UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETECCION MOLECULAR DE FITOPLASMAS Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

POR:

M. EN C. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

SAN NICOLAS DE DE LOS GARZA, N. L., MEXICO
DICIEMBRE DE 1997

TD
Z5320
FCB
1997
A2

ADO EN
OLOGA

M. EN C. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEON

1997

1020145330

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETECCION MOLECULAR DE FITOPLASMAS Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

POR

M EN C ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEON

COMO REQUISI O PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

SAN NICOLAS DE DE LOS GARZA, N. L., MEXICO
DICIEMBRE DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETECCION MOLECULAR DE FITOPLASMAS Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

POR

M. en C. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L., MEXICO DICIEMBRE DE 1997

0149-37260

TD
Z5320
FCB
1997
A2

FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETECCION MOLECULAR DE FITOPLASMAS Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

POR

M. en C. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

COMISION DE TESIS APROBADA

Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
Director de Tesis

Dr. Mario Alberto Rocha Peña
Co-Director de Tesis

Dr. Luis J. Galán Won g
Asesor

Dr. Benito Pereyra Alférez
Asesor

Dr. Carlos Oropeza Salim
Asesor

San Nicolás de los Garza, N.L., México

Diciembre de 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETECCION MOLECULAR DE FITOPLASMAS Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

POR

M. en C. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

COMISION DE EXAMEN

DR. MARIO ALBERTO ROCHA PEÑA
Presidente

DR. LUIS J. GALAN WONG
Secretario

DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ
Vocal

DR. JUAN PABLO MARTINEZ SORIANO
Vocal

DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ
Vocal

San Nicolás de los Garza, N.L., México — Diciembre de 1997

CONTENIDO

DEDICATORIA i

AGRADECIMIENTOS ii

INDICE DE FIGURAS iv

INDICE DE TABLAS vi

INDICE DE FIGURAS DEL APENDICE vii

LISTA DE ABREVIATURAS viii

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

Capítulo 1. 3
INTRODUCCION 3

HIPOTESIS 6

OBJETIVO GENERAL 6

OBJETIVOS PARTICULARES 6

Capítulo 2. 8
ANTECEDENTES 8

2.1. Importancia socioeconómica del cultivo. 8
2.2. Aspectos Generales del Amarillamiento Letal del Cocotero. 9
2.2.1. Importancia e impacto económico. 10
2.2.2. Epidemiología. 11

2.2.3. Etiología. 13
2.2.3.1. Aspectos taxonómicos del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero. 13
2.2.3.2. Morfología. 15
2.2.3.3. Fisiología. 16
2.2.3.4. Relaciones hospedero-parásito 17
2.2.4. Sintomatología. 18
2.2.5. Transmisión. 20
2.2.5.1. Evidencias de *Myndus crudus* como vector del Amarillamiento Letal del Cocotero. 23
2.2.5.2. Primeras pruebas de transmisión por *Myndus crudus* 24
2.2.5.3. Pruebas de transmisión replicadas. 25
2.3. Diagnóstico. 26
2.4. Alternativas de manejo de la enfermedad. 29
2.4.1. Del patógeno. 29
2.4.2. Del vector. 30

Capítulo 3. 32
MATERIAL Y METODOS 32

3.1. Ubicación del lugar de trabajo. 32
3.2. Colecta de muestras. 32
3.3. Extracción del DNA. 33
3.4. Diseño de iniciadores. 35
3.5. Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs). 37
3.6. Análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR. 37

3.7. Estimación de la relación taxonómica de los Fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa..... 38
3.8. Clonación de fragmentos amplificados por PCR. 38
3.8.1. Etapas secuenciales para la clonación de los fragmentos amplificados por PCR. 39
3.9. Hibridación molecular. 41
3.10. Transmisión del Fitoplasma que afecta a la teresita. 44

Capítulo 4. 45
RESULTADOS Y DISCUSION 45

4.1. Optimización de la extracción del DNA de cocotero y otras especies vegetales. 45
4.2. Iniciadores diseñados. 47
4.3. Optimización de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. 47
4.4. Detección del Fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero por PCR. 48
4.5. Comparación de iniciadores utilizados en las PCRs. 50
4.6. Detección diferencial de diversos patógenos tipo Fitoplasma. 53
4.7. Análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR. 58
4.8. Estimación de la relación taxonómica de los Fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa. 61
4.9. Clonación de fragmentos amplificados por PCR. 62
4.10. Hibridación molecular. 62

4.11. Transmisión del Fitoplasma que infecta a la teresita..... 65

Capítulo 5. 68
CONCLUSIONES 68

LITERATURA CITADA..... 69

APENDICE..... 85

DEDICATORIA

A Dios:

Por haberme permitido cumplir esta meta.

A mi esposa:

MANUELA DEL JESUS: Compañera inapreciable, que siempre me ha demostrado amor, cariño, comprensión y me ha sabido reconfortar en los momentos de zozobra y flaqueza.

A mis hijos:

HUMBERTO GERARDO Y JOSE EDUARDO: Dos luceros a quienes amo entrañablemente.

A mis padres:

JOSE MELITON Y PAULA: Quienes cultivaron en mi el espíritu de lucha y superación.

A mis hermanos:

JOSE GUADALUPE, MARTIN EDUARDO, JORGE MANUEL, ROSA ESTHER, ANA MARIA, ROSARIO DEL CARMEN, CONCEPCION Y PARTICULARMENTE A CANDELARIO: A quién me une un cariño muy especial.

A mis suegros:

JOSE ANGEL Y MARIA DEL CARMEN: De quienes solo he recibido cariño y comprensión.

A mis abuelos: **MELITON†, MANUEL†, MARIA DEL CARMEN† Y CECILIA.**

A mis tíos:

En especial a: **ESTEBAN, CONCEPCION Y PAULA.**

A MIS SOBRINOS, CUÑADOS, AHIJADOS, COMPADRES, Y AMIGOS.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano, por aceptar dirigir mi trabajo de tesis y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Mario Alberto Rocha Peña, por aceptar co-dirigir mi trabajo de tesis y por el análisis y las sugerencias realizadas durante el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por el apoyo brindado para la culminación de mi trabajo de investigación y aceptar ser miembro de mi comité de tesis.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por las sugerencias realizadas durante el desarrollo de mi investigación, la revisión del escrito y aceptar ser miembro de mi comité de tesis.

Al Dr. Carlos Oropeza Salim, por aceptar ser miembro de mi comité de tesis.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González, por aceptar ser miembro de mi comité de examen.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño, por aceptar ser miembro de mi comité de examen.

Al M.C. Fernando Patiño Valera, por el apoyo brindado para que pudiera realizar mis estudios de Doctorado.

Al M.C. Jaime Piña Razo, por su amistad y apoyo brindado para realizar mis estudios de Doctorado.

Al M.C. Jorge Cantú Vega, por su apoyo y estímulo vertido durante el transcurso de mi investigación.

A la Dra. Diana Sara Leal Klevezas, por sus comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo.

Al M.C. Pablo Zapata Benavides, por su amistad y apoyo brindado en el trabajo de laboratorio.

A la M.C. María Magdalena Iracheta Cárdenas, por su amistad y el apoyo de laboratorio brindado.

A la Sra. Mirthala Páez de González, por su disponibilidad y paciencia en la revisión ortográfica del escrito.

Al QBP Tomás Rangel Galán, por su amistad y disponibilidad de ayuda durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Alberto, Omar, Irma, Isadora, Elisa, Edgar y Norma.

Al personal del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, por las facilidades brindadas para realizar mi trabajo de tesis.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la culminación de mi trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de Doctorado

Al Centro de Investigación Regional Sureste del INIFAP, por la aportación económica para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación Regional Noreste, por las facilidades prestadas para desarrollar mi trabajo de tesis en la Unidad de Investigación en Biología Molecular y Celular INIFAP-UANL.

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.-	Representación esquemática del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S reportado para el Grupo I de Organismos Tipo Micoplasma.	36
2.-	Representación esquemática de los genes que codifican para los RNAs ribosomales 16S y 23S de fitoplasmas y la región intergénica	36
3	DNA genómico de diversas especies vegetales.	46
4.-	Fragmentos amplificados por PCR usando los iniciadores MMF/MMR y DNA de cocotero sano e infectado con el fitoplasma causante del AL.	49
5.-	Fragmentos amplificados por PCR usando diferentes iniciadores y DNA de cocotero sano e infectado con el fitoplasma causante del AL	52
6.-	Fragmentos amplificados por PCR usando los iniciadores R16F2/R16R2, MMF/MMR y R16F2/MMR y DNA de diferentes especies vegetales infectados por fitoplasmas	54
7.-	Fragmentos amplificados por PCR usando los iniciadores P1/P7, P3/P7, P1/Tint, P1/PAyint y DNA de diferentes especies vegetales infectados por fitoplasmas	57

8.- Patrón de restricción de fragmentos del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S y el espacio intergénico entre los genes que codifican para los RNAs ribosomales 16S y 23S de los fitoplasmas que infectan a diversas especies vegetales, amplificados por PCR utilizando los iniciadores R16F2/R16R2 y P1/Tint, digeridos con *Eco*RI y *Alu*I..... 60

9.- Fragmentos del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de los fitoplasmas que infectan al cocotero y teresita (269 pb y 1.2 kb respectivamente), clonados en *E. coli*, JM109 y amplificados por PCR utilizando los iniciadores MMF/MMR y R16F2/R16R2..... 62

10.- Reacción de hibridación (DoBlot), de las sondas AL269 y AL1.2, con el DNA extraído de diferentes especies vegetales sanas e infectadas por fitoplasmas..... 64

11.- Esquema de transmisión del fitoplasma que infecta a *C. roseus*..... 65

12.- Fragmentos amplificados por PCR usando diferentes iniciadores y DNA de teresita *C. roseus* sana e infectada por fitoplasma..... 66

INDICE DE TABLAS

Tabla Página

1.- Escala para determinar el grado de avance de la enfermedad Amarillamiento Letal del Cocotero. 19

2.- Secuencia, posición en el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de fitoplasmas y la Tm de los iniciadores MMF/MMR. 47

3.- Condiciones de la PCR para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en plantas con síntomas de infección. 48

4.- Condiciones de la PCR para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en plantas asíntomaticas. 48

5.- Comparación de diferentes fitoplasmas detectados en muestras vegetales, entre los iniciadores MMF/MMR diseñados en el laboratorio de Patología Molecular del INIFAP-UANL y los iniciadores diseñados en otro laboratorio. 55

6.- Matriz del índice de similitud entre el perfil de restricción de los fragmentos amplificados por PCR (utilizando los iniciadores P1/Tint y digeridos con la enzima de restricción *Alu* I), de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa. 61

INDICE DE FIGURAS DEL APENDICE

Figura Página

1.- Composición de bases del fragmento amplificado por PCR, a partir del DNA genómico de cocotero con síntomas de infección por AL, utilizando los iniciadores MMF/MMR. 86

2.- Mapa de restricción obtenido mediante el programa computacional DNA Strider 1.01 (Marck, 1988), del fragmrnto amplificado por PCR, a partir del DNA genómico de cocotero con síntomas de infección por AL, utilizando los iniciadores MMF/MMR. 87

3.- Mapa gráfico de sitios únicos de corte, obtenido mediante el programa computacional DNA Strider 1.01 (Marck, 1988), del fragmento amplificado por PCR, a partir del DNA genómico de cocotero con síntomas de infección por AL, utilizando los iniciadores MMF/MMR. 88

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxiribonucleico
agua mq	Agua ultrapura
AL	Amarillamiento Letal
*Alu*I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia AG↓CT
RNA	Acido ribonucleico
b	Bases
^{o}C	Grados celcius
cm^2	Centímetro cuadrado
CTAB	Cetiltrimetilamonio bromide
cols	Colaboradores
DAPI	4´,6-diamidin-2-fenilindole.2HCl
Dde I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia C↓TNAG
dNTP´s	Deoxinucleotidos trifosfatados
*EcoR*I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia G↓AATTC
EDTA	Etilendlaminotetracetato disódico
et al.	y colaboradores
etc.	Etcétera
g	Gramos
ha	Hectárea
h	Hora
*Hinf*I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia G↓ANTC
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
KaC	Acetato de potasio
kb	Kilobases
l	Litro
LB	Caldo Luria-Bertani
M	Molar
2-M	2-Mercaptoetanol
mg	Miligramos
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Micromolar
NaC	Citrato de sodio

