y a otras palmas destaca el Amarillamiento Letal (AL) que es causado por un patógeno conocido como fitoplasma que aniquila las plantaciones. Las palmas infectadas mueren entre 3 y 6 meses después de la aparición de los primeros síntomas visuales (Harrison *et al.*, 1999). La epidemia del AL está presente en las costas del Golfo y del Caribe de México, así como en Belice, Guatemala y Honduras (Doyle, 2001). Hasta la fecha no existe un control efectivo y el insecto transmisor es un chupador conocido popularmente como "Chicharrita o Salta Hojas"; cuyo nombre científico es *Myndus crudus*, que se puede reconocer por su color amarillo verdoso y por sus alas transparentes en forma de techo (Howard, 1983) el cual es un insecto que está ampliamente distribuido en todo el territorio nacional.

Los fitoplasmas son organismos autoreplicativos carentes de pared celular, están rodeados únicamente por una membrana plasmática (Razin, 1978), estos habitan en las células del floema y hasta el momento no se han podido cultivar *in vitro* por lo que su caracterización es insuficiente; pese a que los fitoplasmas poseen un genoma extremadamente pequeño, es muy poco lo que se conoce al respecto (Lee *et al.*, 2000).

En un principio para comprobar que una palma estaba infectada con fitoplasmas era necesario hacer análisis de microscopía electrónica, técnica compleja y cara. Por lo que se diseñaron otros métodos para su estudio como serología, sondas para hibridación de ADN y la reacción en cadena de polimerasa PCR (Harrison, 1992; Deng y Hiruki, 1991). Más recientemente se describió un método más sensible utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en una modalidad denominado anidado, esta última es muy sensible y específica, sin embargo es muy laboriosa ya que involucra dos pasos de amplificación, y la detección en geles del producto amplificado lo que la hace tardada, además hay la posibilidad de falsos positivos. Por ello es necesario desarrollar técnicas más confiables y específicas que permiten en forma simple, sensitiva y confiable la detección del patógeno del AL (Seemuller *et al.*, 1998; Doi *et al.*, 1967).

La más reciente innovación en detección de patógenos es la metodología de PCR en tiempo real, que permite entre otras cosas cuantificar al microorganismo; Esta técnica en conjunto con el uso de sondas TaqMan ha proporcionado herramientas para la detección y cuantificación de fitoplasmas, aún en bajas concentraciones, mejorando la seguridad en el diagnóstico (Higuchi *et al.*, 1993). El gen *groEL* que tiene homología con una clase de chaperoninas de bacterias, se ha aislado del fitoplasma causante del AL y podría ser un buen candidato para aplicar esta técnica.

Por lo tanto en el presente trabajo se implemento una metodología de PCR tiempo real diseñando un sistema TaqMan y cebadores para detectar al fitoplasma causante del amarillamiento letal utilizado al gen *groEL* como blanco.

Referencias bibliográficas

- Deng S., y Hiruki C. (1991). Amplification 16s rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14:53-61
- Doi Y., Teranaka M., Yora K. y Asuyama H (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* , 33:259-266.
- Domínguez, C. E., López J. I., Castillo R. y Ruiz P. (1999) El cocotero (*Cocos nucifera* L.) Manual para la producción en México. ANIFAP-CIARGC-CEHUI. Tabasco, México. 133 p.
- Doyle. M. (2001). Crisis research: managing lethal yellowing disease. *Biotechnology and Development Monitor* No. 45, 45 p.
- Food and Agriculture Organization, 2009. Dirección estadística http://www.fao.org/index_ES.htm FAOSTAT | © FAO. (Acceso 20 de junio 2009).
- Harrison, N., I. Cordova, P. Richardson y R. DiBonito (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. Pag. 183-196, In: *Current Advances in Coconut Biotechnology*. C. Oropeza, J.L., Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardena and J.M. Santamaria, (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Harrison NA., CN. Bourne, RL. Cox, JH. Tsai, y PA. Richardson (1992). DNA probes for detection of mycoplasma like-organism associates with lethal yellowing disease of palms in Florida. *Phytopathology*, 82:216-224.
- Higuchi R., C. Fokler, G. Dollinger y R. Watson (1993). Kinetic PCR analysis: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11:1026-1030.
- Howard, F.W. (1983) World distribution and possible geographic origin of lethal yellowing and its vectors. *FAO Plant Protection Bulletin*, 341: 109-113.
- Lee I.M., R.E. Davis y Gundersen-Rindal D.E. (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221-255.
- Mepba, S: C. y Achinewhu H. D (2003) Effects of processing on protein nutritive quality of coconut *Cocos nucifera* products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 15-25.
- Oropeza, C. (2001). Importancia y usos del cocotero. In informe sobre curso teórico practico ALC. Ed. García A. y Sabio C s.n.t.
- Razin, S., (1978). The mycoplasma. *Microbiologica, Reviews*, 42, 414-470.
-

Seemuller E.C., Marcone U., Lauer A., Ragozzino A. y Goschl M (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasma. Journal Plant Pathology, 80:3-26.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1.1 El cocotero

El centro de origen del coco se extiende del Sudoeste de Asia a Melanesia. Se ha comprobado su existencia en las costas del pacífico de América antes de la época precolombina (Baudouin y Lebrun, 2009). Se sabe que a las costas de México se introdujo de las islas de cabo verde de África occidental (Zizumbo, 1996), en la actualidad se encuentra distribuido en toda la zona tropical del mundo (Domínguez *et al.*, 1999).

1.1.1 Descripción taxonómica

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una monocotiledónea que pertenece a la familia Arecaceae, subfamilia Arecoideae; esta es una especie diploide con 32 cromosomas; es un genero monotipico, se describe su clasificación taxonómica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cocotero.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Arecales
Familia	Arecaceae
Subfamilia	Arecoideae
Tribu	Cocoeae
Subtribu	Butiinae
Genero	<i>Cocos</i>
Especie	<i>C. nucifera</i>

EL cocotero presenta un único tallo de hasta 20 metros de alto con un cilindro central con una corteza de aproximadamente de 1 centímetro de grosor, la yema terminal es llamada cogollo. Las hojas son pinnadas de 4 a 6 metros de largo. La inflorescencia es interfoliar, de ramificación simple con una bráctea pedúncular semi-leñosa; las flores son unisexuales, agrupadas en tríadas en la base de las ramas floríferas, con una flor pistilada central y dos estaminadas laterales, tienen pétalos lanceolados, 6

estambres y un ovario formado por 3 carpelos fusionados. La polinización suele ser cruzada, de tipo anemófila o entomófila.

El fruto tiene una masa de ~1-2 kg, es una drupa con epicarpo delgado, liso y de color marrón grisáceo, mesocarpo fibroso, de unos 4-8 cm y endocarpo leñoso, en el interior contiene una única semilla rica en sustancias de reserva localizadas en el endospermo, que es en parte líquido (leche de coco) y en parte sólido (pulpa). (Teulat *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 1999, Henderson *et al.*, 1995).

1.1.2 Cultivo

El cocotero o palma de coco se distribuye ampliamente en las zonas costeras y en el interior de casi todos los países tropicales ubicados entre el Trópico de Cáncer y Trópico de Capricornio principalmente en las costas continentales y las islas ubicadas entre los 20° de latitud norte y sur del ecuador (Harries, 2000). Su distribución es debida a su amplia adaptabilidad a diversos ambientes tropicales, se adapta a condiciones de los suelos arenosos y con alta salinidad de regiones costeras en cuanto al pH soporta rangos de 5.5 a 7.5; las condiciones para que se desarrolle adecuadamente son: abundante luminosidad no menor de 6 horas diarias; temperaturas entre 30.1 y 23.5 °C; la precipitación debe ser suficiente y constante de forma tal que no sea menor a los 100 milímetros de precipitación pluvial en un mes y la humedad no debe ser menor del 60 por ciento mensual (Robert y Zizumbo, 1990).

Los vientos suaves o moderados favorecen el cultivo, sin embargo, los vientos fuertes en períodos de sequía aumentan las condiciones de sequedad del suelo y la transpiración de la planta, generando un déficit hídrico perjudicial para la planta. Las condiciones de vientos huracanados son limitantes, principalmente para los cocoteros del tipo enano, pues poseen menor resistencia en su tronco y raíces, aunque se adaptan fácilmente a suelos salinos pobres (Robert y Zizumbo, 1990).

En México el cocotero se localiza en dos grandes regiones: La del Golfo-Caribe, en las costas de Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. La del Pacífico; en las costas de Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Jalisco y Chiapas (SAGARPA, 2010; Domínguez *et al.*, 1999).

1.1.3 Usos e importancia económica

El cocotero *Cocos nucifera* L., es un cultivo representativo de las zonas costeras tropicales, ya que desde hace miles de años el hombre ha vivido con esta palma, aprovechando la madera para sus casas, como combustible, la pulpa de la nuez de coco como alimento y ha utilizado el agua del fruto como bebida fresca (FAO, 2010; Domínguez *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista agrícola, el cocotero representa una alternativa productiva para las áreas costeras tropicales por su capacidad de desarrollo en los suelos arenosos pobres en nutrimentos y materia orgánica, donde ningún otro cultivo puede prosperar en forma económicamente redituable (FAO, 2010; Domínguez *et al.*, 1999).

Los cocos representan una de las principales fuentes de ingreso en los países productores porque de ellos se obtienen gran cantidad de productos los cuales son utilizados, en la Industria, se usa como materia para la extracción de aceite (la copra de buena calidad contiene entre un 60 y un 65% de aceite) el aceite se utiliza en la elaboración de cosméticos, velas, glicerina, caucho sintético y plastificante (sustancias que se añaden a colas, epóxidos, lacas y otros materiales para darles flexibilidad (Harrie, 1995; Urbina, 1997).

Actualmente el aceite de coco también se emplea para la producción de biodiesel debido a la cantidad y calidad de aceite que se extrae del fruto hace que este pueda ser fácilmente utilizado en motores diesel. El cocotero es una planta con una vida útil larga y con técnicas fáciles de cultivo lo cual abarata los costos en la producción, además el uso de biodiesel de origen vegetal disminuye la cantidad de emisiones de CO₂ en el ambiente además de ser un recurso renovable (Lao, 2008).

Para el consumo humano la copra se utiliza en la confección de dulces. En la Ganadería, la harina de coco es un subproducto de la extracción de aceite y se usa como alimento para el ganado. Los productos residuales procedentes de la extracción del aceite se mezclan con otros ingredientes para preparar abonos orgánicos (Oropeza, 2001).

La fibra de coco como subproducto industrial tiene una gran potencialidad como sustrato hortícola alternativo en el cultivo sin suelo. También otras partes de la planta son utilizadas normalmente, como las hojas, con las que se realizan cestos, sombreros, etc. (Oropeza 2001).

En la actualidad el cocotero es la palma de mayor importancia en los trópicos húmedos, cubriendo más de 12 millones de hectáreas en 90 países, de cuyo cultivo dependen más de 80 millones de personas, en su gran mayoría pequeños productores y sus familias. En México, de la producción de copra dependen alrededor de 70 mil familias (Avelaño *et al.*, 1999).

La industria del coco en México tiene un fuerte impacto en el empleo y la economía regional en los estados de Guerrero, Colima, Tabasco y Oaxaca, principalmente; México contribuye con aproximadamente el 7% de la producción mundial de copra, los derivados del coco tienen una demanda creciente en los mercados internacionales (Domínguez *et al.*, 1999). En México hay 30 mil agro-productores, de los cuales 85 por ciento son ejidales y 15 por ciento son pequeños propietarios, distribuidos en 11 estados de la República.

Guerrero es el principal productor con 50 por ciento de la superficie nacional, el resto se divide entre los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Yucatán y Quintana Roo; la suma da como resultado 80 mil hectáreas (SAGARPA, 2010). En México, la mayor superficie cultivada con cocotero se encuentra en áreas marginales de los suelos costeros, no obstante, es uno de los cultivos tropicales de importancia económica; además es fuente de ingreso para trabajadores que viven de las labores del proceso de producción del cultivo y de las actividades en la industria de la transformación. El cocotero se ha considerado un cultivo rustico que requiere poco cuidado; esto lo ha marginado a las áreas costeras ocasionando que la producción promedio de copra no sobrepase los 800 kilogramos por hectárea por año, cantidad muy por abajo del verdadero potencial del cultivo, ya que en condiciones de suelos areno-limosos, areno-arcillosos y utilizando cultivares mejorados con un programa de fertilización, control de maleza y cosecha; a nivel experimental se han obtenido rendimientos de 6 toneladas de copra por hectárea al año (Domínguez *et al.*, 1999).

1.2 El amarillamiento letal

EL amarillamiento letal es una enfermedad devastadora capaz de afectar a por lo menos 30 especies dentro de la familia Palmae (Howard y McCoy, 1980; Howard *et al.*, 1981; Tsai y Mead, 1982) además del cocotero (cuadro 2).

Cuadro 2. Palmas susceptibles al fitoplasma *Ca. Phytoplasma palmae* causante del amarillamiento letal.

Nombre común	Nombre científico
Palma de la costa	<i>Allagoptera arenaria</i> <i>Arenga englerii</i>
Palma arikuri	<i>Arikyroba schizophilla</i>
Palma palmira	<i>Borassus flabellifer</i>
Palma cabada	<i>Choysolidocarpus cabadae</i>
Palma cola de pescado	<i>Caryota mitis</i>
Palma de coco	<i>Cocos nucifera</i>
Palma gebang	<i>Corypha elata</i>
Palma gaussia de Puerto Rico	<i>Gaussia attenuata</i>
Palma pacífica	
Palma abanico de Fiji	<i>Pritchardia pacifica</i> <i>Pritchardia remota</i>
Palma Thurstom	<i>Pritchardia thurstonii</i> <i>Pritchardia spp</i> <i>Ravenea hildebrandtii</i>
Palma molino de viento	<i>Trachycarpus fortunei</i>
Palma manila	<i>Veitchia merrillii</i>
Otras especies	<i>Veitchia spp</i>
Palma centinela	<i>Howea belmoreana</i>
Palma caracol	<i>Hyophorbe verschaffeltii</i>
Palma latania	<i>Latania spp</i>
Palma abanico	<i>Livistona chinensis</i>
Palma mazar	<i>Nannorrhops ritchiana</i> <i>Neodypsis decaryi</i>
Palma canaria	<i>Phoenix canariensis</i>
Palma datilera	<i>Phoenix dactylifera</i>
Palma datilera del Senegal	<i>Phoenix reclinata</i>
Palma datilera silvestre	<i>Phoenix silvestris</i>
Palma Kona	<i>Pritchardia affinis</i>

1.2.1 Distribución de AL

Los primeros registros de la enfermedad del amarillamiento letal provienen de las islas Caimán, en el Caribe a finales del siglo pasado. Un primer brote devastador de esta enfermedad se registró en la isla de Jamaica (Martyn y Midcap, 1975; Parthasarathy, 1974), después se extendió por Cuba, las Bahamas Haití, República Dominicana y

Florida y posteriormente de la región de Miami en 1971. En 1982 se confirmó la existencia en Cancún e isla Mujeres (Oropeza y Zizumbo, 1997). Después se dispersó por el sur hacia las costas del Caribe mexicano y hacia el oeste entrando a Yucatán, esta enfermedad ha tenido un impacto desastroso sobre la industria del cocotero (McCoy, 1980; Borja, 1983).

1.2.2 Sintomatología del AL en cocotero

Los síntomas que presenta el cocotero enfermo de AL es la caída prematura de las nueces en diferentes estados de desarrollo. Un elemento claro de diagnóstico del AL es la deformación y ennegrecimiento de las inflorescencias al emerger de las espatas. Inicialmente, la necrosis en la inflorescencia puede ser parcial, pero con el paso del tiempo toda la inflorescencia emergida puede aparecer necrosada. Posteriormente, las hojas toman una coloración amarillenta empezando por las más viejas y progresando hacia las más jóvenes. Eventualmente las hojas afectadas se secan y toman una coloración café claro y permanecen colgando del tronco por algún tiempo. La fase final en la secuencia de síntomas de la enfermedad ocurre cuando la región cercana al meristemo en el cogollo muere y se pudre, lo que ocasiona que la corona de hojas caiga, quedando únicamente el tronco en pie (McCoy *et al.*, 1976) Toda la secuencia de síntomas visibles hasta la muerte de la palma comprende entre tres y seis meses después de la aparición del primer síntoma (Howard, 1980).

Se ha reportado que el agente causal de la enfermedad del amarillamiento letal es un fitoplasma que es transmitido por un insecto vector chupador *Myndus crudus* Van Duzee, el cual adquiere al fitoplasma durante su alimentación en palmas infectadas (Mc Coy *et al.*, 1973).

Se ha desarrollado una clasificación de síntomas (cuadro 3) que se utiliza como base para la aparición de los síntomas del amarillamiento letal en el cocotero (Doi *et al.*, 1967, Mc Coy *et al.*, 1973).

Cuadro 3. Escala de severidad de ataque del AL en cocotero (Mc Coy *et al.*, 1973).

categoría	Rango numérico	síntomas
Primaria	0	Palmas sanas o incubando la enfermedad.
	1	Caída de frutos.
	2	Una inflorescencia necrótica.
	3	Dos o más inflorescencias necróticas.
Amarillamiento	4	Amarillamiento en hojas inferiores solamente.
	5	Amarillamiento en hojas inferiores y medias.
	6	Todas las hojas amarillas, hoja guía sana.
Etapa final	7	Hoja guía muerta, algunas hojas verdes.
	8	Hoja guía muerta, algunas hojas amarillas.
	9	Palma muerta (poste telefónico).