NBT	Sal nitroazul de tetrazolio
ng	Nanogramos
nm	Namometros
nM	Nanomolar
OTMs	Organismos Tipo Micoplasma
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pMoles	Picomoles
QRoo	Quintana Roo
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOC	Caldo Luria-Bertani más KCl, $MgCl_2$ y Glucosa
SSC	Solución amortiguadora de citratos
16S	Acido ribonucleico ribosomal
23S	Acido ribonucleico ribosomal
TBE	Solución amortiguadora tris-borato-EDTA
TE	Solución amortiguadora tris-EDTA
Tm	Temperatura óptima de apareamiento
Tris	Tris hidroximetilaminometano-Trizma base
UANL	Universidad Autonoma de Nuevo León
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µM	Micromolar
USA	Estados Unidos de Norteamerica
vol.	Volumen
p/v	Peso/volumen
%	Porciento

RESUMEN

El diagnóstico rutinario del Amarillamiento Letal del Cocotero (AL), es por sintomatología, el cual es poco confiable y se realiza en etapas tardías. En virtud de que en cualquier programa de manejo y/o control de alguna enfermedad es esencial su diagnóstico oportuno y seguro, sobre todo, en etapas tempranas, en este trabajo se plantearon los objetivos siguientes: 1) Lograr la detección molecular del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero; 2) Determinar sus posibles relaciones filogenéticas con los fitoplasmas que infectan a otras especies vegetales. Los iniciadores MMF/MMR, diseñados con base en la comparación de secuencias nucleotídicas del gene 16S del RNA ribosomal de diversas especies del género *Phytoplasma* (anteriormente conocidos como organismos tipo micoplasma), reaccionaron positivamente en las pruebas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificando un fragmento de 269 pares de bases (pb), cuando se utilizó DNA extraído de palmas de cocotero con síntomas típicos de AL. No se observó amplificación cuando se utilizó DNA proveniente de palmas sanas. Los iniciadores MMF/MMR, presentaron resultados más consistentes en la detección del fitoplasma que infecta al cocotero que los pares R16F2/R16R2; LYF1/LYR1. En la detección diferencial de fitoplasmas, se logró la amplificación de fragmentos del DNA de los fitoplasmas que afectan a la palma de cocotero, teresita, cempaxúchitl, yuca, papa y palma jipi. Los fragmentos amplificados por PCR, utilizando los iniciadores P1/Tint, y el DNA de cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa, se sometieron a un tratamiento con *Alu*I, observándose cuatro patrones de restricción, el fitoplasma que afecta al cocotero tiene un mayor índice de similitud con los fitoplasmas que afectan al cempaxúchitl y teresita con un valor de 0.66, los fitoplasmas que afectan al cempaxúchitl y teresita presentan el mismo patrón de restricción. Dos fragmentos amplificados por PCR, fueron clonados en *Escherichia coli* JM109 y se utilizaron como sondas en las pruebas de hibridación. Las dos sondas (AL269 y AL1.2), hibridaron con los DNAs extraídos de palma de cocotero con síntomas típicos de AL y palma de cocotero asintomática. No se observó señal de hibridación de las dos sondas con el DNA proveniente de plantas sanas de cocotero, teresita y yuca. En este estudio también se logró transmitir de teresita a teresita el fitoplasma que infecta a esta planta por medio de la especie parásita *Cuscuta* spp. Los resultados obtenidos permite anticipar el uso de las técnicas aquí desarrolladas en programas de manejo y control del AL; en programas de mejoramiento genético orientados a la búsqueda de material con resistencia o tolerancia a la enfermedad y en estudios epidemiológicos.

ABSTRACT

The current method for diagnosing the coconut lethal yellowing is by sintomatology. However, this method is not reliable because the disease symptoms can be erroneusly confused with other diseases with different etiology, and only when the plant is close to die. To establish a program of integrated management of any disease is important to have a reliable and suitable diagnostic method. For this reason, the objetives of the present study were: 1) Molecular detection of phytoplasma that causes the coconut lethal yellowing; 2) Determine their possibles genetic relatedness with phytoplasmas that affect other plant species. The oligonucleotide primers MMF and MMR were designed on the basis of comparison of *Phytoplasma* spp. 16S rRNA gene sequence and followed by Polymerase Chain Reaction. These primers amplified a 269 base pair region on DNA extracted from coconut palms showing visual symptoms of yellowing decline. No sign of amplification was obtained when using DNA from healthy coconut palm. Under our PCR conditions the use of the pair MMF/MMR yielded more reproducible results than the pair R16F2/R16R2 and LYF1/LYR1 in the diagnostic of coconut lethal yellowing. In differential detection of phytoplasmas, DNAs from phytoplasmas that affected coconut palm, cempaxuchitl, periwinkle, potato, cassava and jipi palm were also amplified. PCR products of DNA extracted from coconut palm, cempaxuchitl, periwinkle, potato and cassava, amplified with the P1/Tint primers were analized by restriction endonuclease digestion *Alu*I. Four patterns of restriction were observed; the coconut pattern was similir with those of cempaxuchitl and periwinkle with 0.66 of similitude rate. Cempaxuchitl and periwinkle had a similar pattern of restriction. Two PCR products were cloned into *Escherichia coli* JM109 and utilized as probes in hybridization tests. The probes AL269 and AL1.2, hybridized with DNA extracted from both coconut palm with symptoms of lethal yellowing and coconut palms symptomless. No signals were observed between the two probes and DNA extracted from healthy coconut palm, periwinkle and cassava. In this study, the phytoplasma that affects periwinkle was transmitted by dodder (*Cuscuta* spp.) to healthy periwinkle. The results obtained shows the potential use of molecular techniques developed here in programs of integrated management of coconut lethal yellowing, in breeding programs directed to search genetic material resistent to disease and epidemiologic studies.

Capítulo 1
INTRODUCCION

El cocotero *Cocos nucifera* L., es un cultivo típico de las zonas tropicales y subtropicales. En México prospera tanto en la costa del Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas, como en el Golfo de México, desde Veracruz hasta Yucatán. La superficie nacional explotada como cultivo es de aproximadamente 204 mil ha distribuidas en 13 entidades del país, destacando Guerrero, Tabasco y Colima, convirtiendo a México en líder productor de este cultivo en Latinoamérica. El valor estimado de la producción de copra es más de 175 millones de pesos anuales (Carrillo y Piña, 1994).

El cocotero está siendo devastado por la enfermedad Amarillamiento Letal, su presencia en México fue determinada en 1977 en el estado de Quintana Roo, aunque plenamente confirmada en 1982. En el año de 1996, la enfermedad fué reportada en las costas del Atlántico y del Caribe (Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán), devastando aproximadamente 10, 000 ha que implica la aniquilación de 1 millón 200 mil palmeras (Almeyda *et al.*, 1996; Cortazar y Carrillo, 1996).

Se tienen evidencias de que un miembro del género *Phytoplasma* anteriormente conocidos como Organismos Tipo Micoplasma (OTMs), es el agente causal del Amarillamiento Letal y es transmitido por un insecto vector conocido como chicharrita pálida *Myndus crudus* Van Duzee (Homóptera: Cixiidae). Esta enfermedad afecta además del cocotero a por lo menos 30 especies más de palmas (McCoy *et.al.*, 1983).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza comúnmente basado en la sintomatología que presentan las plantas enfermas. Desafortunadamente este método es tardío y no confiable debido a que la sintomatología que presenta el Amarillamiento Letal es muy parecida al que ocasionan otras enfermedades como la Pudrición del Cogollo ocasionada por el hongo *Phytophthora palmivora* Butl, el anillo rojo ocasionada por el nemátodo *Bursaphelenchus cocophylus* (Coob) Baujard, y algunas deficiencias nutricionales. Por consecuencia el diagnóstico por sintomatología requiere la confirmación de la presencia del fitoplasma en el floema de la planta enferma.

El uso de la microscopía electrónica (Thomas y Norris, 1980), y el marcaje del DNA con DAPI (4´,6-diamidin-2-fenilindole.2HCl), en conjunto con microscopía de fluorescencia, también ha sido usado como una herramienta alternativa para la detección de fitoplasmas patógenos de plantas (Seemüller, 1976; Sinclair *et al.*, 1992). Sin embargo, estos métodos no detectan al patógeno cuando su concentración es baja en el tejido muestreado y no proveen información acerca de la identidad del fitoplasma causante de la enfermedad (Harrison *et al.*, 1994).

Los métodos serológicos usando anticuerpos monoclonales y policlonales también han sido usados en la detección de fitoplasmas (Bonnet *et al.* 1990; Chen *et al.*, 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1987).

La detección específica y sensible de numerosos fitoplasmas tanto en plantas hospederas como en insectos vectores, también se ha logrado por medio de hibridación molecular utilizando como sondas fragmentos del DNA de fitoplasmas clonados al azar (Davis *et al.*, 1988; Kuske *et al.*, 1991; Lee y Davis, 1988).

La introducción de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha incrementado la sensibilidad y especificidad en la detección de fitoplasmas tanto en plantas hospederas como en insectos vectores, superando los bajos límites de sensibilidad observados con otros métodos cuando la concentración de los fitoplasmas es baja en las muestras procesadas, sobre todo cuando se trata de plantas leñosas (Ahrens y Seemüller, 1992; Firrao *et al.*, 1993; Gibb *et al.*, 1996; Ko y Lin, 1994; Liu *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Mullis y Faloona, 1987). Por otra parte en virtud de que el fitoplasma causante del Amarillamiento Letal y otros OTMs patógenos de plantas no pueden ser cultivados *in vitro,* su origen evolutivo y diversidad genética eran desconocidas (Namba *et al.*, 1993), y su diferenciación y caracterización estaba basada, principalmente, sobre su ámbito de hospederos y los síntomas inducidos (Marwitz, 1990). Sin embargo, la introducción de métodos de hibridación molecular, amplificación de secuencias específicas de DNA por PCR, análisis de productos amplificados sometidos a tratamiento con enzimas de restricción, clonación del DNA cromosomal y extracromosomal de OTMs, y las técnicas serológicas, se han convertido en un medio confiable y específico para la caracterización y clasificación de estos Mollicutes (Deng y Hiruki, 1991; Lee *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1993).

El peligro que representa el Amarillamiento Letal para el cultivo del cocotero, implica la urgente necesidad de coadyuvar en la Campaña Nacional de Control y Manejo de esta enfermedad. Por esta razón en este trabajo se plantea el desarrollo y adaptación de tecnologías que puedan ser utilizadas en: a). Programas de mejoramiento genético orientados a la búsqueda de germoplasma con resistencia al agente causal de la enfermedad; b). Medidas cuarentenarias y de certificación en el movimiento de material genético a regiones libres del problema en el país y en la introducción de germoplasma de otras partes del mundo; c). Estudios epidemiológicos bajo condiciones de campo.

HIPOTESIS

Para solucionar el problema que representa el diagnóstico del Amarillamiento Letal del Cocotero por métodos tradicionales, se plantea la hipótesis que mediante la adecuación de técnicas de Biología Molecular es posible:

a).- La detección del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero en etapas tempranas de la enfermedad.

b).- La determinación de sus posibles relaciones filogenéticas con otros fitoplasmas.

OBJETIVO GENERAL

Establecer un método sensible para la detección molecular del agente causal de la enfermedad Amarillamiento Letal del Cocotero, basado en la amplificación enzimática de secuencias genómicas del patógeno, realizar el diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas, principalmente en plantas asíntomaticas, y determinar sus posibles relaciones genéticas con otros fitoplasmas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar cual es el tejido de la planta que nos permita la detección segura del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Determinar el método de extracción de DNA más adecuado de acuerdo al tejido muestreado.

Diseñar las secuencias nucleotídicas más adecuadas para ser utilizadas como iniciadores en las Reacciones en Cadena de la Polimerasa y compararlos con iniciadores diseñados en otros laboratorios.

Establecer las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para lograr la detección del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Determinar la especificidad de los iniciadores diseñados en la detección del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Establecer las condiciones para la detección del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero mediante Hibridación Molecular con secuencias marcadas en forma no isotópica.

Muestreo a nivel de campo para la detección de la enfermedad en plantas asintomáticas y verificar la eficiencia de la metodología de detección.

Analizar las relaciones genéticas del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero con los fitoplasmas que infectan a otras especies vegetales.