1.3 Fitoplasmas

Las enfermedades por fitoplasmas, se creía que eran causadas por virus debido a que atravesaban los filtros utilizados para bacterias además de que no podían ser cultivados artificialmente fue hasta 1967 cuando Doi *et al.*, demostraron la presencia de organismos tipo micoplasmas en el floema de plantas infectadas ahora denominados fitoplasmas (Doi *et al.*, 1967, Weisburg *et al.*, 1989).

1.3.1 Características generales

Los fitoplasmas carecen de una verdadera pared celular rígida, sus células son pleomorfas son más o menos esféricas, rodeado por una sola unidad de membrana, estos organismos tienen un diámetro promedio de 200 a 800 nanómetros (Lee y Davis 1992) y son sensibles a los antibióticos de tetraciclina (Weisburg *et al.*, 1989, Lee y Davis 1992), son bacterias Gram-positivas y están actualmente clasificados en la clase *Mollicutes* (Weisburg *et al.*, 1989).

Debido a que los fitoplasmas no pueden ser aislados y cultivados *in vitro*, su identificación y descripción a partir de los caracteres fenotípicos es imposible de llevar a cabo, por lo que su caracterización se ha limitado principalmente a nivel de la biología molecular, la cual ha permitido construir una clasificación de estos organismos. Son varios los fitoplasmas a los cuales se les ha registrado y descrito como candidatos a especie, por lo que antes del nombre común, se les ha añadido la palabra *Candidatus*, la cual se ha quedado como género del taxón que agrupa a todos los fitoplasmas. Los *Candidatus* fitoplasma tienen una secuencia única del gen 16S

RNA ribosomal (CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT) que los distingue claramente como un grupo monofilético dentro de la Clase mollicuta (IRPCM, 2004). En el caso del fitoplasma causante del amarillamiento letal se le ha denominado '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma palmae*'

Los fitoplasmas necesitan de vectores insectos para poder dispersarse en las plantas, estos insectos se alimentan del floema de plantas enfermas y al alimentarse de una planta sana transmiten el fitoplasma. En insectos los fitoplasmas invaden las agallas y las glándulas salivales y muchos otros tejidos, donde se acumulan en grandes cantidades dentro y fuera de sus células (Hogenhout *et al.*, 2008). Se han encontrado fitoplasmas en las paredes de los tubos cribosos del floema de las plantas enfermas, estos microorganismos se pueden acumular en densidades relativamente más altas en brotes jóvenes y puntas de raíces (Howard *et al.*, 1983).

Plantas infectadas con fitoplasmas presentan una serie de síntomas que sugieren profundos disturbios en el balance normal de las hormonas vegetales, cierre de estomas. Los síntomas que se presentan en plantas incluyen virescencia (el desarrollo de flores verdes y la pérdida de los pigmentos normales de flores), filodia (transformación de órganos florales en hojas), la esterilidad de las flores, la proliferación axilar de brotes que dan lugar a una apariencia de escoba (escoba de bruja), elongación anormal de entrenudos con brotes delgados, el retraso en el crecimiento generalizado (pequeñas flores y hojas), decoloración de las hojas o tallos, caída de hojas y muerte de hojas. Los síntomas inducidos varían en las plantas enfermas con el fitoplasma y con la etapa de la infección (Hogenhout *et al.*, 2008; Chang, 1998; Chang y Lee, 1995; McCoy *et al.*, 1989).

1.3.2 Formas de detección de fitoplasmas

Hasta ahora no se ha logrado el aislamiento y cultivo *in vitro* de fitoplasmas, de igual manera no ha sido posible transmitirlos artificialmente, esto ha creado dificultades para su estudio y por consiguiente para el control de la enfermedad que transmiten. En algunos casos para la detección de fitoplasmas se aplica a la planta enferma un tratamiento con antibiótico (tetraciclina), la disminución de los síntomas después del tratamiento proporciona pruebas para apoyar el diagnóstico de daño causado por fitoplasmas (Lee y Davis, 1992; Weisburg *et al.*, 1989; Doi *et al.*, 1967).

Los fitoplasmas también han sido diferenciados e identificados por sus propiedades, tales como la similitud y la diferencia en los síntomas que inducen en las plantas infectadas, las plantas huéspedes, y los insectos vectores. La determinación de estas propiedades es laboriosa con tiempos prolongados y en varias ocasiones con resultados inconsistentes (Chiykowski, 1991; Chiykowski y Sinha 1989; Shiomi y Sugiura 1984).

Hasta muy recientemente la presencia de síntomas en plantas enfermas posterior a la observación en microscopia, fueron los principales criterios utilizados para diagnosticar enfermedades ocasionadas por fitoplasmas (Errampalli *et al.*, 1991; Haggis y Sinha, 1978).

El diagnóstico de una enfermedad basado en los síntomas o por microscopía en circunstancias no adecuadas puede llevar a un diagnóstico erróneo y, por consiguiente, a un mal manejo de la enfermedad. Debido a esto se han ido desarrollando técnicas más confiables para la detección de fitoplasmas.

La necesidad de un diagnóstico preciso, que incluya la identificación del patógeno es primordial para un control en la dispersión de la enfermedad (Davis y Sinclair, 1988) por tal motivo se han evaluado diferentes técnicas en la detección de fitoplasmas (cuadro 4). Para tal propósito se implementó el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una técnica molecular útil para identificar la presencia del patógeno en la planta. Para aumentar especificidad y sensibilidad se realizó una variante la PCR denominada anidada, en la que la amplificación de PCR es seguido una por segunda amplificación (Chen *et al.*, 1992).

Una variante de reciente desarrollo es la técnica denominada PCR en tiempo real, la cual consiste en la detección de productos de amplificación en tiempo real al incluir en la mezcla de reacción sondas marcadas con un fluoróforo. Esta técnica es utilizada actualmente para detectar y cuantificar patógenos en diferentes especies, así como fitoplasmas (Christensen *et al.*, 2004).

Cuadro 4. Técnicas más utilizadas en la detección de fitoplasmas.

Técnica	Ventajas	Desventajas
Sintomatología	Muy sencilla	Poco específica.
Microscopía electrónica	Muy confiable	Laboriosa, no específica al grupo de fitoplasmas.
PCR-anidado	Específica y sensible	Laboriosa.
PCR tiempo real SYBR Green	Sensible	Posible unión inespecífica a la doble cadena de ADN.
PCR tiempo real sondas TaqMan	Específica, sensible, rápida	Se requiere de la secuencia para el diseño de la sonda y cebadores.

1.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Un gran hallazgo a mediados de los 80's del siglo pasado fue la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis *et al.* Esta es una técnica que ha revolucionado la aplicación de la genética molecular, además de que ha sido primordial en la detección de fitoplasmas (Mullis y Faloona, 1987).

1.4.1 Fundamento teórico de la PCR

El fundamento teórico de esta técnica es la amplificación exponencial de un segmento de ADN definido, mediante el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos) o cebadores (primers) que se hibridan de forma específica con cada una de las dos hebras complementarias de ADN (Poitras y Houde, 2002).

La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en la desnaturalización del DNA molde o templado, la hibridación de los cebadores con el

templado y la síntesis del ADN complementario mediante la acción de la enzima denominada polimerasa del ADN. Si se realizan 20-30 ciclos del proceso de PCR se pueden obtener varios millones de copias de la secuencia de ADN de interés. Actualmente la enzima universalmente más empleada es la ADN polimerasa del microorganismo *Thermus Aquaticus* (DNA polimerasa Taq), que permite la síntesis de ADN a temperaturas por encima de los 70°C y resiste perfectamente los 94-95°C necesarios para separar las dos hebras de ADN (Dorak, 2009), estas reacciones se repiten cíclicamente (figura 1).

La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como desnaturalización. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el apareamiento de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina cebadores debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde.

En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los cebadores en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cual trabaja la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos en cadena da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los cebadores.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

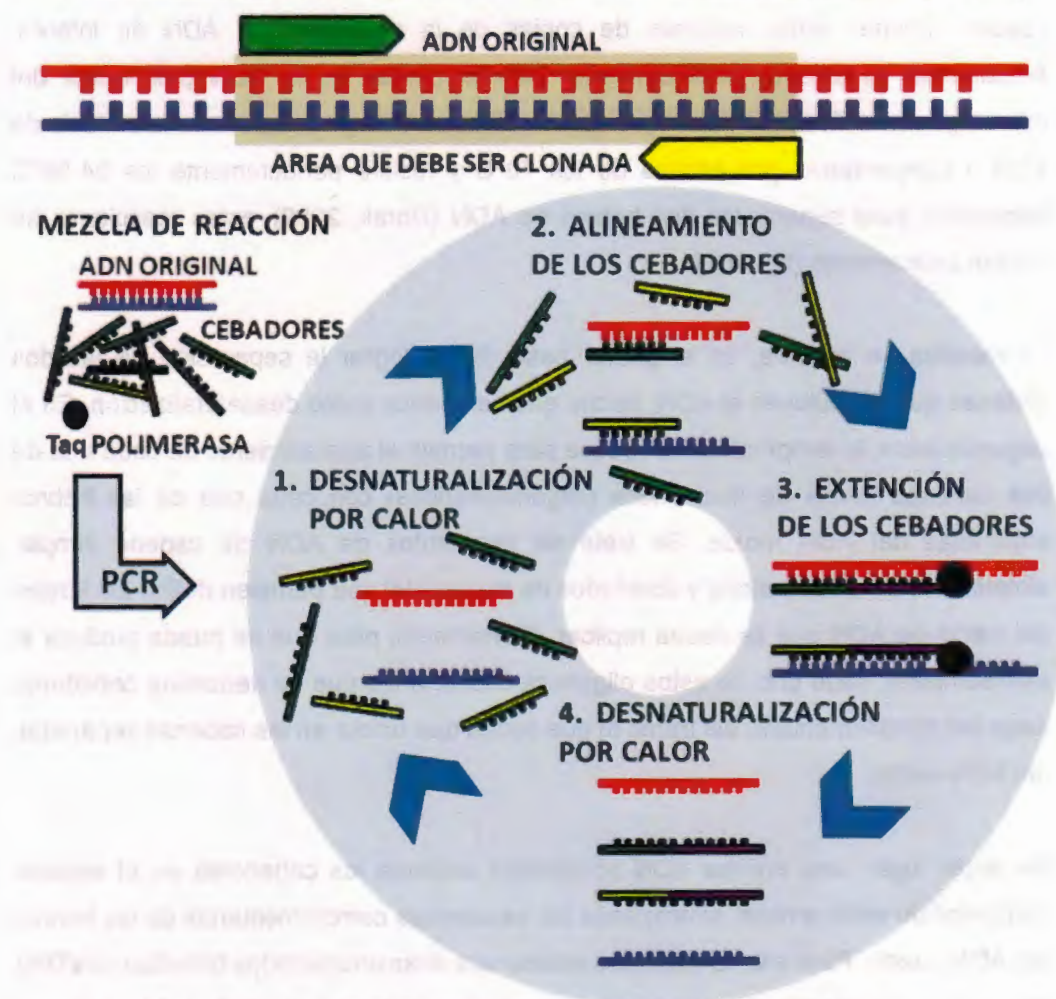


Figura 1. Representación esquemática de la PCR.

1.4.2 Fundamento teórico de la PCR anidada

La PCR anidada es la técnica actualmente utilizada para detectar al fitoplasma causante del amarillamiento letal en cocotero tanto en la planta hospedera como en el vector. El fundamento teórico de esta técnica es la doble amplificación exponencial definida de un segmento de nucleótidos, mediante el uso de cebadores que se hibridan de forma complementaria. La técnica de PCR anidado consta de los mismos pasos que una PCR convencional (desnaturalización, apareamiento, extensión) pero realizada dos veces. La segunda PCR toma como templado el producto de la primera

amplificación de la PCR para realizar una segunda amplificación en regiones internas del primer amplicón. El primer paso de amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en la desnaturalización del ADN molde o templado que son secuencias específicas para el grupo microbiano dentro del gen 16S y 23S rRNA, los cebadores universales para fitoplasmas que se hibridan a esta región son P1 y P7, se realizan 20-30 ciclos de este proceso de PCR y se obtienen varios millones de copias de la secuencia de interés. Después de la amplificación la primaria se toma una alícuota del producto y en una segunda amplificación se utiliza como templado con los cebadores específicos 503f y LY16Sr los cuales amplifican sobre la región 16S.

El producto de la segunda amplificación se observa sobre un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (figura 2), entre las ventajas que tiene la técnica debido al doble paso de amplificación es el incremento de la sensibilidad y la especificidad pero también se potencializa el riesgo de contaminación y por lo tanto de falsos positivos, otra desventaja que tiene la técnica es que requiere del doble de tiempo para tener los resultados además de que solo se puede visualizar el producto final a través de un gel de agarosa.

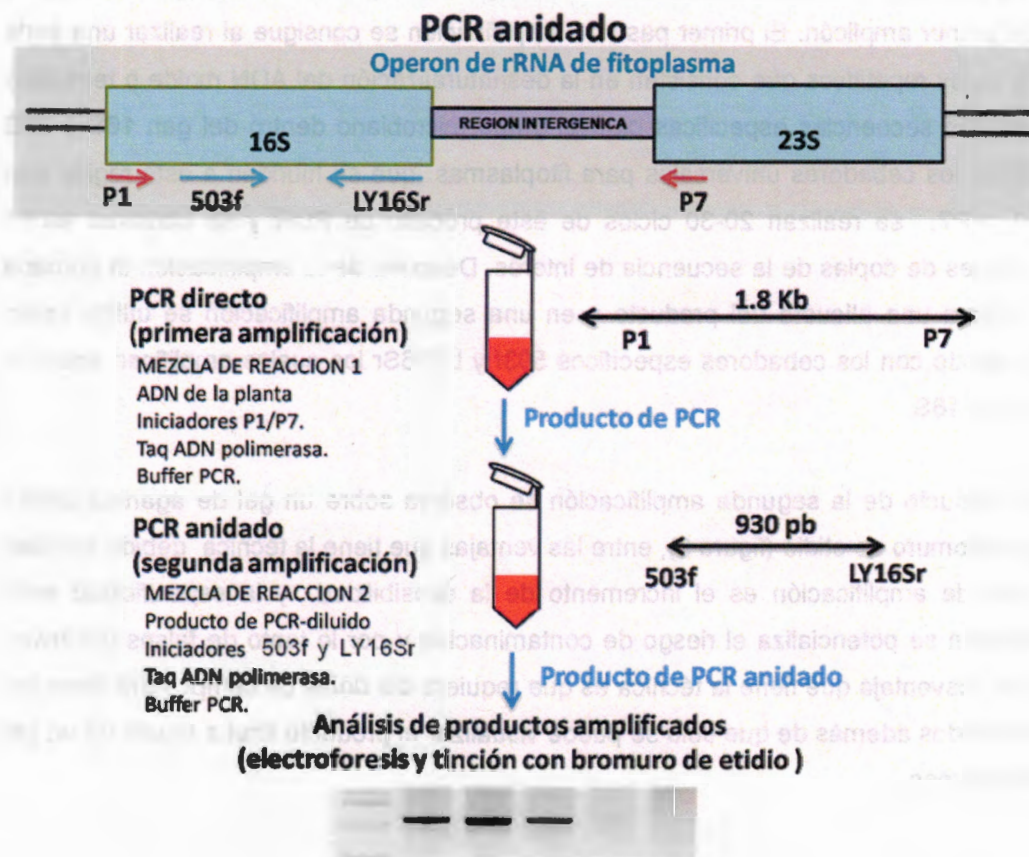


Figura 2. Representación esquemática de la PCR-anidado en la detección de fitoplasmas *Ca. Phytoplasma palmae* causante del amarillamiento letal en cocotero.

1.4.3 Fundamento teórico de la PCR en tiempo real

La PCR es una técnica muy utilizada, sin embargo solo se pueden obtener resultados cualitativos, por otro lado la técnica de PCR anidada tiene mayor riesgo en cuanto a la contaminación del material debido a la manipulación. Para hacer frente a estas desventajas, la PCR en tiempo real ha sido utilizada para la detección de microorganismos. Esta técnica brinda una gran cantidad de datos con una alta sensibilidad y especificidad (Poitras y Houde, 2002). Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores utilizados para la PCR a tiempo real contienen un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se esté realizando la amplificación (Dorak, 2009). Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas.

Los agentes intercalantes, son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green (Heid *et al.*, 1996). El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o en dímeros de cebadores, que se forman muy frecuentes en la PCR.

Las sondas de hidrólisis. Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Un ejemplo de estas sondas son las TaqMan, otros tipos de sondas son las molecular beacons, sondas scorpions, etc. Actualmente las sondas TaqMan son las más utilizadas, en la literatura se les clasifica como sondas de hidrólisis y son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de sobrelapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor (Lee *et al.*, 2004). Sin embargo, durante la amplificación del ADN blanco, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 3).

PCR- TIEMPO REAL SONDA TaqMan

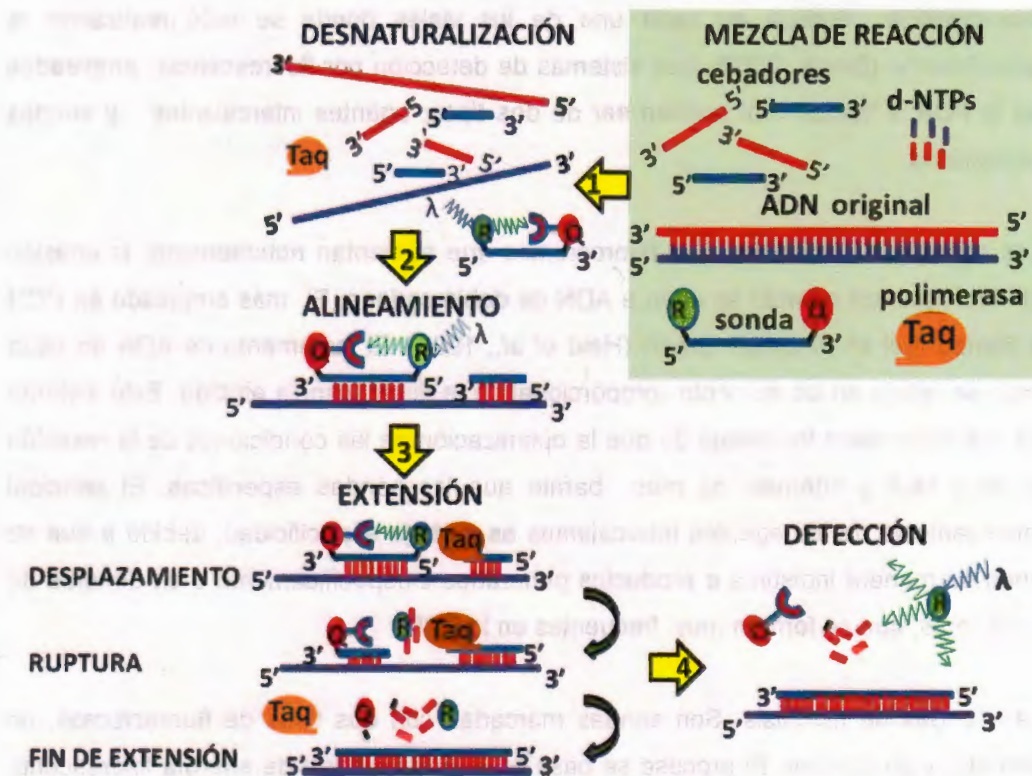


Figura 3. Representación esquemática de una PCR en tiempo real con una sonda TaqMan.

Entre las ventajas que ofrecen Las sondas TaqMan es su gran especificidad y sensibilidad además de que se requieren cantidades muy pequeñas de ADN, los resultados son rápidos, directos y se pueden visualizar a través del ordenador en cada ciclo de reacción, las ventajas de esta técnica son mayores en comparación con la PCR anidada debido a que esta técnica no requiere de geles para visualizar el producto de la reacción, la PCR en tiempo real ha desplazado a la PCR anidada en la detección de fitoplasmas y otros microorganismos, recientemente se ha visto un aumento en los reportes del uso de sondas TaqMan para la detección de fitoplasmas (cuadro 5).

1.4.4 Detección de fitoplasma usando la técnica de la PCR en tiempo real

Cuadro 5. Literatura que describe el uso de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas.

Estudio	Referencia
Distribución de fitoplasmas en plantas infectadas en <i>Catharanthus roseus</i> y <i>Euphorbia pulcherrima</i> .	Christensen <i>et al.</i> , 2004
Cuantificación relativa del fitoplasma <i>Chrysanthemum Bellows</i> en plantas del <i>Chrysanthemum carinatum</i> e insectos <i>Macrosteles quadripunctulatus</i> .	Marzache y Bosco, 2005
Detección cuantitativa de fitoplasmas del grupo 16SrX en arboles de manzano.	Torres <i>et al.</i> , 2005
Detección y cuantificación del grupo 16Sr VI en plantas de tomate, papa e insectos.	Crosslin <i>et al.</i> , 2006
Detección de <i>Candidatus phytoplasmas mali</i> en arboles de manzana.	Adhahi <i>et al.</i> , 2007
Detección de fitoplasmas <i>Flevescence doree</i> y <i>Bois noir</i> en plantas de uva.	Hren <i>et al.</i> , 2007
Detección de fitoplasmas en general y del grupo IV16Sr	Hodgetts <i>et al.</i> , 2009

En el cuadro 5 se presentan la mayoría de los trabajos reportados en la literatura que han utilizado la técnica de PCR en tiempo real para la detección de fitoplasmas. En el caso del fitoplasma del amarillamiento letal que afecta a la palma de cocotero dos trabajos se han realizado. Hodgetts *et al.*, (2009) desarrollo un ensayo de PCR en tiempo real basado en el gen 23S rRNA para detectar a los fitoplasmas en general, adicionalmente en ese mismo reporte, utilizando diferentes cebadores se pudo detectar específicamente a varios grupos de fitoplasma incluyendo al grupo 16SrIV, donde está clasificado el fitoplasma del AL. Sin embargo, con el fitoplasma del AL no sé reportó ninguna caracterización posterior. Por otra parte, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, Puch Hau (2010) diseñó una sonda específica para este fitoplasma basado en el gen 16S rRNA y lo caracterizó posteriormente.

1.5 El gen *groEL*

Las chaperoninas constituyen un grupo de proteínas cuya función es la participación en el correcto plegamiento de los polipéptidos *in vivo* hacia una estructura terciaria plenamente funcional. Los elementos mejor caracterizados son las proteínas *GroEL* y *GroEs* de *E. coli*. Hemmingsen acuñó en 1986 el término chaperoninas para designar una familia de proteínas que comparten homología en su secuencia de aminoácidos y actúan como chaperonas en cloroplastos, mitocondrias y bacterias. Su peso molecular está en torno a los 60 kilodaltons (Sigler *et al.*, 1998 Hemmingsen y Ellis 1986).

Las funciones principales de las chaperoninas son: a) Impedir la agregación de los polipéptidos parcialmente plegados y liberados de los ribosomas, b) Unirse a péptidos parcialmente plegados aunque atrapados en una conformación tal que no pueden plegarse de manera espontánea c) Proteger a las proteínas de la desnaturalización debida a estrés térmico o facilitar el plegamiento si se ha producido la desnaturalización d) Generar las condiciones adecuadas para un plegamiento correcto de las proteínas desnaturalizadas. Todas las chaperoninas conocidas hasta la fecha son oligoméricas y comparten una estructura similar: un cilindro compuesto por uno o dos anillos. Cada anillo encierra una cavidad, que es el lugar donde se produce el plegamiento de las proteínas.

1.5.1 Detección del fitoplasma del AL mediante el gen *groEL*

Actualmente en un laboratorio de la Universidad de Florida se está realizando la secuenciación del genoma del fitoplasma del AL teniendo como líder del proyecto al Dr. Nigel Harrison. El Dr. Harrison ha aislado y secuenciado entre otros un fragmento del genoma del fitoplasma con alta homología al gen *groEL*, ha diseñado cebadores específicos para esta secuencia y por medio de la técnica de PCR anidada ha logrado detectar al fitoplasma del AL de manera específica y relativamente más sensible que el PCR anidado convencional de la fracción 16S. Por lo tanto el uso de una sonda TaqMan utilizando como blanco este gen podría ser una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad del amarillamiento letal.

1.6. Justificación

La enfermedad del amarillamiento letal causada por un fitoplasma ha causado grandes estragos en las plantaciones; aún está presente en diversas partes del continente y en México. Los fitoplasmas se encuentran en los vasos del floema, normalmente tienen una distribución heterogénea en la planta y se presentan en bajas concentraciones; por otro lado, estos agentes patógenos no se pueden cultivar *in vitro*, la técnica utilizada actualmente para el diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su modalidad de anidado de la fracción 16S ribosomal del fitoplasma. Sin embargo a pesar de que esta técnica es sensible, es tardada, involucra dos pasos de reacción de PCR donde habría la posibilidad de contaminación y por lo tanto la detección de falsos positivos, por lo tanto es necesario desarrollar una técnica más simple y específica para su detección que permita en forma sensible y confiable la identificación de estos organismos.

Actualmente la PCR en tiempo real ha proporcionado herramientas para la detección de fitoplasmas, aún en bajas concentraciones, mejorando la seguridad en el diagnóstico. La detección de estos organismos antes de la aparición de los síntomas permitirá diseñar estrategias en el manejo para prevención, diseminación y daños que ocasionan a plantaciones de cocotero de interés comercial. Una ventaja por ejemplo, es que el tiempo necesario para obtener resultados se reduce al no requerir dos pasos de amplificación, así como el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. Por otra parte el equipo en tiempo real, proporciona según transcurre la reacción de PCR un resultado numérico, que permite la cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Debido a la necesidad de desarrollar técnicas más simples, rápidas, sensibles y específicas para detectar la presencia de fitoplasmas en plantas enfermas de AL, en cocotero se planteo la siguiente hipótesis.

1.7 Hipótesis

La PCR tiempo real ha demostrado ser una técnica sensible, específica y rápida que ha permitido la detección específica de microorganismos en plantas enfermas, entonces es posible que mediante el diseño de una sonda TaqMan e iniciadores específicos sobre el gen *groEL* se pueda detectar al fitoplasma del amarillamiento letal en palmas de cocotero.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo de detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal basado en el uso de PCR tiempo real y una sonda TaqMan que tenga como blanco al gen *groEL*.

1.8.2 Objetivos específicos

Diseñar una sonda TaqMan e iniciadores específicos respectivos para el gen *groEL* del fitoplasma causante del AL.

Determinar la especificidad y sensibilidad de la sonda TaqMan para el gen *groEL* del fitoplasma causante del AL utilizando la técnica de la PCR en tiempo real.

1.9 Referencias bibliográficas

- Angelini, E., Bianchi G., Filippin L., Morassutti C. y Borgo M (2007). A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 613 -622.
- Avelaño, S., Tapia A. y Espinosa A (1999). Generación y transferencia de tecnología en el INIFAP, para el desarrollo de la agricultura mexicana. *Terra*, Vol. 17 (3), 265-270.
- Baric, S., Kerschbamer C., y Dalla Via J (2006). TaqMan Real-time PCR versus Four Conventional PCR Assays for Detection of Apple Proliferation Phytoplasma. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24: 169–184.
- Baudouin, L. y Lebrun P. (2009) Coconut (*Cocos nucifera* L.). DNA studies support the hypothesis of an ancient Austronesian migration from Southeast Asia to America. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56:257–262.
- Borja, L. (1983) importancia socioeconómica del amarillamiento Letal y su control cuarentenario. *Memoria Nacional de Parasitología Agrícola*. Jalapa. Veracruz.
- Chang, C., y Lee (1995) Pathogenesis of diseases associated with mycoplasma-like organisms. In *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*, ed. US Singh, RP Singh, K Kohmoto, New York: Elsevier 1:237–46.
- Chang, C. (1998) Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology*, 88:1347–50.
- Chen, T., J. Lei y C. Lin (1992). Detection and identification of plant and insect mollicutes. In *The Mycoplasmas*, ed. RF Whitcomb, JG Tully, New York: Academic. 5:393–424.
- Chiykowski, L., y R. Sinha (1989). Differentiation of MLO disease by means of symptomatology and vector transmission. *Zentralbl. Bakteriöl. Hyg. Suppl.* 20:280– 87.
- Chiykowski, L. (1991). Vector pathogen host plant relationships of clover phyllody mycoplasma-like organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. *Can. Journal. Plant Pathology*.13:11–18.
- Christensen, N., M. Nicolaisen, M. Hansen y A. Schultz (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17:1175–84.
- Davis, R. y W. Sinclair (1988). Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88:1372–76.

- Doi, Y., M. Teranaka, K. Yora y H. Asuyama (1967) Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33:259-266.
- Domínguez Castillo, E., J. López Arroyo y P. Ruiz Beltrán (1999). El cocotero *Cocos nucifera* L. manual para la producción en México, INIFAP, CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo, Libro técnico Núm. 6. Tabasco, México, p 132.
- Dorak, M. (2009). Real-Time PCR
<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html> (acceso 10 de octubre de 2009)
- Errampalli, D., Fletcher y P. Claypool (1991). Incidence of yellows in carrot and lettuce and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Disease*, 75:5 79–84.
- FAO Food and Agriculture Organization, 2009. Historia del cocotero.
http://www.fao.org/corp/google_result/es/?cx=0181706201437011049333%3Apvqiwrh_hhq&q=cocotero&cof=FORID%3A9&x=4&y=3#974 (acceso 6 de septiembre de 2009).
- Haggis, G. y R. Sinha (1978). Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology*, 68:677–80.
- Harries, H. (1995). Coconut. *Cocos nucifera* L. (Palmae). In: Smartt J, Simmonds NW (eds) *Evolution of crop plants*. Longman Scientific & Technical, New York, pp 389–395.
- Harries, C. (2000). Coconut in tree cop ecosystems. Ed F.T last. S.n.t. 321 -338.
- Heid, C., J. Stevens, K. Livak y P. Williams (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- Henderson, A., G. Galeano y R. Bernal. 1995. *Field Guide Palms Americas*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. pp. 1-352
- Hemmingsen, S. M. y R. J. Ellis (1986). *Plant Physiology*. 80, 269–276.
- Hogenhout Saskia, Kenro Oshima, El-Desouky Ammar, Shigeyuki Kakizawa, Heather, Kingdom, Shigetou Namba (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9 (4), 403–423.
- Howard, F. y R. Mc Coy (1980). Reduction in spread of mycoplasma-like organism associated lethal decline of palm, *veitchia merillii*, by use of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 73:268-270.

- Howard, F., P. Kramer y M. Peralta (1981). Hymenopteros *Auchenorrhycha* asociados a palmeras en un área de la República dominicana afectada por el Amarillamiento letal del cocotero. *Folia entomologica Mexicana*.
- Howard, F., R. Norris y D. Thomas (1983). Evidence of Transmission of Palm Lethal Yellowing Agent by a Planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae) *Tropical Agriculture*, 60 (3): 168 -1971.
- Lee, I. y R. Davis (1992). Mycoplasmas which infect plants and insects. In *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, ed. J Maniloff, RN McElhansey, LR Finch, JB Baseman, Washington, DC: The American Society for Microbiology, pp. 379-90.
- Lee, M.A., Squirrel, D.J., Leslie, D.L., and Brown, T. (2004) Homogenous fluorescent chemistries for real-time PCR. In *Real-time PCR: An Essential Guide* (K. Edwards, J. Logan, and N. Saunders, eds.).Horizon Bioscience, Norfolk, U.K. pp. 85-102
- Martyn, R. y J. Midcap (1975). History, Spread, and other palm hosts of lethal Yellowing of coconut palm. Circular 405. Florida Coop. Ext. Ser. Inst of Foot and Agric. Sciences Univ. of Florida, Gainesville.
- McCoy RE., FW. Howard, M. Tsai, HM. Donselman, DL. Thomas, HG. Basham, RA: Atilano, FM. Eskafi, L. Britt y ME. Collins (1983). Lethal yellowing of palms. University Experiment Station Technical Bulletin No 834.
- McCoy, R., V. Carrol; C. Poucher y C. Gwin (1976). Field control of lethal yellowing with oxytetracycline hydrochloride. *Phytopathology*, 66: 1148-1150.
- McCoy, R., M. Miller, D. Thomas y J. Amador (1980). Lethal Decline of Phoenix palms in Texas associated with mycoplasma-like organisms. *Plant Disease*, 64(11):1038-1040.
- McCoy, R., A. Caudwell, C. Chang, T. Chen, L. Chiykowski (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In *The Mycoplasmas*, ed. RF Whitcomb, JG Tully, New York: Academic. 5:545-60.
- Mullis, K. y F. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polimerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- Parthasarathy MV (1974). Mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology*, 64: 667-674.
- Poitras, E. y A. Houde (2002). La PCR en temps réel: principes et applications *Reviews in Biology and Biotechnology By The Moroccan Society of Biology*, 2(2), 2-11

- Puch Hau, C. (2010). Implementación de la técnica de PCR tiempo real usando TaqMan para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México.
- Oropeza, C. (2001). Importancia y usos del cocotero. In: informe sobre curso teórico practico sobre ALC Ed. A. García y C. Sabio. 2001.
- Oropeza C. y D. Zizumbo (1997). History of lethal yellowing in Mexico. In: Eden-Green, S. & F. Ofori (Eds), Proceedings of an International Workshop on Lethal Yelowling-like diseases of coconut, Elmina, Ghana, November 1995, pp. 69–76. Chatham, UK: Natural Resources Institute.
- Robert, M.L. y Zizumbo V.D. (1990) la problemática del amarillamiento letal del cocotero en México. CICY. Mérida, Yucatán. México. PP 159-169.
- SAGARPA <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
- Seemuller, U. Marcone, A. Lauer, A. Ragozzino y M. Goschl (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasma. Journal Plant Pathology, 80:3-26, 1998.
- Shiomi, T. y M. Sugiura (1984). Grouping of mycoplasma-like organisms transmitted by the leafhopper vector, *Macrostelus orientalis* Virvaste, based on host range. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 50:149–57.
- Sigler, P., Z. Xu, H. Rye; S. Burston; W. Fenton y A. Horwich, (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. The Annual Review of Biochemistry, 67:581–608.
- Teulat, B., C. Aldam, R. Trehin, P. Lebrun, J. Barker, G. M. Arnold, A. Karp. L. Baudouin y F. Rognon (2000). An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. Theoretical and Applied Genetics, 100:764–771.
- Tsai, J. y F. Mead (1982), Rotary net survey of homopterans in palms planting in South Florida. Journal of Economic Entomology, 75(5):809-812.
- Urbina, N. (1997) plan de evaluación, control, capacitación y comunicación del amarillamiento letal del cocotero. Tegucigalpa Honduras. Secretaria de agricultura y ganadería.
- Zizumbo-Villarreal, D. (1996) History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in México: 1539-1810. Genetic Resources and Crop Evolution, 43(6), 505-515.