Capítulo 2
ANTECEDENTES

2.1. Importancia socioeconómica del cultivo.

La palma de coco *Cocos nucifera* L., es el cultivo líder en el trópico húmedo. Su importancia económica se basa en el número de empleos que genera debido a la diversidad de usos de la materia prima: fruta fresca y los derivados industriales como grasas, aceite, mantequilla, jabones, vinagres, fibras, etc. (Elizondo, 1981). En muchos países un gran porcentaje de la población depende de la producción de cocotero como su medio de vida y consideran al cocotero como su principal fuente de alimentación (McCoy *et al.*, 1983; Carrillo y Piña, 1993). Existen ciertas islas tropicales donde la vida humana es posible solamente por la presencia de la palma de coco (Oliver, 1961; Purseglove, 1975). Hasta 1982, en México la superficie cultivada con cocotero era de aproximadamente 207 mil hectáreas, actualmente esta superficie se ha reducido, sin embargo, mantiene el primer lugar de producción en América Latina y el décimo a nivel mundial (Oropeza y Arellano, 1994). La superficie cultivada se distribuye en 13 entidades destacando por su producción Tabasco, Guerrero y Colima. (Carrillo y Piña, 1993; 1994).

La Península de Yucatán tradicionalmente ha sido coprera y hasta 1982, existían alrededor de 15,400 hectáreas ocupadas con el cultivo del cocotero, correspondiéndole 7,200 al estado de Campeche, 4,500 al estado de Quintana Roo y 2,700 al estado de Yucatán, que en conjunto representaban el 7.4% de la superficie cultivada a nivel nacional, con un potencial productivo de 11,500 toneladas de copra al año, potencial que prácticamente ha sido eliminado por el Amarillamiento Letal (AL). (Carrillo y Piña, 1993; 1994).

El cultivo es importante no sólo por el alto valor de su producción, calculado en más de 150 millones de pesos anuales, sino también por las más de 70 mil familias que de él dependen y por el atractivo turístico que significa (Carrillo y Piña, 1994). Sin embargo, la producción de copra en México ha ido descendiendo paulatinamente, siendo el promedio en los últimos 8 años cercano a las 140 mil toneladas. Si de manera global se distribuye esta producción entre la superficie sembrada actualmente, se observa que los rendimientos promedios no alcanzan los 700

kilogramos por hectárea, valor que refleja la crítica situación técnica, social y económica del cultivo (INIFAP, 1997).

La disminución comercial (producción, productividad, rentabilidad, etc.), del cocotero, ha provocado que en muchas regiones cocoteras donde existen nuevas opciones de cultivo, la palma de coco haya sido substituida gradualmente. En todo este proceso, actualmente influyen varias razones donde destaca la enfermedad AL, que ha ocasionado el devastamiento de aproximadamente 13,000 hectáreas de este cultivo. Así mismo, los efectos de la baja productividad en 30,000 hectáreas de plantaciones viejas (edad fisiológica), han ocasionado su muerte por el abandono en forma directa por parte del productor. Hasta la fecha esta superficie no ha sido resembrada, esta reducción, aunada a una superficie de 15,000 hectáreas que han sido muertas por enfermedades como el anillo rojo y pudrición del cogollo, han ocasionado que para 1996 la superficie total nacional se vea reducida en un 28% (INIFAP, 1997).

El 70% de la superficie real existente (102,357 ha) presenta edades que fluctúan entre los 35 y 60 años de edad con un promedio nacional de 48 años. La no reactivación de esta superficie en un término de 5 años, implicará su abandono por parte del productor debido a su improductividad. La suma de estos factores tan preocupantes para el cultivo de la palma de coco dejarían al país una superficie total en 5 años de solo 43, 000 ha aproximadamente. Esta superficie que se localizaría en el Pacífico mexicano, podría ser reducida un 40% (17,500 ha) en aproximadamente 10 años, quedando para el año 2006 una superficie de 26,400 ha (INIFAP, 1997).

2.2. Aspectos generales del Amarillamiento Letal del Cocotero.

El termino "Amarillamiento Letal", fue aplicado primeramente por Nutman y Roberts (1955), a una desconocida enfermedad de las palmas de coco presente en la parte occidental de Jamaica; después se siguió aplicando a enfermedades con idéntica sintomatología en varios países. El AL es una enfermedad epidémica de la palma de coco y se le ha considerado como un problema internacional de las palmaceas. El AL además del cocotero afecta al menos 30 especies más de palmas, entre ellas, la palma datilera *Phoenix dactylifera* L., palma canaria *Phoenix canariensis* Horto ex Chabaud, palma manila *Veitchia merrillii* (Becc.) H.E. Moree y palma pritchardia *Pritchardia spp.* (Howard y Thomas, 1980, Villanueva, 1990) y

posiblemente a la especie *Pandanus utilis* Bory, un miembro de la familia de las Pandanaceas (McCoy *et al.*, 1983). Algunos autores (Howard y Collins, 1978; McCoy y Gwin, 1977, Thomas, 1979), se refieren a enfermedades de otras plantas con sintomatología similar al AL como Declinamiento Letal (DL). Algunos otros nombres con los que les conoce a la afección son: Enfermedad de Awka, Marchitez del Cabo St. Paul, Enfermedad de Kribi y Pudrición del Cogollo (Simone, 1992).

En cuanto al origen de la enfermedad, Maramorosch (1978), señala que de acuerdo a la sintomatología descrita, los primeros reportes datan desde 1834 en las Islas Caimán. Por otra parte Parthasarathy (1974), mencionó que la enfermedad conocida como AL fue referida por primera vez por Fawcett en 1891 en Jamaica. La enfermedad ha estado presente en ciertas islas de las Grandes Antillas durante los últimos 100 años y en el oeste de Africa durante los últimos 50 años, (McCoy *et al.*, 1983). En la actualidad se le encuentra en los siguientes países: Islas Caimán, Cuba, República Dominicana, Jamaica, Haití, Bahamas, EUA (Florida y Texas), y México (McCoy *et al.*, 1983, Villanueva, 1990). Además en Africa occidental se ha reportado una enfermedad similar en Camerún, Togo, Ghana, Nigeria y Tanzania (Agrios, 1988; Harrison *et al.*, 1994a; Maramosch, 1964). En México esta enfermedad fue observada por primera vez en 1977 y confirmada en 1982 (McCoy, 1982), llevando casi al exterminio a la población de cocotero en Isla Mujeres (Villanueva *et al.*, 1985).

2.2.1. Importancia e impacto económico

El AL, representa un problema potencial para las zonas copreras del mundo, tanto por su forma de dispersión como por la severidad de su ataque. Se ha observado que se dispersa de dos maneras: local o radial cuando cerca o alrededor de una o más palmas afectadas aparecen nuevas palmas enfermas y por saltos cuando a varias decenas de kilómetros de distancia del foco de infección aparecen nuevas plantas afectadas (Tsai, 1980). Ambas formas de dispersión han sido detectadas en Q. Roo (Piña y Carrillo, 1985).

En cuanto a su severidad, la planta infectada muere de 4 a 6 meses después de los primeros síntomas. Todo esto se magnifica si se toma en consideración que dos terceras partes de las huertas comerciales de cocotero en el mundo consisten de variedades susceptibles (Villanueva *et al.*, 1985; Villanueva, 1990).

En países como Jamaica la enfermedad ha causado la muerte de aproximadamente 8 millones de palmas en un período de 25 años (Villanueva, 1990). En el sur de Florida se calcula que han muerto cerca de 500, 000 palmas en un período de 20 años teniendo un ritmo inicial de 2000 plantas por año (McCoy *et al*., 1983; Villanueva, 1990).

En México la mayoría de las plantaciones comerciales son susceptibles al AL, y la zona norte de Q. Roo fue declarada oficialmente como área afectada por el AL en 1982; las consecuencias se dejaron sentir, ya que en 1985, sólo 3 años después de haberse comprobado la presencia del AL en ese estado, se reportaron cerca de 90,000 plantas enfermas en el área de Holbox y Tulum (Carrillo y Piña, 1990).

En el año de 1989 Carrillo y Piña, informaron la muerte de poco más de 350,000 palmas en el área costera de Q. Roo y Yucatán. Para 1990 Carrillo, informó nuevos frentes de avance en Q. Roo y Yucatán con lo que se generaliza la infección en estas entidades y mencionó que en enero de 1990 en la población de Hecelchakán, en el estado de Campeche, se confirmó la presencia del AL. Con esta información se determinó la infección total en la Península de Yucatán. Para 1996, se estima que se han perdido aproximadamente 1 millón 200 mil palmeras por efecto del Amarillamiento Letal y la enfermedad ya se ubica en el estado de Tabasco (Almeyda *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 1996).

Es importante indicar que si bien todos los argumentos anteriores parecieran dar las bases para considerar la importancia que representa el AL, no hay que pasar por alto que además del cocotero esta enfermedad también afecta a otras palmas, incluyendo a plantas productoras de aceite y de la industria del sombrero y desde luego el efecto desfavorable que representa en el ámbito ecológico y sobre la industria turística.

2.2.2. Epidemiología.

Los primeros indicios de la literatura sobre el AL y enfermedades similares en palmas fueron frecuentemente basadas sobre un diagnóstico incierto. Ahora se sabe que al menos cuatro enfermedades de palma de coco en el Caribe fueron consideradas como una sola enfermedad la cual se conocía comúnmente como

"Pudrición del Cogollo". Además el daño causado por condiciones desfavorables de humedad, luminosidad, insectos y deficiencias nutricionales pudieron algunas veces haber sido erróneamente diagnosticadas como la enfermedad "Pudrición del Cogollo". Por lo tanto al realizar la revisión de los primeros reportes del AL, se debe tener cautela y las conclusiones basadas sobre esta información se debe considerar de una manera tentativa (Mc Coy, 1983).

El AL, apareció en algunos países de la región norte del Caribe donde virtualmente ha eliminado la variedad criollo-alto de cocotero. Solamente en Jamaica se estima la pérdida de 3 millones de palmas (Anonymous, 1986). Enfermedades similares se han reportado en el oeste de Africa (Dabek *et al.*, 1976), y más recientemente en Tanzania (Schuiling y Mpunami, 1990), donde se estima la muerte de 7 millones de palmas.

La enfermedad del cocotero en el oeste de Africa, presenta similitud con el AL conocido en América. La variedad conocida como Alto Africano del Oeste o Típico, es el principal cultivar de cocotero en esta región y es básicamente el mismo o muy similar al Alto Jamaica, el cual es el principal cultivar en la región del Caribe. Ambos cultivares son altamente susceptibles al AL en sus respectivas regiones (Harries, 1978). Los síntomas del AL, reportados de diferentes localidades de Africa y de América son idénticos (McCoy, 1976). En ambos casos se han observado Organismos Tipo Micoplasma en los tubos del floema de tejidos de palmas infectadas con el AL en Ghana (Dabek, *et al.*, 1976), Togo (Dollet y Giannotti, 1976), y Camerún (Dollet, *et al.*, 1977). Los tratamientos con oxitetraciclina en palmas infectadas con la enfermedad del Kaincopé en Togo, resultan en la remisión de los síntomas (Steiner, 1976), lo que apoya fuertemente la hipótesis que la enfermedad letal del cocotero en Africa es causada por un fitoplasma (McCoy *et al.*, 1983).

Algunos autores refieren la existencia de dos diferencias importantes entre la enfermedad letal del cocotero en Africa y el AL del Caribe: 1.- El cultivar Malayo Enano es altamente susceptible al AL en Africa, pero altamente resistente al AL en América (Addison, 1978); 2.- El patrón de dispersión del AL en Africa ha sido sugerido por medio de un vector de suelo más que por un vector en el aire (Steiner, 1976), y un insecto de hábito volador se ha señalado como vector del AL en América (Heinze, *et al.*, 1972; McCoy, 1976). En Florida, el insecto *Myndus crudus* Van Duzee, ha sido demostrado como el vector del AL. Con base en las diferencias

encontradas entre el AL de Africa y la región del Caribe, se plantean tres posibilidades : 1.- Dos especies o cepas diferentes de fitoplasmas pueden estar involucradas; 2.- La variedad Malayo Enano que desarrolla en el oeste de Africa puede representar una línea genética diferente a la que desarrolla en la región del Caribe; 3.- Los vectores del AL en Africa y en la región del Caribe son muy diferentes (McCoy *et al.*, 1983).

El AL no solamente se dispersa rápidamente si no que también elimina rápidamente. Las plantas afectadas mueren de 4 a 6 meses después del primer síntoma visible. Desde que el agente causal fue considerado como un parásito obligado, los árboles muertos no pueden servir como fuente de inóculo por un período largo de tiempo. Por lo tanto cualquier análisis epidemiológico debe considerar la tasa de remoción de plantas infectadas para calcular la tasa de dispersión de esta enfermedad.