CAPÍTULO II: DISEÑO DE INICIADORES Y DE LA Sonda TAQMAN

2.1 Introducción

Uno de los factores más importantes para diseñar una sonda es seleccionar un fragmento (amplicón) con un tamaño comprendido entre 50 y 150 pb (que en ningún caso deberá superar los 400 pb), ya que los amplicones pequeños proporcionan una alta eficiencia al ensayo, que se traduce en una mayor exactitud y sensibilidad de la técnica (Mackay *et al.*, 2002). En ensayos cuantitativos las sondas con más de 40 bases pueden producir resultados insatisfactorios, debido a que se dificulta la transferencia de energía entre el reportero y apagador.

Las sondas minor groove binder (MGB) presentan la particularidad de unirse al surco menor del ADN, lo que favorece la estabilidad y especificidad de la hibridación (Baric, 2004). Esto permite el diseño de sondas de menor tamaño (entre 13 y 20 pb) particularmente en el caso de secuencias ricas en A y T, en las que las sondas presentarían una longitud excesiva. Este hecho favorece un diseño más versátil de los sistemas de PCR tiempo real.

Actualmente se cuenta una gran variedad de fluoróforos, tales como el SYBR Green y bromuro de etidio, los cuales se unen a la doble cadena de ADN emitiendo una fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena, pero estos fluoróforos tienen la particularidad de ser inespecíficos (Wittwer *et al.*, 1997). A diferencia de la especificidad que presentan las sondas que están marcadas en sus extremos con dos fluoróforos uno en el extremo 5' denominado reportero o donador de electrones el cual emite una fluorescencia que es captada por el fluorocromo ubicado en el extremo 3' denominado *quencher* o aceptor de electrones, cuando la sonda está intacta no hay detección de la fluorescencia, solo puede ser detectada cuando la sonda hibrida con el ADN blanco (Heid *et al.*, 1996). Además en la etapa de alineamiento existe una hibridación tanto de los cebadores como de la sonda con las secuencias complementarias al ADN blanco, al introducir las sondas y cebadores permite confirmar que el producto amplificado sea el que se desea, permitiendo así una doble especificidad (Livak *et al.*, 1995).

Conocer la secuencia nucleotídica del gen que nos interesa es fundamental para el diseño de la sonda, además la secuencia de interés también servirá para realizar el escrutinio en la base de datos del NCBI para identificar secuencias homologas.

2.2 Materiales y métodos

La sonda TaqMan se diseñó a partir de la secuencia conocida del fragmento del gen LY-groEL del fitoplasma de AL, dicha secuencia fue proporcionada por el Dr. Harrison de la Universidad de Florida (cuadro 4).

El fragmento del gen LY-groEL se comparó con las secuencias existentes en la base de datos del Genbank (National Center Biotechnology Information, NCBI), este fragmento presentó homología con secuencias de fitoplasmas. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando CLUSTALW2, que permitió obtener las secuencias consenso para diseñar la sonda TaqMan.

La sonda fue marcada con 6-carboxyfluoresceina (FAM) en el extremo 5' como donador de electrones (reportero) y en el extremo 3' (NFQ) como aceptor de electrones (quencher no fluorescente). La sonda TaqMan fue sintetizada por la Compañía Applied Biosystem (Foster City, CA, EUA); A esta sonda se le denominó LYgroEL. La sonda está conjugada con un grupo denominado minor groove binder para mayor especificidad.

Cuadro 6. Secuencia de un fragmento de 1,629 pb del gen *groEL* del fitoplasma que produce el amarillamiento letal. La secuencia fue proporcionada por el Dr. N. Harrison de la Universidad de Florida.

gen LY-*groEL*, 1,629 bp

```

ATGGCTAAAGAAATTCCTTTTGGAAAAGATGCTAGAAGAGAAATTTTAAAAGGTGTAAT
ATTTTAGCAAATACTGTAAATCGACTTTAGGACCAAAAGGTAATAATGTTGTTTTACAA
AAAAATGATTCTATTATTGCTTGTAAATGATGGAGTTACAATAGCTAAAGAAATAGAATTA
AAGAATCTTTATCAAAATATGGGTGCAAAATTAGTATGTGAAGCTGCTAGTAAAACTAAC
GATAATGCTGGAGATGGGACTACTACTGCAACTGTTTTAGCTCAGTATATGATTAATAAA
GGTTTTAAATTTGTTGAATCCGGTTCTAAAGCTGTTCTGCTTAGAGAAGGAATTTTAAAA
GCTGCTGATTTAGTTGCTAAAAAAGCTTTTAGAAAAATCAAAACCTGTTGTAACGCAAGAG
GATATTGAAAATATTGCTTCTATTTCTTCAGGACAAAAATCAATAGGTAAAATAATAGCC
TCTGCTATGGAAAAGGTTACTAAAAAAGGTGTTATTAGTGTTGATGAATCTAAAGGTTTT
GAAACAGAATTAGAAGTTGTTCAAGGGATGCAATATGATAAAGGTTATGTTTCACCTCAT
TTTATTACTAATAAGGAAAATATGTCTATTGATTTAGAAAAAGTATCTATTTTAGTTACT
GATCATAAAATAAATAATATACATGAAATTCGTTTTTTGTTAGAAGAAATAGTTAAATCT
TCTATTCCTTTGTTAATTATTGCTGATTCTTTTTGAAACAGATGTTATTAATTCTTTAGTT
TTTAATAAAATAAGCGGAGTTTTTAATGTTGTTGCTACTGAAGCTCCAGGATTCGGAGAT
AATCAAAAAGAATTACTGAAAGATATATGTGCTTTATCTAAAGCTACTTTTATATCTAAA
GATTTAAATATGAAATTACAAGATGTTAATATGAAACATTTAGGACAAATTAATAAAGCA
ATCGTTAAAAAAGATAACACAGTTTTAGTTGGTGATAACAAAACGGAATCTTTAATAGAA
AGAATTAAGAAATTGAATCACATATTAATAACAATAATGATTATGATTTACAAAAT
TTAAAATCTCGTTTAGCTAATTTATCTGGAGGAGTGGCAGTTATTAAGTTGGTTCAATG
ACTGAAGCTGAGTTAAAAGAACAAAAATTAAGAATTGAAGATGCTTTAAATGCTACTCAA
GCTGCTTTAGATGAAGGTATATCTGTTGGTGGTGGAAAATCTTTAATTAATGTTTATAAA
AATTTAAAAGATATTTTAAAAAATGATAATAGTGATATTCAAAGGGAATGAATATTGTT
TTAGAAAAGTTTATTATCCCCTTCTTATCAAATTGCCGAGAATTCTGGTTTTGATGGAGAT
ACTGTTGTAAAAAACAATTAACAGAAAGAAGAAAGTTTTGGTTTTGATTCTAAAGAA
GGTAAATATGTTGATTTAATCAAAAAAGGTATTATTGATCCTACTAAAGTTACTAGACAA
GCGATTTTAAATCTGCTTCAATTGCTTCTGTTATAATTACAACAGGAGCCGCTGTAGTT
CCAGTTAAAGAACAATCTAATGATAGTGGTTGTTGTTCTTCTCCTATGATGGATTCTAAT
TTTTTATAA

```

2.3 Resultados

Al hacer la comparación de la secuencia del gen LY-groEL con la base de genes del Genbank, dio como resultado un 76% de similitud con secuencias de fitoplasmas que producen amarillamiento en la cebolla, fitoplasma causante del desorden conocido como "escoba de bruja" en Paulownia, fitoplasma del amarillamiento en lechuga, fitoplasma del amarillamiento en tomate, etc. (figura 4).

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Página principal (Alt+P)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max similarity
CU469464.1	Candidatus Phytoplasma mali strain AT complete chromosome	769	769	95%	0.0	76%
AP006628.2	Onion yellows phytoplasma QY-N DNA, complete genome	549	549	94%	2e-152	74%
AB167357.1	Potato purple top phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for	549	549	94%	2e-152	74%
AB124810.1	Paulownia witches'-broom phytoplasma groES, groEL, amp, nadE q	549	549	94%	2e-152	74%
AB124808.1	Onion yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for mol	549	549	94%	2e-152	74%
AB124807.1	Onion yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for mol	549	549	94%	2e-152	74%
AB124811.1	Phytoplasma sp. AYBG groES, groEL, amp, nadE genes for molecu	544	544	94%	8e-151	74%
AB242235.1	Marquette yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for	538	538	94%	4e-149	74%
AB242231.1	Eqoplant dwarf phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for mc	538	538	94%	4e-149	74%
AB242237.1	Porcelain vine witches'-broom phytoplasma groES, groEL, amp, nad	532	532	94%	2e-147	74%
AB242234.1	Iceland poppy yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes	532	532	94%	2e-147	74%
AB242233.1	Lettuce yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for m	532	532	94%	2e-147	74%
AB242232.1	Tomato yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for m	532	532	94%	2e-147	74%
AB124809.1	Nulberry dwarf phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for mc	532	532	94%	2e-147	74%
AB124806.1	Onion yellows phytoplasma groES, groEL, amp, nadE genes for mol	532	532	94%	2e-147	74%
AB242236.1	Sumac witches'-broom phytoplasma groES, groEL, amp, nadE gene	521	521	94%	4e-144	74%
CP000061.1	Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB, complete genom	521	521	94%	4e-144	74%
DQ912817.1	Candidatus Phytoplasma prunorum molecular chaperonin GroEL ge	204	204	27%	1e-48	75%
DQ912810.1	Candidatus Phytoplasma mali molecular chaperonin GroEL gene, ps	204	204	27%	1e-48	75%
DQ912818.1	Faba bean phyllody phytoplasma molecular chaperonin GroEL gene,	198	198	27%	7e-47	75%
DQ912816.1	Candidatus Phytoplasma vitis molecular chaperonin GroEL gene, ps	198	198	27%	7e-47	75%
DQ912815.1	'Crotalaria sp. Thailand' witches'-broom phytoplasma molecular che	198	198	27%	7e-47	75%
DQ912814.1	Sugarcane white leaf phytoplasma molecular chaperonin GroEL gen	193	193	27%	3e-45	75%
DQ912811.1	Aster yellows phytoplasma molecular chaperonin GroEL gene, parti	182	182	27%	7e-42	74%
DQ912813.1	Buckland Valley grapevine yellows phytoplasma molecular chaperon	178	178	23%	9e-41	76%
DQ912812.1	Western X phytoplasma molecular chaperonin GroEL gene, partial c	178	178	23%	9e-41	76%
DQ912820.1	Candidatus Phytoplasma aureumifolia molecular chaperonin GroEL q	176	176	27%	3e-40	74%
CP001685.1	Leptotrichia buccalis DSM 1135, complete genome	87.9	87.9	8%	2e-13	78%

Figura 4. Secuencias que presentan homología al gen LY groEL comparadas en el Genebank.

Las secuencias con similitud mayor a 74% del alineamiento se tomaron para elaborar el alineamiento ClustalW, se seleccionaron las bases del gen *groEL* que divergían de las bases de otras secuencias de genes (figura 5) la sonda se diseñó sobre la sección del fragmento del gen *groEL* que no presentaba semejanza de bases.



Figura 5. Secuencias homólogas al fragmento del gen LY groEL; la flecha indica la sección en donde fue diseñada la sonda TaqMan; las bases del gen LY groEL difieren en esta sección con respecto a las de otras secuencias.

La sonda que se diseñó fue la siguiente: la sonda TaqMan tiene la secuencia 5'-FAM-CCGGATTCAACAAATTT-NFQ-3 y a la cual se le nombro LYgroEL, el cebador sentido tiene una secuencia de 5' CTACTACTGCAACTGTTTGTAGCTCAGT-3 el cual se le nombro LYgroEL-F y el cebador antisentido tuvo la secuencia 5'-AATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTT-3 el cual se le nombro LYgroEL-R.

La sonda se encuentra localizada en la base número 297 del fragmento LY groEL, la longitud del amplicón es de 80 pb. y la sonda es de 17 pb. Este gen se expresa constitutivamente en el genoma del fitoplasma (figura 6).

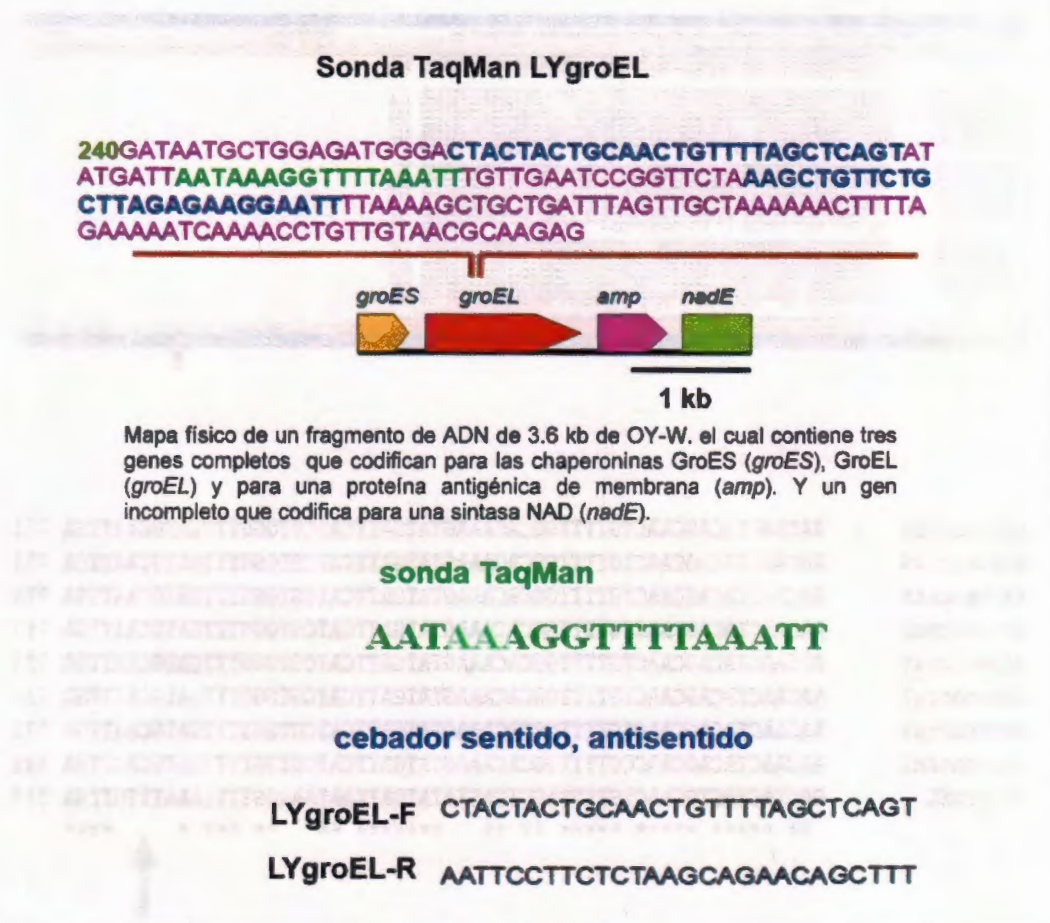


Figura 6. Representación gráfica de la región que amplifica la sonda TaqMan LYgroEL y cebadores.

2.4 Discusión

La introducción de una modificación de la PCR convencional (Higuchi *et al.*, 1992) que permitió la amplificación y detección simultánea de secuencias de ADN específicas mediante la adición de bromuro de etidio, demostró ser altamente competitiva y muy útil en la detección de ADN y ARN (Bustin *et al.*, 2005; Higuchi *et al.*, 1993). Por lo que actualmente se utiliza exitosamente en la detección e investigación de microorganismos como son virus, bacterias, fitoplasmas, así como de plantas genéticamente modificadas, en el campo de diagnóstico clínico, etc. El aumento de

publicaciones con la técnica de PCR-tiempo real demuestra que está es una técnica de vanguardia (Valasek y Repa, 2005).

Por otra parte la PCR en tiempo real ha sido utilizada como el principal método de detección de varios patógenos que debido a su baja concentración solo pueden ser detectadas con esta técnica, la técnica puede también aplicarse a cuantificación de patógenos. Una razón por la cual se han utilizado las sondas TaqMan en la detección de diferentes microorganismos es porque tienen un alto grado de especificidad esto es debido, que en caso de darse una reacción inespecífica no existe un aumento en la fluorescencia debido que la sonda se encuentra intacta (Holland *et al.*, 1991). En el caso de la sonda TaqMan diseñada para la detección del virus de la psorosis de cítricos la cual amplifica un fragmento de 79 pb, cuya sonda fue de 18 pb. Esta fue marcada con FAM y un quencher no fluorescente, en este trabajo se concluyó que la técnica es adecuada para la detección de dicho virus (Barragán *et al.*, 2008).

En otro trabajo realizado el PCR-tiempo real para detectar a la bacteria *Spiroplasma kunkelii* que causa el achaparramiento en maíz, esta técnica resultó más sensible que la técnica convencional utilizada para la medición, la sonda diseñada fue de 28 pb y tenía como blanco al gen adhesin-like gene (Wei *et al.*, 2006).