La tasa de dispersión calculada simplemente sobre un número acumulativo de plantas enfermas puede subestimar la tasa de dispersión del AL de planta a planta, ya que la mayoría de las plantas infectadas se mueren y son removidas del lugar con seis meses de mostrar síntomas.

Los análisis epidemiológicos han sido usados como una herramienta para medir el grado de supresión de la enfermedad en experimentos de manejo de la enfermedad (McCoy *et al.*, 1976), y puede ser usado para la determinación del grado de resistencia en varios cultivares que son hospederos del agente causal (Van der Plank, 1963). El análisis epidemiológico ha incrementado el entendimiento de los procesos involucrados en la enfermedad, particularmente las relaciones con el vector, y ha permitido estimaciones de la duración de los períodos de infección y latencia. (McCoy *et al.*, 1983).

2.2.3. Etiología.

2.2.3.1. Aspectos taxonómicos del agente causal del Amarillamiento Letal del Cocotero.

En un estudio realizado en Jamaica por Leach (1946), durante los primeros años en que el interés por esta enfermedad creció y mucho antes de que se descubrieran los

micoplasmas, se concluyó que las posibles causas del AL podían deberse a un virus, problemas radiculares y/o deficiencias o toxicidad de algún elemento menor.

Chen (1966), al estudiar lo concerniente a las condiciones nutricionales de palmas de cocotero afectadas por el amarillamiento letal, no encontró evidencias de que se tratara de una deficiencia o toxicidad de algún elemento, pero si de que podía existir un desbalance de nutrimentos.

Finalmente Beakbane y colaboradores (1972); Heinze y colaboradores (1972); Plavsic-Benjac y colaboradores (1972), en estudios realizados por microscopía electrónica de palmas enfermas con AL detectaron OTMs en los elementos del floema y la ausencia de ellos en plantas sanas. Aunque morfológicamente los OTMs patogénicos de plantas son parecidos a los micoplasmas asociados con animales y otros hospederos (Tully y Whitcomb, 1979; Whitcomb y Tully, 1990), los primeros no han podido ser cultivados *in vitro,* por esta razón su origen evolucionario y diversidad genética es incierta (Namba *et al.*, 1993). Con base en lo anterior la identificación provisional de los OTMs fue basada casi completamente sobre el ámbito de hospederos, sintomatología de la enfermedad y las relaciones patógeno-vector (Lee y Davis, 1992).

Actualmente la clonación del DNA cromosomal y extracromosomal de muchos OTMs y su aplicación en la detección y comparación de estos patógenos a nivel de material genético por medio de hibridación molecular, amplificación de secuencias específicas por PCR, análisis de los productos amplificados por medio de enzima de restricción y pruebas inmunológicas, han sido usados para caracterizar a los OTMs de la clase Mollicutes que no pueden ser cultivados *in vitro* (Ahrens y Seemüller, 1992; Davis *et al.*, 1992; Deng y Hiruki, 1991b, Lee *et al.*, 1993a Lim y Sears, 1989; Petterson *et al.* 1994: Petterson *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1993; Zreik *et al.*, 1995).

De esta manera, Deng y Hiruki (1991b), mediante ensayos de hibridación de ácidos nucleicos y PCR determinaron que los OTMs que ocasionan la enfermedades de la Proliferación del Trébol y la Escoba de Bruja en Papa están genéticamente relacionados y son distintos de los OTMs que causan las enfermedades de Filodia del Trébol y el Amarillamiento del Aster.

Griffiths y colaboradores (1994), determinaron que los OTMs que afectan a 4 especies de Fresno y 2 especies de Lilac en 13 localidades desde Massachussetts y el sur de Quebec hasta Utha están estrechamente relacionados a las cepas AshY1 y AshY2 de Nueva York y propusieron que los OTMs tanto del Ash y Lilac Witches´-broom pertenecen al grupo del AshY pero que sus nombres deben ser mantenidos por separado.

Schneider y colaboradores (1993), al examinar el DNA de 52 OTMs extraídos de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas herbáceas y de plantas leñosas provenientes de 4 continentes, pudieron diferenciar 7 grupos y cerca del 60% de los OTMs quedaron comprendidos en el grupo I, al cual pertenece el fitoplasma causante del AL.

2.2.3.2. Morfología.

El interés del hombre por los micoplasmas inicio con la gran epidemia de la pleuroneumonía del ganado vacuno que se extendió por toda Europa en el siglo XIX. El organismo causal estaba presente en el pulmón de los animales afectados, pero no pudieron ser cultivados en condiciones de laboratorio y por el hecho de pasar a través de filtros para bacterias fueron considerados como virus. Cuando finalmente el agente causal de la pleuroneumonía pudo ser cultivado en un medio artificial (Nocard *et al.*, 1898), se pudo determinar que este no era un virus y que era más pequeño que una bacteria, su forma era variable desde pequeños cuerpos redondos a filamentosos, en consecuencia los micoplasmas fueron colocados en una clase biológica única entre las bacterias y los virus.

Los micoplasmas y los fitoplasmas han sido considerados como los organismos celulares más simples y pequeños, que no poseen pared celular ni estructuras internas y están constituidos solamente de DNA y ribosomas (McCoy *et al.*, 1983).

El fitoplasma de la palma de cocotero es variable en forma (se pueden observar formas esféricas y filamentosas con un diámetro de 1.2 a 500 micras), sin pared celular, con una unidad de membrana trilaminar, poseen ribosomas, DNA sin estar organizado en un núcleo (Simone, 1992).

McCoy y colaboradores (1980), señala que en la palma *Phoenix canariensis*, proveniente de Texas , se encontraron fitoplasmas que presentaban la forma filamentosa y no se encontraron formas espirales. Dabek y colaboradores (1976), citan que los fitoplasmas encontrados en *Cocos nucifera* afectadas por la marchitez del Cabo St. Paul y la enfermedad de Kaincopé en Africa occidental, presentaron formas esféricas de aproximadamente 100-800 nm. las formas ovoides ó aquellas en aparente fisión binaria podían exceder la micra de longitud; poseían la típica unidad triple de membrana rica o pobremente poblada de ribosomas y el DNA parecía estar organizado en forma fibrosa.

2.2.3.3. Fisiología.

Existe relativamente poca información sobre la fisiología del AL. Estudios sobre el contenido mineral en plantas sanas y palmas enfermas han revelado poco o ninguna diferencia entre ellos (Fiskell *et al.*, 1959). Dabek y Hunt (1976), encontraron que las hojas amarillas se tornaron verdes después del tratamiento con ácido giberelico o cobre, zinc o sales de hierro. Lo anterior llevó a estos autores a sugerir que un mal balance hormonal podía en parte ser responsables de los síntomas del AL. Estos mismos autores reportan que la aplicación exógena de aminoácidos incrementa la longevidad de las hojas sanas, pero no de las hojas enfermas, sugiriendo un decremento en la tasa del metabolismo de proteínas en las hojas de las palmas enfermas con AL. León y colaboradores (1996), indican que en palmas con síntomas de AL, la velocidad de senescencia de las hojas se incrementa sustancialmente en relación a las palmas sanas, en palmas enfermas todas las hojas mueren en 2 meses y en palmas sanas muere una hoja por mes.

McDonough y Zimmermann (1979), reportaron que la fluctuación diurna en el potencial hídrico normalmente observado en plantas sanas estuvo ausente en palmas enfermas; este fenómeno también fue observado en palmas aparentemente sanas hasta 2 semanas previas a la aparición de los primeros síntomas.

Charudattan y McCoy (1975), reportan la presencia de un antígeno en la savia del floema de palmas de cocotero y de manila enfermas que no está presente en el exudado de plantas sanas. Lo anterior indica que la proteína puede estar presente en el tejido de las plantas enfermas. Mediante un análisis electroforético de

proteínas en palmas de manila sanas y enfermas, se verificó la presencia de la proteína característica; sin embargo, no se detectó en cocotero, lo que indica diferencia en la respuesta a la infección por fitoplasmas de acuerdo a la especie en particular.

En un intento para determinar los factores fisiológicos relacionados a la susceptibilidad o resistencia de palmas al AL, se realizó un estudio sobre los patrones de distribución de aminoácidos libres en las hojas de 18 especies y variedades de palmas. Los exudados del floema colectados de 3 especies y variedades de palmas fueron examinados por Barcelon y colaboradores (1983), y observaron correlación entre la presencia de arginina libre y suceptibilidad al AL. La arginina fue rápidamente detectada en muestras de palmas susceptibles y no detectada en palmas aparentemente inmunes al AL. La correlación entre la presencia de arginina y la susceptibilidad al AL puede ser considerada no solamente como una alternativa para la formulación de medios de cultivo para los fitoplasmas si no también como una manera de tamizado para la selección de cultivares con características de resistencia al AL; sin embargo, no hay que perder la perspectiva de que los altos niveles de arginina detectados en las palmas susceptibles pueda ser un subproducto de la infección y no una característica asociada a la susceptibilidad.

2.2.3.4. Relaciones hospedero-parásito.

Parthasarathy (1974), indica que los fitoplasmas de *C. nucifera*, *V. merrilli* y *P. pacifica*, se confinan al protofloema recién maduro y a los elementos tempranos del metafloema; raramente se encuentran en los elementos cribosos maduros del metafloema tardío; además, aparentemente los fitoplasmas se mueven de un elemento criboso a otro a través de los poros de las placas cribosas con la corriente de asimilación. Estudios complementarios han demostrado su alojamiento cerca de los meristemos apicales en la base de los pecíolos jóvenes que aún no emergen. Aunque se presentan elementos cribosos completamente llenos de fitoplasmas en unos pocos haces vasculares, en general la concentración es baja (Thomas, 1979).

Una de las reacciones que los fitoplasmas causan en las palmas enfermas con el AL, es el cierre de estomas (Matteoni y Sinclair, 1983). León y colaboradores (1996), señalan que no hay cambios en el potencial hídrico, ni en el potencial osmótico, ni en el turgor de las hojas durante los primeros estadíos de la enfermedad (síntomas no

visibles-amarillamiento de las hojas básales), sin embargo, estos parámetros fisiológicos decrecen significativamente a partir de que se observa el amarillamiento de las hojas localizadas a la mitad de la corona.

2.2.4. Sintomatología.

El término de AL fue usado por primera vez para indicar a una enfermedad específica de las palmas, en Jamaica (Nutman y Roberts, 1955), y fue subsecuentemente aplicada a otras enfermedades de sintomatología similar en palmas de cocotero en otros países. En términos generales el nombre de "Amarillamiento Letal", se refiere a la decoloración progresiva de las frondas de las palmas, que culmina con la muerte de la planta (Maramorosch y Hunt, 1981).

Carter (1966), mencionó que las palmas de cocotero no eran susceptibles al AL hasta que tenían unos tres años de edad, contando el tiempo desde que eran trasplantados fuera de los almácigos y que en raras ocasiones se habían conocido palmas que se infectaran a los 18 meses.

Dabek (1974), citado por Oropeza y colaboradores, (1991), reportó que el agente causal del Amarillamiento Letal requiere de 4 a 9 meses de período de incubación antes de que se presenten los primeros síntomas.

Los primeros síntomas del AL en palmas de cocotero madura es la prematura caída de muchos o todos los cocos de diferentes tamaños y la muerte y decoloración de las inflorescencias, que es muy notorio cuando se abren las espatas, las cuales no llegan a flores. Los frutos que primero caen son los de media corona o cocos de agua, seguidos de los frutos más jóvenes y por último los frutos ya maduros (McCoy *et al.*, 1983; Villanueva, 1990, Simone, 1992). Posteriormente las hojas se tornan amarillas , usualmente iniciando con las hojas más viejas y avanzando hacia la corona. En algunos casos, una sola hoja de la mitad de la corona se torna amarilla, dando la apariencia de flacidez. Las hojas amarillas son notablemente túrgidas, no se notan flácidas como en el caso de algunas enfermedades. Las hojas amarillas posteriormente se tornan cafés se secan y quedan colgando, caen rápidamente o son fácilmente arrancadas.