El desarrollo eficiente de la PCR en tiempo real para la detección de microorganismos a posibilitado que esta sea utilizada en la detección de fitoplasmas lo que ha llevado una considerable simplificación de la detección en comparación con la técnica que se utilizaba convencionalmente el PCR anidado (Christensen *et al.*, 2004).

Un análisis realizado en PCR tiempo real para detectar fitoplasmas del grupo 16SrVI en el ADN de extractos preparados a base de tomates infectados, patatas, remolacha y en insectos *tenellus Circulifer*, se determinó que esta técnica fue capaz de detectarlos con éxito; la sonda TaqMan que diseñaron estaba marcada con FAM en 5' y TAMRA en el extremo 3' tuvo 25 pb (Crosslin *et al.*, 2006). La sonda diseñada en este trabajo tiene una longitud de 17 pb y el tamaño del amplicón es de 80 pb por lo cual es muy semejante a las que han sido reportadas en la detección de fitoplasmas.

Referencias bibliográficas

- Baric, Dalla-Via (2004). A new approach to apple proliferation detection: A highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 57:135-145.
- Barragán, G.; A. Morales y M. Álvarez (2008). Quantitative diagnosis of citrus psorosis virus by real time RT-PCR. *Agrociencia*, 42: 225-232.
- Bustin, S., V. Benes y T. Nolan (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3):597-601.
- Christensen, N., M. Nicolaisen, M. Hansen y A. Schulz (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant—Microbe Interactions*, 17(11): 1175–1184.
- Crosslin, J., G. J. Vandemark y J. E. Munyaneza (2006). Development of a Real-Time, Quantitative PCR for Detection of the Columbia Basin Potato Purple Top Phytoplasma in Plants and Beet Leafhoppers, *Plant Disease*, 90:663-667.
- Heid, C., J. Stevens, KJ. Livak y P. Williams (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-94.
- Higuchi, R., G. Dollinger, PS. Walsh y R. Griffith (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4):413-7.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, 11(9):1026-30.
- Holland PM, RD. Abramson, R. Watson y DH. Gelfand (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 7276–7280.
- Livak, KJ., S J. Flood, J. Marmaro, W Giusti y K. Deetz (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, 4: 357-62.
- Mackay, I., K.E. Aarde y A. Nitsche (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 1292–1305.
- Valasek, M. y J. Repa (2005). The power of real time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29, 151-159.
- Wei, D. Robert; O. Dan, Chung-Jan, Chang, C. Summers y Y. Zhao (2006). Characterization of a Novel Adhesin-like Gene and Design of a Real-Time PCR

for Rapid, Sensitive, and Specific Detection of *Spiroplasma kunkelii*, Plant Disease, September 2006 1233.

Wittwer, C., M. Hermann, A. Moss y R. Rasmussen (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. BioTechniques, 22, 130–138.

CAPÍTULO III: OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PCR EN TIEMPO REAL

3.1. Introducción.

Debido a la interdependencia de todos los componentes empleados en un sistema de PCR en tiempo real y con el fin de conseguir resultados reproducibles en los distintos ensayos es necesario seguir una serie de pautas para el diseño y optimización del sistema, como por ejemplo el establecimiento de parámetros de la reacción de amplificación (Moretti *et al.*, 1998).

El método de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN a partir de los cuales la enzima ADN polimerasa, realiza la síntesis exponencial en cada ciclo de amplificación, consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión (Heid *et al.*, 1996). La desnaturalización se realiza aproximadamente a 95°C y la separación permitirá que cada hebra sirva como molde o templado (ADN blanco) para la síntesis de una nueva molécula de ADN. El tiempo de desnaturalización depende del largo del ADN molde, y dura entre 30 segundos y 1 minuto. Debido a que al comienzo de la amplificación es necesario separar todo el ADN de la muestra analizada, inicialmente se realiza una incubación a 95°C por una sola vez (Mullis y Faloona, 1987).

Después de la desnaturalización sigue la etapa de alineamiento entre el ADN templado y los cebadores, a continuación se producirá la hibridación, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura entre 50-60 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento (Poitras y Houde, 2002). Los puentes de hidrogeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador y la sonda son muy similares a la secuencia del ADN molde (Gibson *et al.*, 1996). La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN; esta enzima unirá nucleótidos libres en forma complementaria a la secuencia del templado. De esta forma el segmento será amplificado en forma exponencial.

El elemento más crítico de la amplificación por PCR es el alineamiento. Dado que este fenómeno se basa en la complementariedad entre las bases nitrogenadas del

templado, del cebador y la sonda, ésta es una unión que puede ser alterada por varios factores, entre otros la temperatura.

Otra parte primordial que es necesario probar es la especificidad de la sonda; La especificidad es la capacidad de un ensayo para distinguir al ADN problema de entre otros ADN de organismos muy cercanos. La manera de determinar si una técnica es específica es cuando esta diferencia patógenos estrechamente relacionados mediante la prueba en cuestión (Schneider *et al.*, 2004).

En este capítulo se describe el establecimiento de los parámetros básicos para la reacción de PCR como son la temperatura de hibridación-alineación, la linealidad y la sensibilidad, por último se determinó si la sonda LYgroEL es específica para detectar al fitoplasma del amarillamiento letal.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Determinación de la temperatura de alineación

Para determinar la temperatura amplificación-hibridación en la cual se llevó a cabo la PCR-tiempo real con la Sonda TaqMan LYgroEL, se revisaron protocolos reportados del sistema TaqMan y en base a estos se eligieron las temperaturas para ello se elaboró un gradiente de temperaturas en la máquina de PCR las cuales fueron de 58°C, 61°C; y 64 °C, la mezcla de reacción se preparó con un volumen final de 25 µL y contenía 2 µL de un extracto de ADN positivo a fitoplasma de AL; Se utilizó el amortiguador TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 µL de la mezcla de los cebadores (900 nM) 5'-CTACTACTGCAACTGTTTTAGCTCAGT-3' Secuencia sentido y 5' AATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTT-3' (900 nM) secuencia antisentido y sonda 5'-FAM CCGGATTCAACAAATTT-NFQ-3'(250 nM). La amplificación y la detección se obtuvieron al utilizar el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD, EUA).

3.2.2. Determinación de la correlación lineal y sensibilidad

La correlación lineal se establece a través de graficar el Ct de diferentes cantidades de ADN contra el logaritmo negativo de dichas cantidades; Para determinar la correlación de la sonda TaqMan LYgroEL se realizó una serie de diluciones de ADN de palmas

positivas a fitoplasmas de AL, se tomó como cantidad inicial 300 ng de un extracto de ADN positivo a fitoplasma de AL, el cual fue cuantificado por medio de espectrofotometría a 260/280 nm(DU6). Se diluyó el concentrado inicial de 300 ng con agua grado PCR para obtener diluciones en el orden de 30 ng (10^{-1}); 3 ng (10^{-2}); 0.3 ng (10^{-3}); 0.03 ng (10^{-4}); 0.003 ng (10^{-5}) y 0.0003 ng (10^{-6}). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas en un volumen final de 25 μ L que contenía 2 μ L de la dilución de ADN. Se utilizó el amortiguador TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 μ L de la mezcla de los cebadores (900 nM) 5'-CTACTACTGCAACTGTTTTAGCTCAGT-3' Secuencia sentido y 5'-AATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTT-3' (900 nM) secuencia antisentido y sonda 5'-FAM-CCGGATTCAACAAATTT-NFQ-3' (250 nM). La amplificación y la detección se realizaron en el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD, EUA). El programa utilizado consistió de: 2 min a 50°C para activar la AmpErase UNG (Applied Biosystems) la cual previene la amplificación de ADN previamente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos 15 s at 95 °C y 60 s a 61°C para la alineación-extensión.

3.2.3. Determinación de especificidad

Para la determinación de la especificidad de la reacción se tomaron extractos de ADN de diversos tipos de fitoplasmas estos fueron los siguientes: *Ca. Phytoplasma ulmi*. Amarillamiento del olmo (EY), Viriscencia mexicana de la vicaria (MPV), Petalo-verde de la fresa (SGP), *Ca. Phytoplasma ziziphi*. Jajubi escoba de bruja (JMB), Durazno del oeste X (PWX), *Ca. Phytoplasma cocostanzaniae*. Declinamiento letal de Tanzania (TLD), *Ca. Phytoplasma cynodontis*. Hoja blanca de pasto Bermuda (BGWL), Amarillamiento del fresno (Ash Yellows, ASHY), Virescencia transmitida por insectos (BLTVA), Escoba de bruja del gandul (PPWB), *Ca. Phytoplasma palmae*. 'Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado Florida, E.U.), '*Ca. Phytoplasma palmae*' Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado, Yucatán, Mexico), '*Ca. Phytoplasma palmae*'. Amarillamiento letal del cocotero, LY, Aislado Republica Dominicana) y ADN de palma sana.

La mezcla de la reacción para la PCR contenía 2 μ L del extracto de ADN; se utilizó el amortiguador TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 μ L de la mezcla de los cebadores (900 nM) 5'-CTACTACTGCAACTGTTTTAGCTCAGT-3' Secuencia sentido y 5'-AATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTT-3' (900 nM) secuencia antisentido y sonda 5'-FAM-CCGGATTCAACAAATTT-NFQ-3' (250 nM). El

volumen final fue de 25 μ L. La amplificación y la detección se obtuvieron en el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD, EUA). Con el siguiente programa: 2 min a 50°C para activar la AmpErase UNG (Applied Biosystems) la cual previene la amplificación de ADN previamente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos 15 s at 95 °C y 60 s a 61°C para la alineación-extensión.

3.3 Resultados

3.3.1 Determinación de la temperatura de hibridación

La temperatura de hibridación de la PCR- tiempo real que se seleccionó fue de 61°C debido a que con esta temperatura se obtuvo el menor Ct que fue de 23 ciclos además mostró una curva sigmoidea en el caso de la temperaturas de 58°C su Ct fue de 25 y de 64°C el Ct fue de 27 los cuales fueron más tardíos y las curvas de PCR a estas temperaturas no se muestran claramente sigmoideas (figura 7). Por ello se decidió utilizar la temperatura a 61°C.

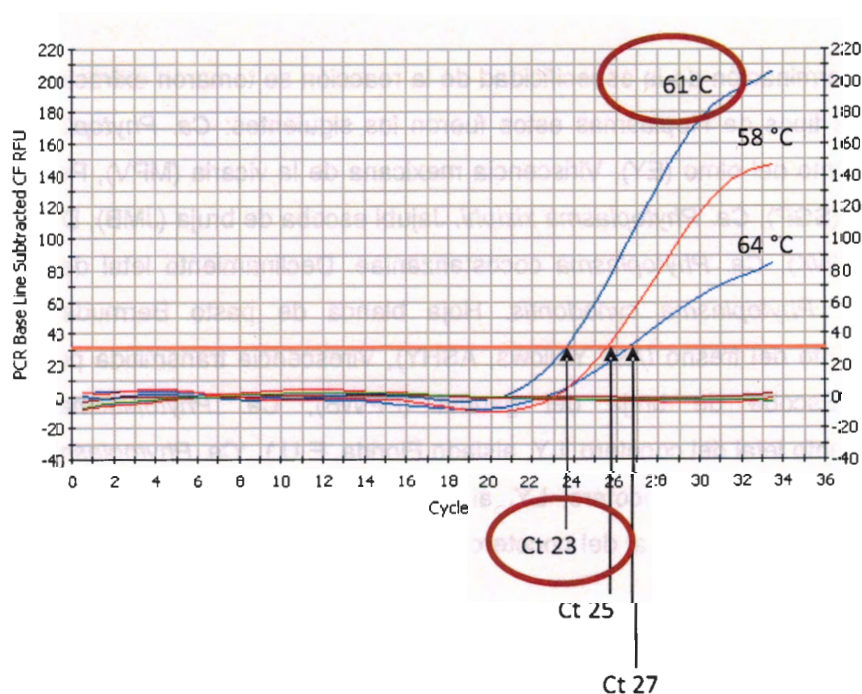


Figura 7. Curvas de Ct que presenta la PCR-tiempo real con temperaturas 58, 61 y 64 para seleccionar la temperatura óptima de alineamiento con la sonda TaqMan LYgroEL.

3.3.2 Correlación lineal

En la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.988 y la eficiencia de reacción fue de 100.5 % (figura 8) esto quiere decir que la PCR-tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL se lleva en perfectas condiciones.

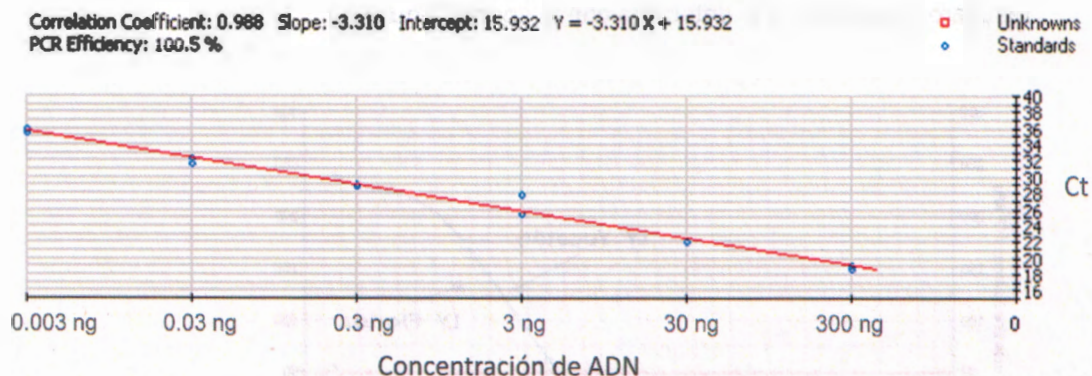


Figura 8. Grafica de la correlación lineal obtenida con el Ct contra el logaritmo de la cantidad de ADN.

3.3.3 Sensibilidad del sistema

Los resultados de la serie de diluciones mostraron una linealidad de 300 ng de ADN inicial a 0.003 ng de ADN final. El Ct máximo que mostró linealidad fue 36, por lo tanto se consideró que las muestras serán positivas cuando el Ct sea igual o menor a 36 ciclos. Las muestras después de este Ct serán consideradas negativas.

3.3.4 Especificidad de la sonda TaqMan LYgroEL.

La especificidad de los oligonucleótidos y sondas fueron evaluadas con 13 extractos de ADN de plantas infectadas, cepas de fitoplasmas de: '*Ca. Phytoplasma ulmi*', Viriscencia mexicana de la vicaria, Petalo-verde de la fresa, '*Ca. Phytoplasma ziziphi*', Durazno del oeste X, '*Ca. Phytoplasma cocostanzaniae*', '*Ca. Phytoplasma cynodontis*', Amarillamiento del fresno, Virescencia transmitida por insectos, Escoba de bruja del gandul y '*Ca. Phytoplasma palmae*' (aislado de Florida, Yucatán y Republica dominicana). La mayoría de los extractos de ADN provenían de plantas infectadas de *Catharanthus roseus* a excepción del '*Ca. Phytoplasma palmae*' y '*Ca.*

Phytoplasma Cocostanzaniae' que provenía de extractos de palmas de cocotero (cuadro 7).

En la especificidad de la sonda TaqMan LYgroEL se observó que los únicos fitoplasmas que amplificaron fueron fitoplasmas de LY, aislado de Yucatán, México y LY, aislado de Florida, E.U. con un Ct de 21 y 22 respectivamente, los demás aislados resultaron negativos a la detección con la sonda (Figura 9.)

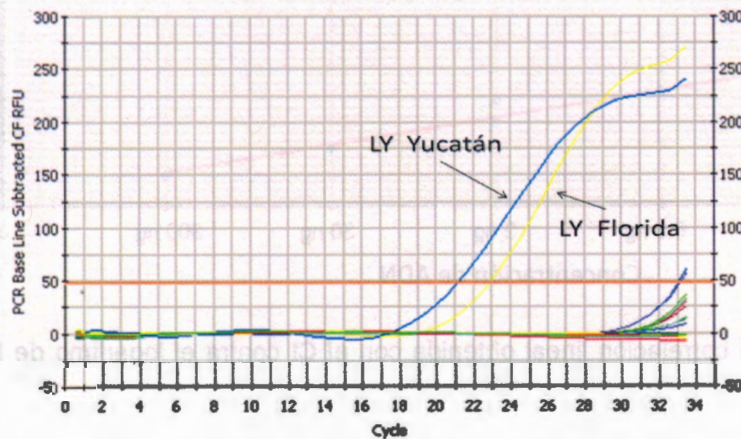


Figura 9. Ensayo de especificidad de la sonda TaqMan LYgroEL con los diversos fitoplasmas.

Cuadro 7. Detección de fitoplasmas de diferentes aislados, por PCR anidado y PCR en Tiempo Real utilizando la sonda y los oligonucleótidos diseñados en el presente estudio.