La muerte de la yema apical ocurre más o menos cuando la mitad de las hojas se tornan amarillas; la hoja nueva que emerge se colapsa y puede quedar colgando en la corona. Finalmente todas las hojas caen quedando el tallo desnudo el cual se le conoce como "poste telefónico". Los árboles infectados usualmente mueren de 3 a 6 meses después de la aparición de los primeros síntomas (McCoy *et al.*, 1983). Basándose en la serie de síntomas indicados anteriormente McCoy elaboró una escala de severidad de la enfermedad que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Escala para determinar el grado de avance de la enfermedad Amarillamiento Letal del Cocotero.

Categoría	Rango numérico	Síntomas
	0	Sano o en etapa de incubación
Primario	1	Caída de frutos solamente[1]
	2	Una inflorescencia necrótica[1]
	3	Dos o más inflorescencias necróticas[1]
Amarillamiento	4	Amarillamiento solamente en las hojas basales
	5	Amarillamiento en las hojas básales y a la mitad de la corona
	6	Todas las hojas amarillas, la hoja bandera buena
Muerte	7	Hoja bandera muerta, algunas hojas pueden estar verdes
	8	Hoja bandera muerta, todas las hojas amarillas
	9	Palma muerta (poste telefónico)

1= Puede o no tener una hoja amarilla flácida en el centro de la corona.

En otras especies de palmas, los primeros síntomas generalmente son similares a los que se observan en el cocotero esto es, la caída prematura de los frutos y la

necrosis de las inflorescencias nuevas. La etapa en la cual la necrosis de la hoja ocurre y la forma de la decoloración difiere entre especies. (McCoy *et al.*, 1983).

En el caso de las palmas que no presentan la sintomatología clásica, como es el caso de *Borassus flabellifer* L., *Chrysalidocarpus cabadae* H. E. Moore, *Phoenix* spp. y *Veitchia* spp., exhiben manchas cafés en lugar del amarillo brillante. Aunque el chupamiento de los frutos y la decoloración de las inflorescencias son similares a las del cocotero, la decoloración de las frondas no es distintivo. La primera evidencia de síntomas foliares es la aparición de manchas cafés a lo largo de los márgenes de las pinas. Las inflorescencias que aún no se abren pueden retorcerse. En las especies de *Pritchardia*, la muerte de los retoños foliares es el primer síntoma al igual que en las palmas del género *Phoenix*. En *Borassus* la decoloración es amarillenta, mientras que en *Phoenix* es grisácea y en *Veitchia* se tornan de colr café (Simone, 1992), citado por Leza, (1993).

2.2.5. Transmisión.

Un componente epidemiológico de gran relevancia en cualquier enfermedad es su transmisión, en el caso del AL aunque se han realizado una serie de experimentos relacionados con este factor en algunos casos no han sido concluyentes y existe todavía muchas dudas por discernir (McCoy *et al.*, 1983).

Al inicio de los 80´s, se sospechó que los insectos estaban asociados con el AL. Las primeras observaciones en Cuba sugirieron que el AL posiblemente era causado por toxina inyectadas a las palmas por ciertos insectos al alimentarse sobre ellas. Especies de escarabajo (Coleópteros), insectos verdaderos (Heterópteros) e insectos escama (Coccoideos), se sospecharon como vectores por varios investigadores (De La Torre, 1906). Un segundo intento hacia el conocimiento de la posible relación entre insectos y el AL, fue basado sobre la creencia que un hongo o bacteria asociado con el decaimiento del cogollo de las palmas en estados tardíos de la enfermedad era el organismo causal.

Diversas clases de insectos son atraídos por palmas afectadas por AL. Los dípteros son los insectos que más consistentemente se encuentran en cogollos de palmas enfermas. Debido a esto, fueron los primeros insectos en ser señalados como posibles vectores del AL (Johnston, 1912). Con base en las observaciones realizadas

sobre la errática dispersión de la enfermedad en plantaciones de cocotero Jhonston (1912), supuso fuertemente que un insecto vector podría estar involucrado, y propuso que insectos voladores o pájaros como formas probables de dispersión del AL (McCoy *et al.*, 1983).

Bruner y Boucle (1943), sugirieron que la enfermedad probablemente era causada por un virus y que el vector eran probablemente especies de trips (Thysanoptera) o del orden Homoptera. Los trips se pueden localizar en las hojas de las palmas de coco pero no se alimentan de ellas, y se les asocia alimentándose del néctar de las flores. Como el AL también afecta palmas de cocotero jóvenes que todavía no desarrollan flores, Bruner y Boucle (1943), desecharon la hipótesis de los trips como vectores y sugirieron a Homópteros como los posibles vectores del AL.

Bruner y Boucle (1943), descartaron a las escamas (Homópteros) como vectores del AL, porque no eran plagas comunes en las palmas de cocotero, además no es conocido que las escamas trasmitan virosis. Su sospecha fue sobre una especie de áfido no identificada, que aunque no muy común sobre el cocotero, fue la única especie del orden Homoptera en Cuba que completaba su ciclo de vida en el cocotero. Los reportes de Bruner y Boucle, tuvieron poca influencia en trabajos posteriores y aunque la teoría del virus-insecto vector fue cuestionada por algunos autores (Martyn, 1949; Mijailova, 1967), también fue favorecida por investigadores desde los 40´s hasta los 60´s (Carter y Suah, 1964; Ciferri, 1929; Corbett, 1959).

En los principios de los 60´s, se iniciaron las pruebas de transmisión en Florida y Jamaica. Las pruebas que se realizaron durante ese período fueron basadas sobre la hipótesis de que el AL era ocasionado por un virus (McCoy *et al.*, 1983). Por lo tanto el orden Homoptera fue el más estudiado, debido a que muchos virus de plantas son transmitidos por especies de este grupo taxonómico de insectos.

Las mosquitas blancas (Aleyrodidae), fueron intensamente investigadas, además de especies de escamas, áfidos, trips y dípteros. Las mosquitas blancas se consideraron como posibles vectores debido a que en Jamaica algunas especies completan su ciclo de vida sobre el follaje del cocotero. Durante los 60´s estos insectos fueron utilizados en experimentos de transmisión por diversos investigadores. Sin embargo, cuando se descubrió en 1972 que Organismos Tipo Micoplasma (OTMs), estaban asociados como agente causal del AL, las pruebas de

transmisión con estos insectos se eliminaron, ya que no existen reportes de que las mosquitas blancas sean vectores de OTMs (Tsai, 1979).

Un millón o más de insectos fueron involucrados en estas pruebas y también se realizaron experimentos para determinar si los nemátodos podían transmitir el agente causal del AL, o si causaban directamente la enfermedad (McCoy *et al.*, 1983).

La evidencia de que el AL es transmitido por insectos se obtuvo, cuando algunas palmas localizadas en áreas de alta ocurrencia del AL, se mantuvieron en jaulas sin contacto con insectos y no adquirieron la enfermedad sino hasta después de que las cajas fueron removidas (Heinze *et al.*, 1972; Rommey, 1972). Aunque los experimentos de transmisión realizados durante los 60´s no concluyeron sobre cual era el o los vectores del AL, tampoco se pudo descartar ninguna de las especies en estudio.

De particular interés fueron los experimentos realizados por Heinze y Schuiling, en los cuales dos palmas contrajeron el AL cuando fueron expuestas a la mezcla de *Omolicna cubana* Myers, *Myndus crudus* Van Duzee y otras especies de insectos no identificadas que se encontraban en plantaciones de cocotero. Resultados similares fueron obtenidos por R.K. Latta y P. McKienzie con mezclas de especies de las familias Cicadellidae y Fulgoroidea (Johnson y Eden-Green, 1978). Johnson y Eden-Green (1978), reportan a *Myndus crudus*, aunque no fue identificado en pruebas de transmisión antes de 1969, estos insectos estuvieron presentes en las colecciones de las áreas donde las pruebas se llevaron a cabo.

Los insectos vectores de OTMs pertenecen subórdenes del orden Homoptera (Kranz *et al.*, 1977; Tsai, 1979), que a continuación se mencionan:

Suborden: Coleorrhyncha: Un pequeño y primitivo grupo taxonómico confinado al hemisferio sur.

Suborden: Auchenorrhynchia.

Superfamilia: Cicadoidea. Familias: Cicadidae, Membracidae, Cercopidae, Cicadellidae.

Superfamilia: Fulgoroidea. Familias: Delphacidae, Derbidae, Cixiidae, Flatidae, más 16 familias adicionales.

Suborden: Sternorrynchia

Superfamilias: Psylloidea, Aleyrodoidea, Aphidoidea y Coccoides.

La vasta mayoría de especies de insectos conocidos como vectores de OTMs, pertenecen a la familia Cicadellidae. Unas pocas especies pertenecen a las familias Delphacidae y Cixiidae y una especie a la familia Psyllidae. Especies de Coccoidea y Aphydoidea han sido reportadas como vectores de OTMs asociados con enfermedades de plantas, pero tales reportes no han sido lo suficientemente sustentados (Tsai, 1979).

De acuerdo a resultados de inspecciones de campo realizados en Jamaica desde 1972, cinco especies de la superfamilia Fulgoroidea fueron encontrados comúnmente asociados con las palmas de cocotero. En el sur de Florida, dos especies de esa misma superfamilia (*Myndus crudus* y *Cedusa inflata* Ball), y un membracido (*Idioderma virescens* Van Duzee), fueron encontrados comúnmente asociados al cocotero (Howard, 1980; Howard y McCoy, 1980). *Myndus crudus* es la única especie del suborden Auchenorrynchia comúnmente encontrada en palmas de cocotero, tanto en Jamaica como en Florida y ha sido extensamente probada como vector del AL. Los cicadellidos son ocasionalmente colectadas de palmas en Florida y Jamaica; sin embargo, en Florida, las palmas pequeñas que desarrollan en pastizales infestados con cicadelidos usualmente están libres de estos insectos (Howard, datos no publicados).

2.2.5.1. Evidencias de *Myndus crudus* como vector del Amarillamiento Letal del cocotero.

M. crudus, fue descrita por Van Duzee, de especies colectadas en el este de Jamaica en 1907 (Kramer, 1979). Sin embargo, esta especie fue registrada en la fauna de plantaciones de cocotero por diversos investigadores en Jamaica hasta 1969.

Myndus crudus Van Duzee, es la especie más común del orden Homóptera en palmas de coco y en otras especies de palmas susceptibles al AL, tanto en Florida (Howard y Mead, 1980) como en Jamaica (Schuiling, 1976). Los adultos de *M.*

crudus, se alimentan sobre el follaje de las palmas, pero ovipositan en el suelo (Eden-Green, 1978); las ninfas desarrollan bajo el suelo y se alimentan de las raíces de los pastos , uno de los más comunes es el San Agustín. Aunque *M. crudus* se incluyó en las primeras pruebas de transmisión del AL, en Florida (Tsai, 1975) y Jamaica (Dabek y Waters, 1980), no se logró la transmisión del patógeno del AL. Sin embargo, con base en evidencias de campo que favorecían a *M. crudus* como vector del AL, se iniciaron estudios sobre su biología y pruebas de transmisión bajo condiciones experimentales diferentes a las que previamente se habían realizado.

Estudios sobre insectos del suborden Auchenorrhyncha, se iniciaron rápidamente cuando se descubrió que los OTMs estaban asociados con el AL. En trabajos realizados en Florida, *M. crudus* fue la única especie del suborden Auchenorrhyncha colectada en todas las localidades donde el AL había sido reportado (Howard y Mead, 1980), y fue la especie más abundante sobre palmas maduras en las Islas Canarias (Howard, 1980). Basándose en datos de muestreos realizados en forma simultánea en áreas afectadas y no afectadas por el AL, la poblaciones de *M. crudus*, fueron 40 veces mayores en las áreas afectadas. En ciertas áreas donde se aplicaron insecticidas semanalmente durante 15 meses las poblaciones de *M. crudus,* se redujeron y la tasa de dispersión del AL disminuyó; estos resultados se interpretaron como evidencia de que un insecto (posiblemente *M. crudus)*, fuese el vector del AL (Howard y McCoy, 1980). La evidencia más convincente de que *M. crudus* es un vector del AL, fue reportado por Harrison y Oropeza (1997), quienes detectaron al fitoplasma causante del AL en *M. crudus* por medio de PCR.

2.2.5.2. Primeras pruebas de transmisión por *Myndus crudus*.

Experimentos de adquisición y transmisión controlada con *M. crudus* fueron realizados en Florida (Tsai, 1977). Insectos en estado ninfal y adultos se alimentaron sobre palmas de cocotero enfermas o sobre partes del cogollo y raíces obtenidos de palmas enfermas y en membranas con savia del floema colectada de palmas de cocotero enfermas. Los insectos fueron liberados para que se alimentaran sobre palmas de cocotero de 2.5 m de altura que se encontraban encerradas en cajas, sin embargo, muy pocos insectos sobrevivieron más de 3 semanas sobre las palmas, ninguna de las palmas evaluadas desarrolló los síntomas del AL después de un año de mantenerse en las cajas.

Pruebas adicionales en las cuales se inyectó a *M. crudus* la savia de palma manila enferma con AL, fracasaron en la transmisión de la enfermedad. Los intentos para transmitir el AL de cocotero a palmas manila y viceversa también fracasaron, así como también la transmisión a teresita. En total más de 70, 000 chicharritas fueron usadas en estas pruebas , pero no se tuvo una transmisión verificable (McCoy *et al.*, 1983).

2.2.5.3. Pruebas de transmisión replicada.

Un experimento para la prueba de transmisión fue diseñado, plantándose una planta de cocotero, una de palma manila y una de la palma Thurston en cada una de diez cajas. Además dos especies de pasto fueron establecidos por caja *Paspalum notatum* y el pasto san Agustín. Las palmas fueron obtenidas de áreas libres del AL y los pastos libres de insectos. Cinco cajas recibían introducciones de *M. crudus* y las otras cinco servían como control. El experimento tuvo un tiempo de duración de 34 meses y se encontró que al menos una palma por caja fue infectada por el AL. En dos de las cajas las tres especies de palmas contrajeron la enfermedad. Tres de las cinco palmas de cocotero, cinco de siete palmas de Manila, y dos de tres palmas Thurston en las cajas con chicharritas contrajeron la enfermedad. Estos resultados aportaron una fuerte evidencia de que *M. crudus* es un vector del AL y además se determino que la enfermedad en estas tres especies de palmas son causadas por el mismo patógeno (McCoy *et al.*, 1983).

Estos experimentos difieren de otros estudios previos de transmisión en lo siguiente: además de las palmas de cocotero, palmas de otras especies fueron probadas, se plantaron pastos dentro de las cajas como hospederos alternantes en un intento de incrementar la longevidad de los insectos, y los insectos fueron capturados usando una técnica para reducir la posibilidad de daño (McCoy *et al.*, 1983).

Actualmente se están realizando con éxito trabajos de transmisión para conocer la respuesta de algunas especies de *Fraxinus* desarrollando en diferentes portainjertos a la infección por fitoplasmas del grupo del Ash Yellows (Sinclair *et al.*, 1997) y para determinar la multiplicación en sus hospederos además de la expresión

de síntomas. de organismos muy relacionados a los OTMs como los Spiroplasmas (Foissac *et al.*, 1997).

2.3. Diagnóstico.

Las enfermedades producidas por fitoplasmas y Organismos Tipo Micoplasma en general, son diagnosticadas con base en los hospederos y a los síntomas inducidos en ellos. En el caso del AL su diagnóstico común se basa principalmente en la sintomatología en campo; sin embargo, este diagnóstico se realiza en etapas avanzadas, por consecuencia el método es tardío y poco confiable debido a la similitud en la sintomatología del AL con la presentada por otras enfermedades que afectan al cocotero. El diagnóstico de campo también puede ser complicado por otros factores por ejemplo en plantas que están en estado juvenil carecen de la posibilidad de un diagnóstico por la sintomatología en flores y frutos.

La microscopía electrónica fue la primera técnica que reveló la infección y/o presencia de OTMs en plantas e insectos (Doi *et al.*, 1969). Esta técnica no es factible de utilizarse cotidianamente en estudios de campo para identificar en reservorios de plantas o insectos vectores debido al alto costo y a que la infección de los OTMs son morfológicamente indistinguibles. Esto ha impedido significativamente el estudio epidemiológico de las enfermedades ocasionadas por estos microorganismos, además el patógeno no es detectado por microscopía electrónica cuando se encuentra a bajas concentraciones en el tejido examinado (Harrison *et al.*, 1994b). En consecuencia para estudios ecológicos, taxonómicos y de filogenia de los OTMs es necesario el desarrollo de ensayos sensitivos y específicos.

En virtud de que los OTMs se encuentran asociados a los tubos del floema, su presencia puede ser detectada en tejido fresco o químicamente conservado por medio de DAPI (4´-6´Diamino-2-fenilindole), el cual es un reactivo que se une al DNA y fluorece bajo radiación ultravioleta (Russel *et al.*, 1975); sin embargo, al igual que el método de la microscopía electrónica su sensibilidad se reduce grandemente cuando la concentración del patógeno es baja en los tejidos analizados (Harrison *et al.*, 1994b), sobre todo en plantas leñosas (Ahrens y Seemüler, 1992).

Recientemente, el surgimiento de las poderosas técnicas de recombinación del DNA sin duda alguna ha propiciado no solamente una época dorada en la Biología

Molecular, sino en las Ciencias Biológicas en general. Estas técnicas son extremadamentes específicas, rápidas y con alto poder de resolución, en consecuencia se constituyen como excelentes herramientas en el diagnóstico de enfermedades y/o en la detección de los organismos causales (Roy, 1989). La detección usando ácidos nucleicos como blanco es más específico que la detección inmunológica, ya que está basado en secuencias nucleotídicas específicas del organismo causal (McLaughlin *et al.*, 1986), lo que permite la detección directa del patógeno. La sensibilidad alcanzados con estos métodos han llegado a niveles inimaginables.

El uso de anticuerpos monoclonales (Bonnet *et al.*, 1990; Chen y Jiang, 1988; Lee y Davis, 1992, Lee *et al.*, 1993a) y la extracción de OTMs del tejido de sus hospederos acoplado con el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, han hecho posible la clonación del DNA de OTMs (Harrison *et al.*, 1991; Kirkpatrick *et al.*, 1987; Nakashima *et al.*, 1991). En particular la hibridación de ácidos nucleicos utilizando como sondas los fragmentos del DNA de OTMs clonados al azar, se constituyen como un medio sensible y confiable para la detección de OTMs tanto en plantas (Davis *et al.*, 1988; Harrison *et al.*, 1992), como en insectos vectores (Davis *et al.*, 1988; Kirkpatrick *et al.*, 1990; Rahardja *et al.*, 1992) y para estudios de distribución y ecología (Kirkpatrick *et al.*, 1990; Kuske y Kirkpatrick, 1992). Algunas sondas, presumiblemente representan secuencias altamente conservadas del DNA cromosomal de OTMs, y detectan un amplio rango OTMs, mientras que otras solamente detectan a ciertos patógenos en específico (Harrison *et al.*, 1993).

En contraste a los métodos convencionales como la microscopía electrónica y el marcaje con DAPI utilizados en el diagnóstico de algunas enfermedades ocasionadas por OTMs (Hibben *et al.*, 1991), los métodos de diagnóstico basados en el DNA no experimentan restricciones por el tamaño del patógeno o por la cantidad de tejido utilizados en el diagnóstico (Davis y Lee, 1993). Por ejemplo, los ensayos de detección del OTM causante del AL han sido consistentes a pesar de las bajas concentraciones del patógeno en las flores y raquis de las inflorescencias de cocotero parcialmente necrosadas. La detección con muestras de raíces y hojas han sido considerablemente menos consistente, lo cual indica una distribución desigual del patógeno en la planta (Harrison *et al.*, 1993).

Por otra parte, el método de hibridación y el análisis de la longitud del polimorfismo por fragmentos de restricción del DNA cromosomal de los OTMs han hecho posible la diferenciación de algunos OTMs, además de elucidar sobre sus relaciones filogénéticas (Davis *et al.*, 1988; Kuske *et al.*, 1990; Marcone *et al.*, 1997). De esta manera se han establecido las bases para agrupar a los OTMs, en algunos grupos o cepas (Lee *et al.*, 1992; Okuda *et al.*, 1997).

Una de las técnicas moleculares de mayor aplicabilidad actualmente es la conocida como "Reacción en Cadena de la Polimerasa" que basa su popularidad y poderío en la especificidad, sensibilidad y rapidez de la técnica. Por ejemplo, en condiciones ideales, basta una molécula del ácido nucleico del organismo deseado, para detectar la presencia del mismo en unas cuantas horas.

El término "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR), se aplica al proceso bioquímico *in vitro* , mediante el cual las cadenas individuales del DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso. Esta técnica fue inventada por Karry B. Mullis en 1985 (Mullis, 1990). Ese mismo año la PCR fue perfeccionada por otros investigadores y se aplicó exitosamente en el diagnóstico clínico de la anemia de células falciformes (Marx, 1985; Saiki *et al.*, 1985). A partir de entonces el desarrollo de ensayos basados en la utilización de la PCR se han incrementado notablemente y su aplicación a la fecha es cotidiana en las diferentes áreas de las Ciencias Biológicas.

La tecnología de PCR permite la detección de un gen de secuencia conocida presente en el genoma o en mezclas de genomas aún cuando la secuencia que es buscada se encuentre en concentraciones muy bajas (Saiki *et al.*, 1988), y se pueden detectar diferentes microorganismos como los micoplasmas en extractos crudos de la planta.

Por otra parte mediante la técnica de PCR se requiere solamente de cantidades pequeñas de tejido infectado, se evitan los largos, tediosos y frecuentemente ineficientes procedimientos de separación del DNA del agente causal y del hospedero y se reduce el tiempo de trabajo. Además esta metodología permite la

obtención de sondas para el diagnóstico específico de ciertas enfermedades (Firrao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993), y se pueden identificar directamente a los diferentes OTMs cuya secuencia ha sido amplificada si se usan iniciadores específicos (Malinowski *et al.*, 1996; Schneider y Gibb, 1997; Stanoz *et al.*, 1997).

Adicionalmente la técnica de PCR, ha manifestado un gran avance en la capacidad para detectar e identificar si más de un tipo de OTM esta asociado con una determinada enfermedad o si una planta o insecto hospedero es doblemente infectado por un segundo OTM (Alma *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Marcone *et al.*, 1996; Namba *et al.*, 1993).

2.4. Alternativas de manejo de la enfermedad.

2.4.1. Del patógeno.

El combate del Amarillamiento Letal, es posible mediante un programa integrado que incluye medidas de resistencia, erradicación y cuarentenas (McCoy *et al.*, 1983). Se pueden realizar inyecciones de oxitetraciclina al tronco de la palma, con lo cual se logra detener el avance de la afección, sin embargo, el efecto no es permanente y considerando que solamente dura de 3 a 4 meses, el costo de este antibiótico es muy alto, por consecuencia su uso no es recomendable para cultivos extensivos, por lo que su aplicación se restringe a palmas de un alto valor turístico o estimativo (Villanueva, 1990).

El grado de respuesta al tratamiento con antibiótico varían mucho con la edad de la planta, la severidad de los síntomas, el método de tratamiento y el tipo de tetraciclina aplicada. La respuesta también es de duración limitada, se necesitan varias aplicaciones para mantener la reducción de síntomas. La reducción de los síntomas se caracteriza porque el crecimiento no se acompaña de daños, aunque los tejidos afectados no recuperan su forma normal, sólo las flores, hojas y tallos nuevos son normales (McCoy, 1982).

La erradicación por si misma nunca evitará la diseminación del AL; sin embargo, en las primeras etapas de la enfermedad, la rápida remoción de las palmas enfermas puede tener un papel importante para disminuir la rápida dispersión de la enfermedad (McCoy *et al.*, 1983). Las cuarentenas son medidas regulativas

diseñadas para prevenir el movimiento indiscriminado de palmas infectadas o vectores hacia áreas libres de la enfermedad. Cada una de estas medidas son recomendadas comúnmente para el combate del AL; sin embargo, la obtención de material resistente al AL, se constituye como la única alternativa verdaderamente viable para la convivencia con el AL (McCoy *et al.*, 1983).

2.4.2. Del vector.

La tasa de dispersión de las enfermedades que poseen un insecto vector dependen en parte de la densidad de población del vector o de los vectores. Sin embargo, pocas enfermedades de plantas que poseen un vector han podido ser combatidas efectivamenteaplicando medidas contra sus vectores (McCoy *et al.*, 1983). En el caso del AL el grado de infección se ha logrado disminuir mediante la aplicación de insecticidas como el Diazinón y el Dimetoato (Villanueva, 1990).