Cepa de fitoplasma	PCR-anidada usando oligonucleótidos P1/P7- R16f2/R16r2	PCR en tiempo real usando la sonda TaqMan LYgroEL
<i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> . Amarillamiento del olmo (Elm Yellow, EY)	+	-
Viriscencia mexicana de la vicaria (Mexican Periwinkle virescence, MPV)	+	-
Petalo-verde de la fresa (Strawberry green-petal, SGP)	+	-
<i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> . Jajubi escoba de bruja (Jujube witches's broom, JMB)	+	-
Durazno del oeste X (Peach western X, PWX)	+	-
<i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> . Declinamiento letal de Tanzania (Tanzania lethal decline coconut, TLD)	+	-
<i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> . Hoja blanca de pasto Bermuda (Bermuda grass white leaf, BGWL).	+	-
Amarillamiento del fresno (Ash Yellows, ASHY)	+	-
Virosencia transmitida por insectos (Beet leafhopper-transmitted virescence agent, BLTVA)	+	-
Escoba de bruja del gandul (Pigeon pea witches's broom, PPWB)	+	-
' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> . Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado de Florida, E.U.	+	+
' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> ' Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado de Yucatán, México.	+	+
' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> '. Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado de República Dominicana.	+	+
Palma de cocotero sana	-	-

3.4 Discusión

La PCR en tiempo real es una técnica que nos permite detectar y cuantificar patógenos. Para hacerlo es necesaria la optimización de algunos parámetros principalmente la temperatura de alineación-extensión. En este caso 61°C fue óptima para la amplificación del fitoplasma del AL usando una sonda TaqMan para el gen *groEL*. Esta temperatura permitió realizar la amplificación eficiente del ADN del fitoplasma del AL. En la estandarización de esta técnica la linealidad obtenida generó una eficiencia de 100.5 % y un coeficiente de correlación de 0.988. Esto significa que por cada ciclo de reacción la PCR se está duplicando exponencialmente y cuando se grafica el logaritmo negativo de la cantidad de ADN por cada ciclo, se produce una línea recta, la eficiencia de 100.5 cae dentro de los parámetros aceptables debido a que siempre existe cierta inespecificidad. En cuanto a la sensibilidad de nuestro sistema con la sonda LYgroEL se observó detección positiva hasta la dilución 10^{-5} (0.003 ng.) es decir en el ciclo numero 35. Una mayor dilución mostró una correlación lineal baja.

Cuando se comparan estos parámetros con descritos en otros estudios, como en el caso de un trabajo en el que se implementó una técnica de PCR tiempo real para cuantificar fitoplasmas de AL con SYBR Green, los resultados indicaron una correlación lineal de 0.99 y una eficiencia del 102% y la sensibilidad se observó hasta la dilución 10^{-4} (Collí, 2007). En otro estudio realizado con sondas TaqMan a fitoplasmas que se encontraban en *Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima* la sensibilidad que se observó, alcanzó hasta la dilución 10^{-5} con un coeficiente de correlación de 0.99; el diseño de su sonda resulto ser específica (Hren *et al.*, 2007).

En otro estudio que se realizó para la detección de fitoplasmas que afectan a la manzana se determinó que su eficiencia fue de 0.998 y la sensibilidad se logró hasta la dilución 10^{-7} (Torres *et al.*, 2005). En un estudio realizado para detectar fitoplasmas del AL en embriones de cocotero con una sonda TaqMan se observó una linealidad de 0.993 y una eficiencia de 104%; esta sonda detectó al fitoplasma de amarillamiento letal (Puch Hau, 2010).

Por otro lado cuando se determinó la especificidad de la sonda probando diferentes cepas de fitoplasmas, se observó que nuestra sonda solo detectó al fitoplasma del amarillamiento letal, aislado en Yucatán, México y el fitoplasma del LY, aislado en

Florida, E.U. básicamente se trata del mismo tipo fitoplasma, y No se observó detección de ningún otro fitoplasma estudiado. Dicho resultado permite concluir que nuestra sonda es específica para la detección del fitoplasma causante del AL en cocotero.

3.5. Referencias bibliográficas

- Collí, A., (2007), Implementación de un técnica de PCR en tiempo real para cuantificación relativa del fitoplasma asociado al amarillamiento letal tesis licenciatura, ITSSY, Yucatán, México.
- Gibson U., C. Heid, P. Williams (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995-1001.
- Heid, CA., J. Stevens, KJ. Livak y P M. Williams (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-94.
- Hren, M., J. Boben, A. Rotter, P. Kralj, K. Gruden y M. Ravnikar (2007). Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasma in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56: 785–796.
- Moretti, T., B. Koons y B. Budowle (1998). Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques*, 25:71 6-22.
- Mullis, K. y F. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalized chain reaction chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- Poitras E. y A. Houde (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2), 2-11.
- Puch Hau, C. (2010). Implemento de la técnica de PCR tiempo real usando TaqMan para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal tesis de licenciatura,. Yucatán, México.
- Schneider, WL., D. Sherman, A. Stone, V. Damsteegt y R. Frederick (2004). Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97–101

CAPÍTULO IV: COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD POR PCR-ANIDADO Y PCR-TIEMPO REAL

4.1 Introducción

El amarillamiento letal es una enfermedad que afecta al cocotero, y que ha causado importantes pérdidas económicas en todo el mundo, por tal motivo se han implementado técnicas cada vez más sensibles para la detección y control en la diseminación de esta enfermedad. La PCR anidada es la técnica más popular para la detección del fitoplasma del AL, se ha visto que en ciertas condiciones permite un diagnóstico confiable aún en las etapas iniciales de la enfermedad es decir antes de la manifestación de síntomas en la planta (Harasawa, 1996),

Otra ventaja de la PCR anidada, es que la segunda ronda de PCR sirve para confirmar la especificidad de la primera ronda. Aunque este sistema de PCR puede incrementar los riesgos de contaminación cruzada debido a su alta manipulación, el riesgo puede minimizarse si se aplican las buenas prácticas de laboratorio y si ambas amplificaciones se realizan con diferentes juegos de pipetas. No obstante sus ventajas tiene desventajas que limitan su aplicación la técnica es tardada, y los productos solamente se pueden visualizar en geles de agarosa. Una técnica de reciente introducción para la detección de fitoplasmas es la PCR en tiempo real, la cual, tiene varias ventajas sobre otras técnicas de detección, su relativa facilidad, así como la rapidez en la obtención de resultados, los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR (Gachon *et al.*, 2004), además ha demostrado ser más sensible que la PCR anidada (Christensen *et al.*, 2004).

En este capítulo se describe la comparación en el límite de la detección entre la técnica de PCR anidada que es con la que actualmente se determina la presencia de fitoplasma del AL en cocotero y la PCR en tiempo real usando la sonda TaqMan LYgroEL.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Extracción de ADN.

El ADN se extrajo de tronco y hojas de palmas que presentaban síntomas típicos de AL (según la escala de Mc Coy 1983), las muestras se recolectaron de distintas localidades del estado de Yucatán; el material biológico se colocó en bolsas de nylon etiquetadas y se transportó al laboratorio. En el laboratorio se aisló el ADN de las muestra utilizando el protocolo de CTAB (20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 2-mercaptoethanol en agua estéril) a 65°C por 1 hora de acuerdo a Harrison *et al*, (1994). El ADN se precipitó con etanol, y se centrifugó. La pastilla fue resuspendida en 100 µl de amortiguador TE (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8) e incubado con RNasa por 1 hora a 37°C. Para hacer precisa la comparación se cuantificó el ADN de las palmas infectadas por fluorometría. El ADN obtenido fue cuantificado usando el estuche Fluorescent DNA Quantitation (BIO-RAD, EUA) y las mediciones se realizaron en flurómetro VersaFluor (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 100 ng de ADN por palma.

4.2.2 Serie de diluciones de ADN

La sensibilidad se determinó utilizando una serie de diluciones de ADN en agua ultra pura grado PCR, la dilución inicial contenía 300 ng de ADN total de la planta, de esta concentración se tomó una alícuota para hacer la segunda dilución con una concentración de 30 ng, se realizó una tercera dilución de 3 ng y así sucesivamente hasta alcanzar una concentración de 0.003 ng.

4.2.3 PCR anidado convencional

El análisis de PCR anidado convencional para detectar al 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal se realizó de la siguiente manera: la reacción de PCR anidada consistió de dos rondas de amplificación. En la primera ronda se adicionó un par de cebadores universales P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996). Con los siguientes parámetros: desnaturalización por 60 s a 94 °C; 35 ciclos de alineamiento a 54 °C por 50 s y extensión a 72 °C durante 80 s (10 min para la extensión final). En la segunda ronda de amplificación se realizó una dilución 1:40 en agua destilada estéril del primer producto de amplificación utilizando un par de

cebadores específicos para el 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal LY503f/LY16Sr (Harrison *et al.*, 2002).

Para la reacción de anidado se utilizó una: desnaturalización por 30 s a 94°C; 35 ciclos de alineamiento a 60 °C por 50 s y extensión a 72 °C durante 80 s (10 min para la extensión final). En todos los ensayos de PCR se incluyeron un control positivo que consistió en ADN de una palma infectada y el control negativo que fue agua estéril. En ambos casos de amplificación se utilizó 1.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, E.U), amortiguador SuperMix (Invitrogen), 400 nM de cada cebador, 200 µM de dNTPs y 2.0 mM de MgCl₂. Al final de la segunda reacción se tomó una alícuota de (10 µl) de las muestras amplificadas y se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de UV. Los geles fueron fotografiados con una cámara KODAK utilizando el programa EDAS.

4.2.4 PCR en tiempo real

El análisis de PCR en tiempo real para detectar al 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal se realizó de la siguiente manera: Se utilizó el amortiguador TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 µL de la mezcla de los cebadores (900 nM) 5'-CTACTACTGCAACTGTTTTAGCTCAGT-3' Secuencia sentido y 5'-AATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTT-3' (900 nM) secuencia antisentido y sonda 5'-FAM-CCGGATTCAACAAATTT-NFQ-3' (250 nM). La amplificación y la detección se obtuvieron al utilizar el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD, EUA). Con el siguiente programa: 2 min a 50°C para activar la AmpErase UNG (Applied Biosystems) la cual previene la amplificación de ADN previamente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos 15 s at 95 °C y 60 s a 61°C para la alineación-extensión.

4.3 Resultados

Se comparó la sensibilidad de cinco muestras de palma con sus respectivas series de diluciones de 300 ng, 30 ng, 3 ng, 0.3 ng, y 0.03 ng por ambas técnicas de PCR tiempo real y PCR anidado (cuadro 8). Se observó, que por PCR tiempo real la muestra palma-1 se detectó hasta la dilución con 0.3 ng con un Ct de 35, el PCR anidado no mostró detección a esa dilución. En la muestra palma-2 se observó que tanto la PCR-tiempo real (Ct 35.9) como PCR anidado se detectó amplificación a la misma dilución 0.3 ng después de esta dilución la detección fue negativa. La muestra palma-3 por PCR-tiempo real fue positiva hasta la dilución 0.3 ng con un Ct de 36 las demás diluciones no pudieron ser detectadas en esta técnica, al igual que en PCR-anidado solo pudo ser positiva hasta esta dilución de 0.3 y las demás diluciones fueron negativas. En la muestra palma-4 se detectó el ADN de fitoplasma a la concentración 0.3 con un Ct de 37.1, al igual que PCR-anidado después de esta concentración la detección fue negativa. En la muestra palma-5 por PCR-tiempo real se detectó hasta la dilución 0.003 ng y por PCR-anidado se detectó hasta la dilución 0.3 ng. Las demás diluciones no fueron detectadas por esta técnica.

Cuadro 8. Comparación de la sensibilidad entre las técnicas de PCR-tiempo real y la PCR-anidada en cinco muestras de palmas con sus respectivas serie de diluciones, M son los marcadores de tamaño molecular y E la eficiencia del sistema TaqMan.

MUESTRA	ANALISIS	DILUCION (ng)							Blanco	E
		M	300 10 ⁻⁰	30 10 ⁻¹	3 10 ⁻²	0.3 10 ⁻³	0.03 10 ⁻⁴	0.003 10 ⁻⁵		
Palma-1 (tronco)	PCR-tiempo real (Ct)		25.4	29.1	31.8	35	-	-	-	103
	PCR-anidado									
Palma-2 (tronco)	PCR-tiempo real (Ct)		21.3	28.8	32.1		36.9	-	-	100
	PCR-anidado									
Palma-3 (tronco)	PCR-tiempo real (Ct)		25.5	28.6	32	36	-	-	-	90
	PCR-anidado									
Palma-4 (hoja)	PCR-tiempo real (Ct)		27	29.8	33.7	37.1	-	-	-	103
	PCR-anidado									
Palma-5 (tronco)	PCR-tiempo real (Ct)		21.5	23.2	27.2	30.9	35.8	37.9	-	90
	PCR-anidado									

4.4 Discusión

De las cinco muestras de ADN total de palma de *Cocos nucifera* analizadas para detectar al 'Ca *Phytoplasma palmae*' con la técnica de PCR- tiempo real y PCR-anidado con el fin de comparar la sensibilidad de ambas técnicas, se realizaron una serie de diluciones. Se observó que en las muestras palma-1 y palma-2 la técnica de PCR-tiempo real fue más sensible que la PCR-anidada al detectar una concentración diez veces más diluida, en las muestras palma-3 y palma-4 ambas técnicas muestran la misma sensibilidad de detección, en la muestra palma-5 la PCR-tiempo real fue más sensible al detectar una concentración 100 veces menor en comparación con la PCR-anidada.

Se observó que en la dilución 300 ng, 30 ng y 3 ng de las cinco muestras, ambas técnicas tuvieron la misma sensibilidad, es decir, las cinco muestras analizadas fueron positivas a AL, a partir de la dilución 0.3 ng es cuando la PCR-tiempo real con la sonda LYgroEL supera a la PCR-anidada, debido que con la técnica en tiempo real se detecta las cinco muestras con esa dilución, y con la PCR anidada en esta misma dilución de 0.3 ng solo detecta tres muestras de las cinco palmas analizadas; a partir de la dilución 0.03 ng y 0.003 ng solo la PCR tiempo real detecta al fitoplasma, en la dilución 0.03 ng se detectan dos muestras la palma 2 y 5 es decir dos muestras de un total de cinco que se analizaron y en la dilución 0.003 ng se detecta la muestra de palma 5, es decir, se detecta una muestra de las cinco analizadas. Estos datos sugieren que es más sensible el PCR tiempo real con la sonda TaqMan que la PCR anidada utilizada para la detección de fitoplasma del AL.

En un estudio realizado para detectar fitoplasmas del grupo 16SrVI, 16SrI y 6SrIX, se extrajo el ADN de plantas infectadas y se realizaron las respectivas diluciones del ADN, las diluciones fueron de 5 pg, 50 pg y 500 pg. Estas se analizaron por PCR-anidado y PCR-tiempo real para determinar la sensibilidad entre ambas técnicas, PCR-anidado pudo detectar fitoplasmas a una concentración de 500 ng pero no detectó fitoplasmas a concentraciones de 50 ng, a diferencia de la PCR- tiempo real que si detectó fitoplasmas en concentraciones de 50 ng. Crosslin et al. concluyeron que había distribución irregular en la cantidad de fitoplasmas en cada dilución y que la PCR tiempo real era más sensible al detectar fitoplasmas a concentraciones más bajas (Crosslin et al., 2006).

En un estudio donde se comparó la PCR en tiempo real y la PCR anidada para la detección de fitoplasmas, se tomaron muestras en plantas de vid y vicaria. La sensibilidad entre la PCR-anidada y PCR tiempo real fue la misma, sin embargo cuando se analizaron 450 muestras de plantas de vid con síntomas de fitoplasmas, se determinó que la técnica en tiempo real PCR era más ventajosa en cuanto al procesamiento de la muestra y la obtención de resultados que el método de PCR anidado (Olivier *et al.*, 2009).

En un trabajo reportado en el cual se detectan dos diferentes tipos de fitoplasmas que afectan a la uva, se comparó la sensibilidad entre las técnicas de PCR tiempo real y el anidado, después de la extracción del ADN de las plantas se realizó una serie de diluciones, por separado trataron de detectar a estos fitoplasmas que afectan al cultivo. Los resultados de sensibilidad que se obtuvieron al detectar al fitoplasma causante de Bois noir con las técnicas de PCR tiempo real y PCR-anidado resultó ser la misma (dilución 10^{-6}) y al analizar con ambas técnicas al otro tipo de fitoplasma causante de Flavescence dorée se observó que la PCR-tiempo real resultaba ser más sensible al detectar tres diluciones menores (de 10^{-4} hasta 10^{-7}) que PCR-anidado no pudo detectar. En este trabajo se concluyó que PCR tiempo real resultaba ser más sensible que anidado (Hren *et al.*, 2007).

En un estudio realizado para detectar al fitoplasma del amarillamiento letal, se comparó la sensibilidad entre la PCR-anidado y la PCR-tiempo real usando una sonda TaqMan diseñada para el gen 16S, fueron tomadas 10 muestras de palmas de cocotero positivas al fitoplasma del AL, la concentración de ADN de estas muestras fueron diluidas logarítmicamente, los resultados indicaron que 7 muestras de palmas fueron positivas por PCR tiempo real en una dilución menor que no pudo ser detectada por PCR-anidado. Por lo que se concluyó en este trabajo que es más sensible la técnica en tiempo real (Puch Hau, 2010).

Hasta ahora en otros estudios en donde se comparan ambas técnicas también han tenido comportamiento similar en algunas muestras la PCR-anidado y la PCR-tiempo real son igual de sensibles, pero en otros el tiempo real supera al anidado, el motivo podría ser a la distribución irregular del fitoplasma dentro de la planta hospedera y a la baja concentración en la que se encuentra con respecto al ADN total de la palma.

En todo caso que la técnica de anidado sea igual de sensible que la PCR-tiempo real, esta última presenta otras ventajas al ser una técnica rápida puesto que no requiere de dos pasos de amplificación lo que a su vez disminuye el riesgo de los falsos positivos debido que tiene menos probabilidad de contaminación, y en caso que se necesite puede ser una técnica cuantitativa. El hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente pueda estar limitando el proceso de amplificación.

En nuestro trabajo para detectar el AL en cocotero utilizando la PCR-tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL, se concluye con los resultados obtenidos que es más sensible que la técnica convencional para detectar dicho fitoplasma.

4.5 Referencias bibliográficas

- Bertaccini, A., L. Mitterpergher y N. Vibio (1996). Identification of phytoplasmas associated with a decline of European hackberry (*Celtis australis*). The Annals of Applied Biology, 128: 245–253.
- Boudon-Padieu, E. (2005). Phytoplasmas associated to grapevine yellows and potential vectors. Bulletin de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 79: 299–320, 2005.
- Crosslin, J., G. J. Vandemark y J. E. Munyaneza (2006). Development of a Real-Time, Quantitative PCR for Detection of the Columbia Basin Potato Purple Top Phytoplasma in Plants and Beet Leafhoppers. Plant Disease, 90:663-667.
- Deng S., Hiruki C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiological Methods, 14: 53–61.
- Harasawa, R., Lefkowitz, E. J., Glass, J. I. & Cassell, G. H. (1996). Phylogenetic analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of the genus *Ureaplasma*. Journal of Veterinary Medical Science., 8, 191–195
- Harrison NA, Narváez M, Almeyda H, Cordova I, Carpio ML and Oropeza C (2002). First report of group 16 SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of México. New Disease Report, 5:1-2.
- Hayden, R., K. Hokanson, S. Pounds, M. Bankowski, S. Belzer, J. Carr, D. Diorio, M. Forman, Y. Joshi y D. Hillyard, (2008). Multicenter Comparison of Different Real-Time PCR Assays for Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus. Juornal Clinical of Microbiology, 46(1): 157 - 163.
- Heid, C., J. Stevens, K. Livak y P. Williams (1996). Real time quantitative PCR. Genome Reseach., 6: 986-94.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger y R. Watson (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (NY), 11(9):1026-30.
- Hren, M., J. Boben, A. Rotter, P. Kralj, K. Gruden y M. Ravnikar (2007). Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasma in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. Plant Pathology, 56: 785–796.
- McCoy, RE. Howard, FW. Tsai, JH. Donselman, HM. Thomas, DL. Basham, HG. Atilano, RA. Eskafi, FM. Britt, ME. Collins, (1983). Lethal yellowing of palms. Univ Florida Agric. Exp. Sta. Bull. No 834 pp. 100.

- Olivier, C., D. Lowery y L. Stobbs (2009). Phytoplasma Diseases and their Relationships with Insect and Plant Hosts in Canadian Horticultural and Field Crops. *The Canadian Entomologist* September: Vol. 141(5), 425-462.
- Puch Hau, C. (2010). Implementación de la técnica de PCR tiempo real usando TaqMan para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento tesis de licenciatura, letal. Yucatán, México.
- Smart, C., B. Schneider, C. Blomquist, L. Guerra, N. Harrison, U. Ahrens, K. Lorenz, E. Seemuller y B. Kirkpatrick (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8) 2988-2993.

CAPÍTULO V: DETECCIÓN DE FITOPLASMAS DE AL EN EMBRIONES E INSECTOS

5.1 Introducción

Los fitoplasmas son microorganismos patógenos de plantas que causan enfermedades devastadoras en varios cultivos en todo el mundo (Bertaccini, 2007; Firrao *et al.*, 2005). Son parásitos obligados que se encuentran restringidos en los tejidos del floema de la planta huésped, una forma de transmisión de una planta a otra es por insectos vectores comúnmente conocidos como chicharritas (*Hemiptera: Cicadellidae*). Los fitoplasmas se reproducen en los tejidos de sus insectos vectores y se transfieren por las secreciones salivales a nuevas plantas hospederas durante la alimentación (Alma *et al.*, 1997).

Un ejemplo es el insecto *Matsumuratettix hiroglyphicus* (comúnmente conocido como Matsumura) se ha probado que es un vector que transmite al fitoplasma que causa la hoja blanca en la caña de azúcar, pero se cree que no es el único vector por esta razón se han hecho investigaciones para hallar otros supuestos vectores, conocer los vectores es fundamental para mantener a la enfermedad bajo control, se ha visto que existe una correlación entre la incidencia de la enfermedad y su vector (Hanboonsong *et al.*, 2002).

En cocotero se tienen estudios que indican que el fitoplasma de AL es transmitido por *Myndus crudus*, pero en la mayoría de las ocasiones se tienen porcentajes bajos en cuanto a insectos que son positivo al fitoplasma, se cree que una de las causas podría ser la sensibilidad de la técnica que no lo puede detectar por encontrarse en títulos bajos.

Por otro lado, existen también otras formas de transmisión de fitoplasmas estas pueden ser por injertos o propagación vegetativa (Kirkpatrick, 1992), aunque en algunos estudios se rechaza la transmisión por medio de semillas, también existen reportes donde se describen la detección del fitoplasma en semilla (Córdova *et al.*, 2003; Olivier, 2008; Oropeza *et al.*, 2010). Para el intercambio libre de germoplasma se recomienda la transferencia de embriones en lugar de las semillas intactas para reducir la posibilidad de introducir material infectado en áreas libres de enfermedades (FAO/IPGRI). En cocotero se han hecho estudios donde se han detectado fitoplasmas

en embriones y sería un serio problema si se intercambia un germoplasma contaminado con fitoplasma (Córdova *et al.*, 2003).

Por ello resulta necesario tener un método más sensible para la detección de fitoplasmas de AL. La técnica de PCR-anidado ha sido utilizada para la detección de fitoplasmas en distintas partes de la planta y en insectos (Vásquez, 2010). Por lo que en esta sección se analizaron embriones e insectos por medio de la PCR-tiempo real utilizando la sonda TaqMan LYgroEL y la PCR- anidado al mismo tiempo para detectar la presencia de fitoplasma de AL.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1. material biológico

5.2.1.1. Embriones de *C. nucifera*

El material vegetal se recolectó en la localidad de San Crisanto y en el estado de Tabasco, se tomaron frutos de palma de *C. nucifera*, se eligieron palmas sanas y palmas que presentaban síntomas de AL; con un sacabocado se extrajo la sección del endospermo en donde se localiza el embrión y se lavó con etanol al 70 %, con agua destilada y NaClO al 50% durante 20 minutos. Por último se lavó con agua esterilizada; las secciones de endospermo se almacenaron en bolsas de plástico etiquetadas y se refrigeraron hasta la extracción de ADN. Los extractos de ADN de los embriones se etiquetaron según la palma y su respectivo embrión.

Se analizaron 10 palmas enfermas y 128 embriones, los cuales se etiquetaron de la siguiente forma PE-2 con 12 embriones, PE-3 con 11 embriones, PE-4 con 11 embriones, PE-5 con 8 embriones, PE-6 con 8 embriones, PE-7 con 7 embriones, PE-8 con 47 embriones, PE-9 con 2 embriones, PE-10 con 2 embriones y PE-11 con 20 embriones. Además se recolectaron 2 palmas sanas con un total de 13 embriones, los cuales se etiquetaron de la siguiente forma ES-1, ES-2, ES-3, ES-4, ES-5, ES-6, ES-7, ES-8, ES-9, ES-10, ES-11, ES-12, ES-13, se realizó la PCR-anidada sobre el gen 18S para confirmar que se encontraban sanas.

5.2.1.2 Insectos *Myndus crudus*

Los insectos se recolectaron en los jardines del Centro de Investigación Científica de Yucatán y en el puerto de Chicxulub, los insectos recolectados en estas áreas se hallaron sobre palmas de *Cocos nucifera* y de *Thrinax radiata* infectadas con AL (diagnóstico por sintomatología). Los insectos se depositaron en un tubo falcón y algunos se conservaron vivos antes de la extracción del ADN, otros se congelaron por un lapso de 1 a 2 días hasta la extracción de ADN. En total se analizaron 137 insectos.

5.2.2 Extracción de ADN.

El ADN se aisló de las muestras utilizando el protocolo de CTAB (20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 2-mercaptoethanol en agua estéril) a 65°C por 1 hora de acuerdo a Harrison *et al.*, (1994). El ADN se precipitó con etanol, y se centrifugó. La pastilla fue resuspendida en 100 µl de amortiguador TE (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8) e incubado con RNAsa por 1 hora a 37°C. Después de la extracción del ADN se observó la integridad del mismo por electroforesis en un gel de agarosa y se visualizó en una cámara con UV (Sistema de documentación de geles Gel Doc XR de Bio-Rad).

Se realizó PCR-tiempo real con una sonda TaqMan para el gen 18S para verificar presencia de ADN y por otra parte para constatar que no existan inhibidores que afecten la técnica de PCR. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: desnaturalización 95°C durante 35 segundos, hibridación y extensión fue de 61 °C por 1 min. Por 40 ciclos. Se eligieron el ADN de embriones y de insectos analizados para el gen 18S que tenían un Ct menor o igual a 20 para analizar por PCR tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL. Estas mismas muestras de ADN fueron las que sirvieron para detectar fitoplasmas por PCR- anidado sobre el gen *groEL* y el gen 18S ARN ribosomal.

5.2.3 PCR anidado convencional

El análisis de PCR anidado para detectar al 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal se realizó de la siguiente manera: La reacción de PCR anidado consistió en dos rondas de amplificación. En la primera ronda se adicionó un par de cebadores universales P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996). Con los siguientes parámetros: desnaturalización por 60 s a 94°C; 35 ciclos de alineamiento a 54 °C por 50 s y extensión a 72 °C durante 80 s (10 min para la extensión final). En La segunda ronda de amplificación se realizó una dilución 1:40 en agua destilada estéril del primer producto de amplificación y se reamplifico utilizando un par de cebadores específicos para el 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal LY503f/LY16Sr (Harrison *et al.*, 2002).

Para la reacción de anidado se utilizaron los siguientes parámetros: desnaturalización por 30 s a 94°C; 35 ciclos de alineamiento a 60°C por 50 s y extensión a 72 °C

durante 80 s (10 min para la extensión final). En todos los ensayos de PCR se incluyeron el control positivo que consistió en ADN de una palma infectada y el control negativo que es agua estéril. En ambos casos de amplificación se utilizó 1.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, E.U), Amortiguador SuperMix (Invitrogen), 400 nM de cada cebador, 200 μ M de dNTPs y 2.0 mM de $MgCl_2$. Al final de la segunda reacción se tomó una alícuota de (10 μ l) de las muestras amplificadas y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, el cual se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un trasiluminador de UV. Los geles fueron fotografiados con una cámara KODAK utilizando el programa EDAS.

5.2.4 PCR en tiempo real

El análisis de PCR en tiempo real para detectar al '*Ca Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal se realizó de la siguiente manera: Se utilizó el amortiguador TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 μ L de la mezcla de los cebadores (900 nM) 5'-CTACTACTGCAACTGTTTGTAGCTCAGT-3' Secuencia sentido y 5'-AATTCCTTCTCTAAGCAGAACAGCTTT-3' (900 nM) secuencia antisentido y sonda 5'-FAM-CCGGATTCAACAAATTT-NFQ-3' (250 nM). La amplificación y la detección se obtuvieron al utilizar el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD, EUA). Con el siguiente programa: 2 min a 50°C para activar la AmpErase UNG (Applied Biosystems) la cual previene la amplificación de ADN previamente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos 15 s at 95 °C y 60 s a 61°C para la alineación-extensión.

5.3 Resultados

5.3.1 Detección de AL en embriones

Se realizó la técnica de PCR- tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL a muestras de embriones; a estas mismas muestras ya se les había realizado la PCR-anidada sobre el gen groEL para detectar AL. Las 128 muestras de embriones analizadas con la sonda TaqMan LYgroEL presentaron Cts con un rango de 24 a 35 ciclos.

Los embriones que presentaron un valor mayor a 36 Cts fueron tomados como negativos al fitoplasma del AL, de igual manera se tomaron como negativos los valores de los embriones que por default presenta el programa del equipo (PCR tiempo real

C100™ thermal Cycler). Mediante el análisis de punto final, para distinguir una muestra positiva y una negativa el programa las compara y toma como positivas aquellas que presentan puntos finales superiores o igual al patrón negativo. Los resultados se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro 9. Embriones de palmas enfermas de amarillamiento letal analizadas por medio de PCR-tiempo real utilizando la sonda LYgroEL.

EMBRIONES ANALIZADOS POR PCR-TIEMPO REAL CON LA SONDA LYgroEL										
PALMA ENFERMA	PE-2	PE-3	PE-4	PE-5	PE-6	PE-7	PE-8	PE-9	PE-10	PE-11
EMBRIONES POR PALMA	12	11	11	8	8	7	47	2	2	20
EMBRIONES NEGATIVOS	2	1	0	4	2	0	7	0	0	0
EMBRIONES POSITIVOS	10	10	11	4	6	7	40	2	2	20

Comparando los resultados del análisis hecho a embriones con la sonda LYgroEL con los de otras técnicas, las cuales detectan también al fitoplasma *Ca. Phytoplasma palmae* dio los siguientes resultados: para un total de 128 embriones se detectaron 16 negativos y 112 positivos por medio de la técnica de PCR- tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL, esto equivale al 88 % de positivos. Con la técnica PCR- anidado sobre el gen *groEL* 118 resultaron negativos y 10 resultaron positivos lo que equivale al 8%. Por medio de la técnica PCR-anidado sobre el gen 16S los 128 embriones analizados resultaron negativos (cuadro 10).

Cuadro 10. Detección de AL en embriones de cocotero por medio de PCR-anidado que amplifica sobre el gen *groEL* y el gen *16S* y PCR-tiempo real sobre el gen *groEL*.

DETECCIÓN DE AL POR DIVERSAS TÉCNICAS						
TÉCNICA DE ANÁLISIS	PCR-TIEMPO REAL gen <i>groEL</i>		PCR-ANIDADO gen <i>groEL</i>		PCR-ANIDADO gen <i>16S</i>	
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje
EMBRIONES ANALIZADOS	128	100	128	100	128	100
EMBRIONES NEGATIVOS	16	12	118	92	128	100
EMBRIONES POSITIVOS	112	88	10	8	0	0

También se realizó el análisis a embriones de palmas sanas para observar el comportamiento de la sonda TaqMan LYgroEL y de esta forma evitar que los resultados sean falsos positivos, como se esperaba, estas palmas obtuvieron Cts arriba de 39 ciclos, por lo cual todas estas palmas sanas resultaron ser negativas al fitoplasma *Ca. Phytoplasma palmae* (Cuadro 11).

Cuadro 11. Detección de AL en embriones de cocotero sanos con técnicas de PCR-anidado que amplifica sobre el gen *groEL* y el gen *16S* y PCR-tiempo real sobre el gen *groEL*.

DETECCIÓN DE AL POR DIVERSAS TÉCNICAS						
TÉCNICA DE ANÁLISIS	PCR-TIEMPO REAL gen <i>groEL</i>		PCR-ANIDADO gen <i>groEL</i>		PCR-ANIDADO gen <i>16S</i>	
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje
EMBRIONES ANALIZADOS	13	100	13	100	13	100
EMBRIONES NEGATIVOS	13	100	13	100	13	100
EMBRIONES POSITIVOS	0	0	0	0	0	0

5.3.2 Detección de AL en muestras de insectos

Se recolectaron *Myndus crudus* en una zona con presencia del AL, de los 137 insectos analizados para detectar al fitoplasma *Ca. Phytoplasma palmae*, por medio de PCR tiempo real usando la sonda LYgroEL, 133 resultaron negativos esto equivale a un 97% y solamente 6 resultaron positivos al fitoplasma; con la técnica de anidado sobre

el gen 16S se obtuvo un total de 135 negativos que equivale a un 98.5 % y los positivos fueron 2 que equivale al 1.5 % del total de los insectos analizados (cuadro 12).

Los Cts de insectos *Myndus crudus* analizados por PCR-tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL en su mayoría son altos pues se encuentran entre los 38 ciclos, solo dos muestras presentaron ciclos que tenía un Ct entre 25 (muestra 37) y de 27.8 (muestra 41). Los insectos tomados como positivos con la sonda TaqMan son los que tienen un CT de hasta 36 o menor, se tomó en cuenta los positivos que se generaron directamente en el PCR de punto final. Las muestras que dieron positivo por PCR-anidado sobre el gen 16S fueron las muestras 41 y 37.

Cuadro 12. Detección del fitoplasma causante de AL en insectos *Myndus Crudus* con técnicas de PCR-anidado que amplifica sobre el gen 16S y PCR-tiempo real sobre el gen groEL.

DETECCIÓN DE AL EN <i>Myndus Crudus</i>				
TÉCNICA DE ANÁLISIS	PCR-TIEMPO REAL sobre el gen <i>groEL</i>		PCR-ANIDADO sobre el gen 16S	
	total	porcentaje	total	porcentaje
INSECTOS ANALIZADOS	137	100	137	100
INSECTOS NEGATIVOS	133	97	135	98.5
INSECTOS POSITIVOS	6	4.4	2	1.5

También se realizó una comparación entre costos y tiempo con la técnica de PCR-anidado convencional y la PCR-tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL. Los costos del personal y maquinaria no se calcularon.

Los costos en procesar una muestra de ADN en PCR tiempo real hasta la obtención de resultados fue de \$24.80 MN en comparación con la técnica PCR-anidado que fue de \$49.36 MN casi el doble. En cuanto al tiempo que se tarda en procesar una muestra de ADN por medio de PCR-tiempo real es de 2 horas y por la técnica de PCR anidado se lleva 10 horas (cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación entre el costo y tiempo del proceso de una muestra por PCR-tiempo real y PCR-anidado.