Las posibilidades del uso de entomopatógenos o enemigos naturales contra el vector se han estudiado en México, encontrándose adultos parasitados con el hongo *Hirsutella* en Quintana Roo, Yucatán Veracruz y Guerrero, exhibiendo una frecuencia de parasitación del 58%. En Centro América se ha observado hasta un 90% de parasitismo por un hongo aún no identificado. Además de que se ha detectado a un parasitoide y algunas hormigas depredadoras de las ninfas, desafortunadamente poco se investiga al respecto (Villanueva, 1990).

El uso de variedades resistentes es el único método para combatir problemas fitosanitarios en muchos cultivos. En le caso del AL las variedades de cocotero como el Enano Indio, Enano Ceilán, Enano Fiji y Rey han demostrado una alta resistencia con menos del 10% de plantas con síntomas. Otras variedades como el Alto Bougainville, Alto Kar Kar, Alto Malayo, Alto del Valle Markham, Alto de Panamá, Enano Malayo y el híbrido Maypan exhiben niveles moderados de resistencia (Simone, 1992). Oropeza (comunicación personal), menciona que el enano malayo y el híbrido del Maypan presentan alta resistencia al AL.

Se considera que México posee una amplia diversidad del germoplasma de cocotero, producto de introducciones antiguas y la hibridación e infiltración genética de formas contrastadas. Los cocoteros en las costas del Golfo corresponden al grupo Africano, mientras que en el Pacífico existe un enjambre conformado

presumiblemente por cocoteros emparentados con los grupos Malayo-Tahilandés; Melanesico y Polinesico (Zizumbo, 1993). De tal manera que se piensa que el impacto del AL será diferencial entre ambas regiones, es decir severa en la costa del Golfo y menor en la costa del Pacífico. Por consecuencia es de primordial importancia caracterizar detalladamente la variación y su evaluación en las zonas afectadas por el AL de manera tal que permita seleccionar material para los programas de mejoramiento genético (Zizumbo, 1993).

Capítulo 3
MATERIAL Y METODOS

3.1. Ubicación del lugar de trabajo.

El trabajo de investigación se divide en dos partes: trabajo de campo y trabajo de laboratorio. El trabajo de campo corresponde a las diferentes regiones del país donde se colectaron las muestras vegetales, tales regiones son descritas en el apartado de colecta de muestras. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Universidad Autónoma de Nuevo León (INIFAP-UANL), ubicado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

3.2. Colecta de muestras.

Las muestras de cocotero se colectaron en diferentes regiones afectadas por el Amarillamiento Letal En el estado de Campeche se colectaron muestras en los municipios de Champotón, Escárcega y el Carmen; en el estado de Yucatán en el municipio de Progreso; en el estado de Tabasco en el municipio de Paraíso. Los órganos de la planta colectados fueron; el meristemo apical, inflorescencia, hojas maduras e inmaduras no emergidas, tallo y fruto. Las muestras fueron tomadas de plantas que mostraban los síntomas típicos del ataque del Amarillamiento Letal y también se colectaron muestras de plantas asintomáticas. En el municipio de Tampico en el estado de Tamaulipas, se colectaron las mismos órganos de palmas de cocotero sanas. Esta última, es una región donde la enfermedad del Amarillamiento Letal no ha sido reportada.

Adicionalmente se colectaron muestras de diversas especies vegetales que mostraban síntomas típicos ocasionados por fitoplasmas. Lo anterior con la finalidad de evaluar la especificidad de apareamiento de los iniciadores diseñados en este estudio con este grupo de patógenos. En el estado de Campeche también se colectaron muestras de palma jipi (*Caludovica palmata* R.); en el Estado de México se colectaron muestras de cempaxúchitl (*Tagetes erecta* L); en el estado de Coahuila

se colectaron muestras de papa (*Solanum tuberosum* L.); en el estado de Nuevo León se colectaron muestras de teresita (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) y, en el estado de Tabasco se colectaron muestras de yuca (*Manihot esculenta*). En todos los casos se colectaron muestras de plantas con síntomas y plantas sin síntomas, las cuales se consideraban sanas y se tomaron como testigos negativos.

3.3. Extracción del DNA.

Para la extracción del DNA genómico total (incluye el DNA de la planta y del patógeno), se partió del protocolo desarrollado en el laboratorio de Patología Molecular INIFAP-UANL (Leal Klevezas *et al.*, 1995), el cual funcionó en forma adecuada para obtener DNA de buena calidad y en cantidad suficiente para ser utilizado en las pruebas de PCR. Para algunos órganos de la palma de cocotero (hojas maduras, inflorescencias emergidas, tallo y raíces), y otras especies como cempaxúchitl y la papa, que tienen un alto contenido de compuestos fenólicos, fue necesario optimizar la técnica de extracción descrita por Rogers y Bendich (1985; 1988) y Doyle y Doyle (1990), para obtener DNA de buena calidad y ser utilizado con éxito en las pruebas de PCR.

a). Metodología para la extracción del DNA genómico de especies vegetales (Modificado de Leal-Klevezas *et al.*, 1995).

Se tritura un gramo de tejido fresco en mortero en presencia de nitrógeno líquido y se transfiere a un tubo de centrífuga y se le agrega 800µl de solución de lisis (2% Tritón X 100, 4% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) y 800µl de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se homogeniza la solución y se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa es transferida a un tubo nuevo, se le agrega un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo, se le agrega 0.5 vol. de acetato de amonio 7.5 M, se mezcla por inversión, se deja en hielo durante 10 min y se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se le agrega 0.5 vol. de isopropanol y se deja a -20°C por un mínimo de 2 h. EL DNA se recupera centrifugando la muestra a 10,000 rpm por 10 min; posteriormente se lava con 1 ml de etanol al 70% frío, se seca y se resuspende en 50 µl de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM de EDTA pH 8.0). La concentración del DNA se

determina en un espectofotómetro, leyendo su absorbancia a 260 nm. La muestra se conserva a 4°C hasta su procesamiento.

B). Metodología para la extracción del DNA genómico de especies vegetales (Modificado de Rogers y Bendich, 1985;1988 y Doyle y Doyle, 1990).

Se tritura un gramo de tejido fresco en presencia de nitrógeno líquido. La muestra macerada se transfiere a un tubo de centrífuga y se le agrega de 2 a 4 ml de solución de extracción 2-M/CTAB precalentada a 65°C (CTAB a una concentración del 2% p/v, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, polyvinyl-pyrrolidona 40,000 1% p/v). Previamente a la solución CTAB, se le agrega la cantidad requerida de Beta-Mercaptoetanol para obtener la solución 2-M/CTAB a una concentración final del 0.2%, se homogeniza la solución y se incuba durante 30 min a 65°C, mezclando ocasionalmente.

Al extracto se le agrega 1 vol. de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1), se mezcla por inversión y se centrifuga a 8,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se extrae la fase acuosa (parte superior) y se le añade 1/10 vol. de CTAB 10% (CTAB 10% p/v, NaCl 0.7 M). Se agrega 1 vol. de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1), y se centrifuga a 8,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se extrae la fase acuosa y se le agrega 1 vol. de la solución de precipitación (CTAB 1% p/v, 50 mM Tris-Cl pH 8.0, y 10 mM EDTA pH 8.0), y se centrifuga por 5 min a 2,000 rpm a 4°C.

El precipitado se resuspende en un solución amortiguadora con alto contenido de sales (10mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 1M NaCl), (de 0.5 a 1.0 ml por gramo de muestra). El DNA se precipita adicionándole 0.6 vol. de isopropanol, se mezcla por inversión y se centrifuga a 8,000 rpm a 4°C. El precipitado se lava con etanol al 80%, se seca y se resuspende en solución amortiguadora TE (de 100 a 500 µl por gramo de muestra).

Para limpiar la muestra de compuestos fenólicos y restos de polisacáridos, se agrega 0.5 vol. de acetato de amonio 7.5M y se deja en hielo durante 10 min, se centrifuga 10,000 rpm durante 10 min. Se toma la fase acuosa y el DNA se precipita adicionando 0.6 vol. de isopropanol y se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 min. El DNA se lava con etanol al 70% frío (2 veces), se seca y se resuspende en solución amortiguadora TE (de 50 a 100 µl por gramo de muestra). La concentración del

DNA se determina en un espectofotómetro, leyendo su absorbancia a 260 nm. La muestra se conserva a 4ºC hasta su procesamiento.

3.4. Diseño de iniciadores.

Lee *et al.* (1993c), reportaron el par de iniciadores R16F2/R16R2 (5´-ACgACTgCTgCTAAgACTgg-3´) / (5´ TgACgggCggTgTgTACAAACCCCg-3´), diseñados sobre la secuencia del gen que codifica para el 16S RNA ribosomal de OTMs (Fig. 1), los cuales fueron utilizados con éxito en la detección del fitoplasma asociado con el Amarillamiento Letal del Cocotero.

Ante la necesidad de contar con iniciadores que presentaran mayor especificidad de apareamiento con el fitoplasma causante del AL y evitar el riesgo de los falsos positivos al amplificar fragmentos inespecíficos, se realizó la consulta a la base de datos del GeneBank 86.0 y EMBL 41.0 del National Center for Biotechnology Information of the National Library of Medicine (Bethesda, Maryland, U.S.A.). Se obtuvieron las secuencias reportadas del gen que codifica para el 16S RNA ribosomal de todos los Micoplasmas y Organismos Tipo Micoplasma y se diseñaron dos iniciadores de 20 nucleótidos el MMF (5´-AAgACCTAgCAATAggTATg-3´) y MMR (5´-TCAgCAATgATTTTTCCATC-3´), (Fig. 1), mismos que fueron sintetizados por Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, Texas, U.S.A.). Se realizaron alineamientos y comparaciones de secuencias de DNA de la base de datos del GeneBank y EMBL usando el programa BLAST 1.3 (Altschul *et al.*, 1990). Para el análisis computacional y mapa de restricción se uso el programa de computadora DNA Straider 1.01 (Marck, 1988).

Adicionalmente se evaluaron los iniciadores, P1(5´AAgAgTTTgATCCTggCTCAggATT-3´), P3 (5´-ggATggATCACCTCCTT-3´), P7(5´-CgTCCTTCATCggCTCTT-3´), BLTVAint (5´gATgATTTTAgTATATATAgTCC-3´) AYint (5´-TACAATTTgCAAgCAAgTTAC-´3) y Tint (5´TCAggCgTgTgCTCTAACCAgC-3´), (Fig. 2), reportados por Smart *et al.* (1996).

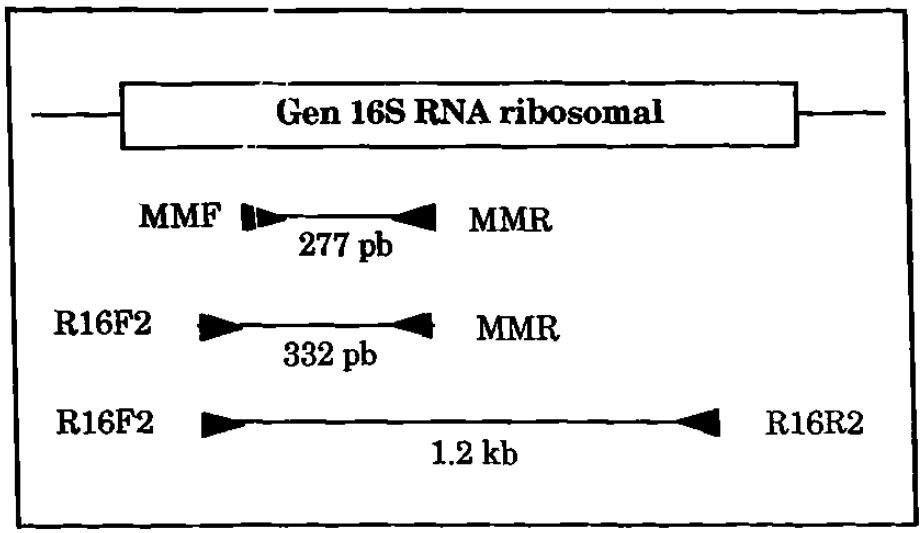

Fig. 1. Representación esquemática del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S reportado para el Grupo I de Organismos Tipo Micoplasma. Los triángulos representan la posición de los iniciadores utilizados en las PCRs. Las líneas representan el fragmento amplificado.