COMPARACION DE COSTOS Y TIEMPO PARA LA DETECCION DE AL					
PCR-anidado			PCR-tiempo real		
COSTOS POR MUESTRA					
Materiales	Precio \$ MN	Por muestra (2 reacciones)	Productos	Precio \$MN	Por muestra
Taq Polimerasa			Sonda (720 mx)	\$4,722	\$6.60
Master mix (100 mx)	\$2,027	\$41	Master mix (500 mx)	\$7,817	\$15.64
Tubos de PCR (1000)	\$577	\$1.15	Tubos PCR ópticos (1000)	\$2,600	\$2.60
Agarosa 500g (0.5 g)	\$7,714	\$7.71			
TOTAL COSTOS		\$49.36	TOTAL COSTOS		\$24.84
TIEMPO DE PROCESO					
Actividad	Horas		Actividad	Horas	
PCR-primera ronda y electroforesis	5 hrs.			2hrs.	
PCR-segunda ronda y electroforesis	5 hrs.		Reacción de PCR		
TOTAL TIEMPO	10 hrs.		TOTAL TIEMPO	2 hrs.	

5.4 Discusión

Los fitoplasmas son parásitos obligados y necesitan de un hospedero para vivir y dispersarse; su dispersión y distribución esta mediada por los insectos vectores, la dispersión de los insectos esta correlacionada con sus hábitos de alimentación, estos pueden ser transmisores de diversas enfermedades, por lo que se ha estimulado la identificación de vectores sobre todo cuando afectan a cultivos de importancia económica; existen grandes avances en cuanto a métodos de detección (Hoy *et al.*, 1992, McClure, 1980a).

En cocotero se ha establecido que uno de los transmisores del AL es *Myndus Crudus*, en este insecto se han realizado pruebas de transmisión así como de detección de fitoplasmas del AL por métodos moleculares. Una de las técnicas que se utiliza en la detección de fitoplasmas del AL en insectos es el PCR-anidado con resultados regulares. En un trabajo en donde se detectó AL a distintos tipos de palmas y también

se analizó insectos, se analizaron 1809 insectos de los cuales solo 23 resultaron positivos lo que equivale al 1.3% de los insectos analizados. (Vásquez, 2010).

En otro reporte se analizaron insectos individualmente y por grupos de cinco para detectar fitoplasmas del grupo 16SrVI utilizando como blanco al gen 16S rRNA, utilizaron ambas técnicas la PCR anidado y la PCR tiempo real, los resultados fueron que PCR anidado detectó una muestra de insecto analizada individualmente que no fue detectada en tiempo real, ellos sugieren que la técnica de anidado pudo haberse contaminado debido a la doble manipulación ya que la técnica en tiempo real es más sensible (Crosslin *et al.*, 2006).

En nuestros resultados encontramos que de los 137 insectos analizados 6 son positivos al AL por medio de la técnica PCR-tiempo real con la sonda LYgroEL esto es mayor en comparación con la técnica de PCR-anidado realizado a las mismas muestras; anidado dio positivo a AL en dos muestras de insectos, los datos sugieren que la técnica de PCR tiempo real es más sensible para detectar fitoplasmas de AL en insectos. Las muestras de insectos que dieron positivo por PCR-anidado tenían Cts bajos muy semejantes a los del control positivo, esto quiere decir que los títulos de fitoplasma son mayores que en las otras muestras que no fueron detectadas por anidado, pero que sí pudieron detectarse por la técnica de PCR tiempo real son las que tenían títulos de fitoplasma más bajos.

Se ha visto que nuestros resultados en cuanto a la detección de AL en insectos son muy semejantes a otros estudios donde no se encuentran cantidades altas de insectos positivos (Crosslin *et al.*, 2006), sin embargo los resultados obtenidos por la sonda LYgroEL son mayores que los obtenidos por la técnica PCR anidada.

Por otro lado, se sabe que los fitoplasmas están en floema de la plantas y hasta hace algunos años se informó que en cocotero se había detectado en embriones. En nuestro laboratorio se diseñó una sonda TaqMan utilizando como blanco el gen 16S ribosomal del fitoplasma *Ca Phytoplasma palmae*, en este caso de los 185 embriones analizados por medio de PCR-tiempo real, 59 (32%) resultaron positivos y con PCR-anidado 20 resultaron positivos (11%).

En nuestros resultados con la técnica de PCR tiempo real con la sonda LYgroEL, los análisis de embriones mostraron un mayor porcentaje de positivos en comparación con las otras técnicas de PCR-anidado sobre el gen 16S y sobre el gen *groEL*

realizadas a las mismas muestras. Esto quiere decir que la técnica en tiempo real es más sensible que la PCR-anidado, aunque se realice la detección sobre el mismo gen *groEL* como blanco. Estas grandes diferencias en el porcentaje de detección pueden ser debidas a que la concentración del fitoplasma en los embriones es muy bajo como se observa por los bajos Cts determinados (datos no mostrados) y por lo tanto la PCR en tiempo real al ser más sensible pudo detectar un mayor número de muestras en comparación con la PCR convencional.

En cuanto al costo hay estudios donde sugieren que la técnica en tiempo real es costosa porque requiere de material y equipo especializado, pero los costos podrían reducirse debido a que cada día son más los laboratorios que implementan la técnica, sin embargo reiteran la sensibilidad, la rapidez y la relativa sencillez que hace que esta técnica sea fácilmente automatizada. Nosotros realizamos una comparación entre los costos en procesar una muestra de ADN con las técnicas PCR-tiempo real con la sonda LYgroEL y PCR-anidado convencional, y a diferencia de lo que se cree, la técnica de tiempo real es menos costosa en el proceso de la muestra porque el costo del material a utilizarse en una sola ronda de PCR, es menor que el material que se utiliza en las dos rondas de PCR anidado que duplica los costos, además el tiempo de proceso que se lleva en realizar el proceso de la muestra es de 10 horas en comparación a dos horas del PCR-tiempo real, que es cinco veces el tiempo de proceso, lo que aumentaría el costo en personal.

5.5 Referencias bibliográficas

- Alma, A., D. Bosco, A. Danielli, A. Bertaccini, M. Vibio y A. Arzone (1997). Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology*, 6: 115–121.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673–689. PMID:17127328.
- Córdova, I., P. Jones, NA. Harrison, C. Oropeza (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*, 4(2):99-108.
- Crosslin, J., G. J. Vandemark y J. E. Munyaneza (2006). Development of a Real-Time, Quantitative PCR for Detection of the Columbia Basin Potato Purple Top Phytoplasma in Plants and Beet Leafhoppers. *Plant Disease*, 90:663-667.
- Firrao, G., K. Gibb y C. Streten (2005). Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology*, 87: 249–263.
- Food and Agriculture Organization, 2009. Dirección estadística http://www.fao.org/index_ES.htm FAOSTAT | © FAO.
- Homboonsong, C., S. Choosai, Panyim y S. Damark (2002). Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsuma rutettix hiroglyphycos (matsumura)*. *insect Mol. Biol.*, 1(1),97.
- Hoy, C.W., S. Heady y T. Koch (1992). Species composition, phenology, and possible origins of leafhoppers (Cicadellidae) in Ohio vegetable crops. *Journal of Economic Entomology*, 85: 2336–2343.
- Kirkpatrick, B.C. (1992). Mycoplasma-like organisms—plant and invertebrate pathogens. In *The Prokaryotes* (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., eds), 2nd edn, Vol. 4, pp. 4050–4067. New York: Springer-Verlag.
- McClure, MS., (1980a). Role of wild host plants in the feeding, oviposition, and dispersal of *Scaphytopius acutus* (Homoptera: Cicadellidae) a vector of peach X-disease. *Environmental Entomology*, 9: 283–292.
- Olivier, C., B. Galka, M. Rott y R. Johnson (2008). First report of molecular detection of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains in seeds of *Brassica napus* in Saskatchewan, Canada. *Cruciferae Newsletter*, 27: 22–23.
- Oropeza C, I. Cordova, A. Chumba, M. Narváez, L. Sáenz, R. Ashburner y N. Harrison (2011). Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Annals of Applied Biology*. DOI: 10.1111/j1774-7348.2011.00480.x

Puch Hau, C. (2010). Implementación de la técnica de PCR tiempo real usando TaqMan para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México.

Vazquez, R. (2010). Detección y caracterización de fitoplasmas del Amarillamiento Letal en diferentes especies de palmas en Yucatán, tesis doctorado. Yucatán, México.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL

Una de las especies de plantas más representativas de las zonas costeras tropicales a nivel mundial es el cocotero, México es un país destacado en la producción de copra. En los últimos años la producción de cocotero se ha visto disminuida y una de las causas se debe a la incidencia de enfermedades como el fitoplasma del AL (Harrison y Oropeza *et al.*, 2008). Los fitoplasmas son bacterias que habitan en el floema de las plantas y hasta el momento no han sido cultivadas *in vitro* lo que hace que se dificulte su estudio (Harrison y Oropeza, 2008); existen varias formas de transmisión de fitoplasmas como por ejemplo insectos y propagación vegetativa, El AL es una enfermedad producida por fitoplasmas que ha sido desastrosa debido a que aniquila a la planta.

Los tipos de análisis que se realizan para comprobar si una planta está infectada con fitoplasmas son de tipo convencional (microscopía, sintomatología) o moleculares (sondas moleculares, PCR-anidado) (Harrison y Oropeza *et al.*, 2008). Actualmente se está empleando la técnica de PCR tiempo real para la identificación y cuantificación de microorganismos (Christensen *et al.*, 2004). En estudios realizados para detectar fitoplasmas donde se comparan la técnica convencional (PCR anidado) y PCR en tiempo real se demuestra que esta última es más sensible y mucho más rápida, (Christensen *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2005; Crosslin *et al.*, 2006; Aldagui *et al.*, 2007; Hren *et al.*, 2007).

En cocotero la técnica que actualmente se utiliza para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal es la PCR-anidada, sin embargo debido a la necesidad de implementar una técnica más simple, rápida, sensible y específica para detectar la presencia del fitoplasma en plantas enfermas, se implementó la técnica de PCR-tiempo real. Existen dos trabajos previos para la implementación de la técnica de PCR en tiempo real para la detección del fitoplasma del AL. En el trabajo reportado por Hodgetts *et al.*, (2009) utilizaron el gen 23S rRNA para diseñar sondas TaqMan para detectar fitoplasma en general; al combinarlos con cebadores específicos pudieron detectar al grupo 16SrIV donde está clasificado el fitoplasma del AL. Sin embargo en este trabajo no se realizó una caracterización más profunda de este sistema de detección. En este trabajo también mencionan que el ensayo de PCR en tiempo real desarrollado es más sensible que la PCR anidada, sin dar detalles. En nuestro laboratorio también se diseñó una sonda específica para detectar al fitoplasma del AL,

solo que utilizando como blanco la región 16S del gen rRNA. Los resultados mostraron que la sonda fue específica y más sensible que la PCR convencional.

Por otro lado, el grupo del Dr. Nigel Harrison aisló una región del ADN del fitoplasma del AL con alta homología con el gen *groEL*. Utilizando cebadores específicos desarrolló un ensayo de la PCR anidado, relativamente más sensible que el PCR anidado para la fracción 16S rRNA. Teniendo en cuenta las ventajas que presenta la PCR-tiempo real, se diseñó una sonda TaqMan utilizando como blanco al gen *groEL* y de esta forma se obtuvo una alternativa más eficiente para el diagnóstico de la enfermedad del amarillamiento letal.

La sonda diseñada y analizada en el presente trabajo resultó ser específica y más sensible que la PCR anidada de acuerdo con los resultados obtenidos. Los trabajos reportados con otros fitoplasmas como el '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Aldagui *et al.* 2007), el fitoplasma que afecta a la manzana (Torres *et al.*, 2005), el fitoplasma *Flavescence dorée* (Hren *et al.*, 2007).

El mayor incremento en la sensibilidad puede ser parcialmente atribuida a que son amplificadas pequeñas regiones de ADN (70-80 pb), al menos 10 veces menos que con la PCR anidado. Por lo tanto el ensayo de la PCR en tiempo real con las sondas TaqMan puede ser menos sensible a la degradación de ADN o a inhibidores que se unen al ADN (Hren *et al.*, 2007). Otra posible explicación es que la PCR en tiempo real es menos afectada por inhibidores en la reacción de la ADN polimerasa, que la PCR estándar, ya que los inhibidores tienen un mayor efecto en los últimos ciclos de la reacción, los cuales son críticos para la PCR estándar por la acumulación y visualización del producto de amplificado, en cambio en la técnica de la PCR en tiempo real la detección se realiza en los ciclos iniciales (umbrales) y no en los últimos ciclos (Munford *et al.*, 2000).

Nuestros resultados de muestras de campo mostraron de nuevo la mayor sensibilidad del ensayo de la PCR en tiempo real. El caso de embriones es importante porque aunque han habido reportes de que los fitoplasma se detectan en los embriones (Nipah *et al.*, 2007; Oropeza *et al.*, 2011), estos resultados confirman estos datos y se puede discutir que los fitoplasma no son detectados con facilidad por la PCR anidado ya que al parecer en embriones se encuentran en bajas concentraciones ya que los Cts en general fueron muy altos (datos no mostrados). La presencia de fitoplasmas en

los embriones podría indicar que puede ser posible la transmisión por semilla, aunque los resultados de plántulas germinadas de semillas provenientes de palmas enfermas no mostraron la presencia del fitoplasma del AL (Nipah *et al.*, 2007; Oropeza *et al.*, 2011).

En conclusión La PCR-tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL, resultó ser más sensible que la técnica de PCR anidada para detectar dicho fitoplasma. Además presenta otras ventajas al ser una técnica rápida puesto que no requiere de dos pasos de amplificación lo que a su vez disminuye el riesgo de los falsos positivos debido que tiene menos probabilidad de contaminación, esto aunado a que el precio de reacción es casi la mitad resulta en una técnica altamente atractiva para ser empleada de manera rutinaria.

6.2 Conclusiones generales

La sonda TaqMan LYgroEL es específica para detectar al fitoplasma '*Ca Phytoplasma palmae*' que produce el amarillamiento letal en cocotero.

La prueba de sensibilidad realizada por serie de diluciones demostró que la PCR-tiempo real con la sonda TaqMan LYgroEL es más sensible al detectar una dilución logarítmica de 10^{-4} menor que la PCR-anidada 10^{-3} .

Los ensayos con muestras de embriones demuestra que la sensibilidad de detección del '*Ca. Phytoplasma palmae*' es mayor con la sonda TaqMan LYgroEL que con la PCR-anidado convencional.

Los ensayos en muestras de insectos demuestra que el porcentaje de detección del *Ca. 'Phytoplasma palmae'* es mayor con la sonda TaqMan LYgroEL que con la PCR-anidado.

Las condiciones de PCR y el diseño de la sonda mostraron una alta eficiencia y linealidad lo que permite a esta técnica ser utilizada para detección y cuantificación del fitoplasma del AL

6.2 Referencias bibliográficas

- Aldaghi, M., M. Roussel M. y M. Jijakli (2007). Developend of a new probe for specific and sensitive detection of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in inoculated apple trees. *Annals of Applied Biology*, 151:251-258.
- Christensen, N., M. Nicolaisen, M. Hansen y A. Schulz (2004). Distribution of Phytoplasma in infected plants as revealed by real-time PCR and Bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17: 1175-1184.
- Crosslin, J., y G. Vandemark (2006). Development of a Real-Time Quantitative PCR for Detection of the Columbia Basin Potato Purple Top Phytoplasma in Plants and Beet Leafhoppers. *Plant Disease*, 90: 663-667.
- IRPCM, (2004). *Candidatus phytoplasma*, a taxón for the wal-less, nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Mycobiology*, 54, 1243-1255.
- Gachon C., Mingam A. and Charrier B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1445-1454.
- Harrison NA y C. Oropeza (2008). Coconut lethal yellowing. In: NA Harrison, GP Rao and C Marcone (Eds.). *Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas*. Studium Press, Houston, USA, pp 219-248.
- Hren M., J. Boben, A. Rotter, P. Kralj. K. Gruden y M. Ravnikar (2007). Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and aplication in diagnostic. *Plant Pathology*, 56: 785-796.
- Herath P., GA. Hoover, E Angelini y G. Moorman (2010). Detection of elm yellows phytoplasma in elms and insects using Real-Time PCR. *Plant Disease*. 94(11): 1355-1360. DOI: 10:1094/PDIS-12-09-0783.
- Hodgetts J., N. Booham, R. Mumford y M. Dickinson (2009). Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group specific detection phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 2945-2950. DOI: 10.1128/AEM.02610-08.
- Lherminier J., M. Courtois y A. Caudwell (1994) Detection of the distribution and multiplication sites of flavescence dorée mycoplasma-like organism in the host plant *Vicia faba* by ELISA and immunocytochemistry. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45, 125-138.

- Nipah J., P. Jones y M. Dickinson (2007). Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut Palms infected with Cape St Paul Wilt disease in Ghana. *Plant Pathology*, 56: 777-784
- Oropeza C, I. Cordova, A. Chumba, M. Narváez, L. Sáenz, R. Ashburner y N. Harrison (2011) Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Annals of Applied Biology*, DOI: 10.1111/j1774-7348.2011.00480.x
- Torres E., E. Bertolini, M. Cambra, C. Monton y M. Martín (2005). Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*. 19: 334-340.