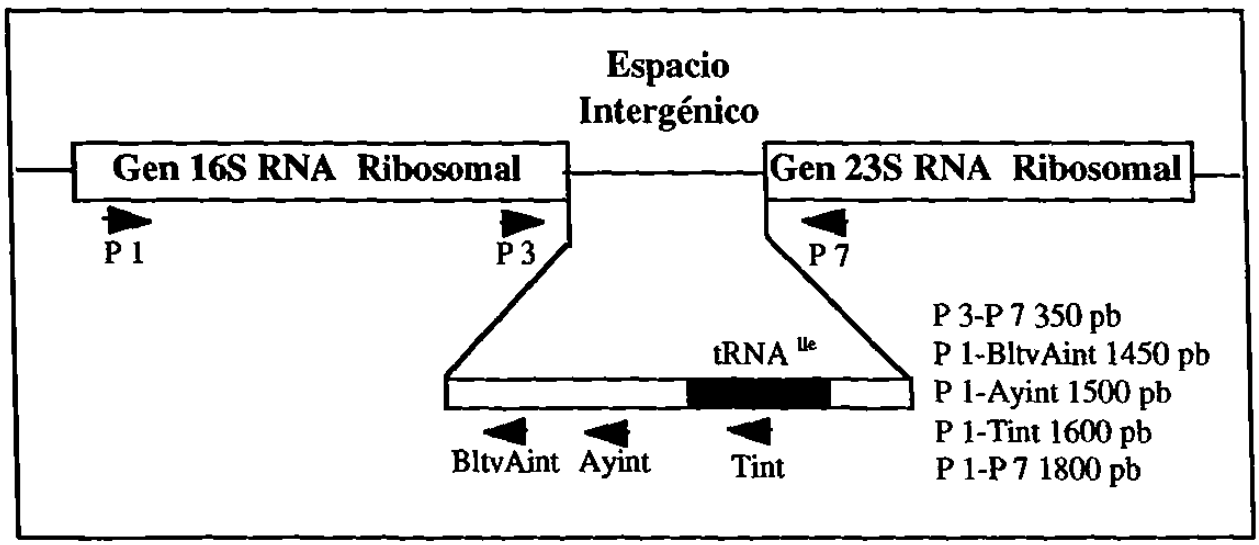

Fig. 2. Representación esquemática de los genes que codifican para los RNAs ribosomales 16S y 23S y la región intergénica de fitoplasmas. Los triángulos representan la posición de los iniciadores usados en las PCRs.

3.5. Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs).

Las PCRs, se conformaron en tubos Eppendorf de 0.5 ml, el volumen total de la reacción fue de 25µl, que contenía 50 ng de DNA, 25 pmoles de cada iniciador, 1X PCR solución amortiguadora, 2 mM $MgCl_2$, 200 µM de nucleótidos trifosfatados (dNTP´s) y 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (GIBCO BRL, Inc., Gaithersburg, Maryland, U.S.A.). Para evitar la evaporación la reacción fue cubierta con 25 µl de aceite mineral estéril.

Las PCRs se realizaron en un Termociclador (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler), las condiciones iniciales de corrida fueron seleccionadas de acuerdo a los reportes de la literatura (Lee *et al.*, 1993c; Harrison *et al.*, 1994b). Sin embargo, las condiciones se estandarizaron durante el desarrollo del trabajo y finalmente quedaron de la manera siguiente: 1 ciclo con temperatura de desnaturalización de 94°C 2 minutos; 30 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C 1 minuto, temperatura de apareamiento de 55°C 1 minuto, temperatura de polimerización de 72°C 1 minuto. Cuando se procesaron muestras que procedían de plantas asintomáticas, las condiciones se modificaron incrementando el número de ciclos a 35 y el tiempo de polimerización a 1 minuto con 30 segundos. Tanto en muestras provenientes de plantas con síntomas, como asintomáticas se daba un periódo de extensión a 72°C durante 4 minutos. Una vez concluído el proceso de amplificación se tomaban ocho µl de cada reacción y se fraccionaban en un gel de agarosa al 1.5% conteniendo solución amortiguadora TBE 1X (100 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico y 1mM de EDTA), se teñía con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizaba en una cámara de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

3.6. Análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR.

Los fragmentos amplificados por PCR de las muestras de cocotero, cempaxúchitl y teresita utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, sometidos a tratamiento con las endonucleasas *Eco*RI que reconoce la secuencia G↓AATTC y *Alu*I que reconoce la secuencia AG↓CT. Los fragmentos del DNA de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa, amplificados utilizando los iniciadores P1/Tint, también fueron sometidos a tratamiento con la endonucleasa *Alu*I.

Previo al tratamiento con enzimas de restricción los productos de PCR se purificaron por medio del sistema Geneclean (Bio 101 Inc.), resuspendiéndose el DNA en agua mq estéril. Posteriormente a un volumen de 22.5 µl conteniendo de 0.3 a 0.5 µg del producto amplificado, se le agregaba 2 µl de la solución amortiguadora correspondiente y 0.5 µl de la enzima de interés y se dejaba incubar toda la noche a 37°C. El producto obtenido del tratamiento con enzimas de restricción se fraccionaba en un gel de poliacrilamida al 15% conteniendo la solución amortiguadora 1X TBE, se teñía con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizaba en una cámara de luz ultravioleta .

3.7. Estimación de la relación taxonómica de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa.

Con la finalidad de establecer el parecido taxonómico entre los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa, se realizó un análisis de similitud a partir del patrón de restricción obtenido al digerir con la enzima *Alu*I los fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores P1/Tint y el DNA blanco de las especies vegetales indicadas anteriormente.

Para la elaboración de la matriz de similitud se utilizo la fórmula de Dice= $\frac{2a}{2a + b + c}$ citado por Crici y López (1983), donde:

a= Es el número de caracteres compartido por las dos variables

b= Es el número de caracteres que solamente posee la primera variable

c= Es el número de caracteres que solamente posee la segunda variable

3.8. Clonación de fragmentos amplificados por PCR.

Se clonaron dos fragmentos amplificados por PCR, uno de 269 pb amplificado a partir del DNA genómico de cocotero utilizando los iniciadores MMF/MMR y otro de 1.2 kb amplificado a partir del DNA genómico de teresita utilizando los iniciadores R16F2/R16R2. Las dos plantas presentaban los síntomas típicos inducidos por

fitoplasmas. La clonación se realizó mediante el sistema pGEM-T Vector (Promega, 1993-1996), y se utilizó *Escherichia coli* JM109. Para seleccionar las clonas recombinantes que portaban el inserto de interés, se realizaron aislamientos de plásmidos a pequeña escala (minipreps) Sambrook *et al.*, (1989), y posteriormente se realizaban pruebas de PCR con los pares de iniciadores MMF/MMR y R16F2/R16R2.

3.8.1. Etapas secuenciales para la clonación de los fragmentos amplificados por PCR.

a). Construcción de plásmidos recombinantes:

El sistema pGEM-T Vector (Promega, 1993-1996), es un kit comercial que no requiere tratamiento con enzimas de restricción para generar extremos cohesivos, ya que viene preparado para utilizarse directamente en las reacciones de ligación con el inserto de interés y obtener los plásmidos recombinantes.

b). Ligación:

En tubos eppendorf de 0.5 ml se agrega, agua mq estéril 2 µl de solución amortiguadora de ligación 10X 1 µl, DNA inserto 5 µl, DNA pGEM-T vector 1 µl, T4 DNA ligasa 1 µl. Se mezcla suavemente la reacción golpeando ligeramente el tubo y se centrifuga unos segundos para depositar los componentes de la reacción en el fondo del tubo y se incuba a 4°C por 16 h, la reacción se detiene inactivando la enzima a 65°C por diez min.

c). Preparación de células calcio competentes:

De un cultivo stock de *Escherichia coli* JM109, mantenido en refrigeración, se toma una asada y se inocula en un tubo de ensaye conteniendo 3 ml de caldo LB (triptona 10 g/, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10 g/l), y se incuba a 37°C durante toda la noche en agitación contínua a 150 rpm. Se toman 100 µl del cultivo anterior y en asepsia se transfiere a otro tubo de ensaye con 3 ml de caldo LB y se incuba a 37°C por cuatro horas en agitación a 150 rpm. Después se vierte el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml y se colocan en hielo por diez min. Se centrifuga a 4000 rpm a 4°C por diez min para obtener el precipitado celular. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1.2 ml de $CaCl_2$ 0.1 M frío y estéril y se coloca en

hielo por 20 min. Se centrifuga a 4000 rpm a 4°C por diez min, se decanta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 50 µl de $CaCl_2$ estéril y frío y se guarda la suspensión en refrigeración por 12 h (las células pueden ser almacenadas en nitrógeno líquido a -70°C por varios meses).

Es importante que todas las etapas de esta práctica se realicen en condiciones estrictas de asepsia, así como mantener el mayor tiempo posible las células en hielo para evitar que se afecte la eficiencia de transformación.

c). Transformación (método químico):

Se transfiere 20 µl de la suspensión de células competentes a tubos eppendorf de 0.5 ml estériles y fríos y se le agrega 5 µl del plásmido recombinante. Se mezcla la reacción golpeando suavemente los tubos y se coloca rápidamente en hielo por 1 h. Se coloca rápidamente los tubos con las células en un baño de agua a una temperatura de 42°C por exactamente 90 seg. Es de vital importancia asegurarse que tanto la temperatura como el tiempo sean los indicados, ya que es la etapa crucial donde ocurre la toma del DNA por las células. Se colocan las células en hielo por 1-2 min y se agrega 200 µl de caldo SOC [triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, KCl (250 mM) 10 ml, $MgCl_2$ (2M) 5ml, glucosa (1M) 20 ml], estéril a cada tubo, y se incuba a 37°C por 45 min a 150 rpm. Se toman 200 µl del cultivo y con una asa de vidrio se inocula por extensión en cajas petri con agar LB (igual que el caldo LB, excepto que contiene 15 g/l de agar-agar), con ampicilina (100 µg/ml). Las cajas se incuban en posición invertida a 37°C por no más de 24 h, para evitar la aparición de colonias satélite sensibles al antibiótico alrededor de las colonias transformadas.

d). Aislamiento de plásmidos a pequeña escala (minipreps):

Las colonias de interés se crecen individualmente en 4 ml de caldo LB por 18 h a 37°C con agitación vigorosa (250 rpm). Se transfiere 1.5 ml del cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifuga por un min a 5000 rpm, eliminando completamente el sobrenadante con una micropipeta. La precipitado celular se resuspende en 100µl de solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) y se incuba por 10 min a 0°C. Se añade 200 µl de la solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS), e inmediatamente se mezcla suavemente y se incuba por 10 min a

temperatura ambiente. Se agrega 150 µl de la solución III (3 M KAc, 2 M ácido acético), se mezcla por inversión y se incuba 15 min en hielo. Se centrifuga por 5 min a 12000 rpm y se transfiere el sobrenadante por decantación a un tubo nuevo. Se agrega 1 ml de etanol al 95%, se da un pulso en vortex y se deja por 2 min a temperatura ambiente. El DNA plásmido se precipita por centrifugación por 3 min a 10000 rpm, se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol al 70% frío. Se seca el DNA plásmido con corriente de aire o en un evaporador-centrífuga y se resuspende en 50 µl de solución amortiguadora TE pH 8.0, quedando listo para ser utilizado en las pruebas de PCR.

e). Detección del fragmento de interés por PCR:

Las PCRs se realizaron utilizando las condiciones descritas anteriormente, variando únicamente la concentración del DNA molde a 5 ng.

3.9. Hibridación molecular.

El objetivo principal de este estudio fue el diagnóstico molecular del Amarillamiento Letal del Cocotero. Para tal efecto se inició con la estandarización de la técnica de PCR; sin embargo, si bien es cierto que la PCR se constituye como una herramienta segura, poderosa, rápida y confiable en el diagnóstico de enfermedades, no es desconocido su alto costo. Por tal motivo se procedió a la estandarización de la técnica de hibridación molecular con la finalidad de mantener la confiabilidad y seguridad del diagnóstico de la enfermedad al mismo tiempo que se pueden realizar muestreos masivos y se reducen los costos.

Para las pruebas de hibridación se tomaron como sondas dos fragmentos amplificados por PCR, un fragmento de 269 pb (AL269), fue amplificado a partir del DNA genómico de cocotero utilizando los iniciadores MMF/MMR, el otro fragmento de 1.2 kb (AL1.2), fue amplificado a partir del DNA genómico de teresita utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, tanto la planta de cocotero como la de teresita mostraban los síntomas típicos de infección por fitoplasmas.

El material vegetal utilizado en la prueba de hibridación fue: cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca, papa, palma jipi. Como testigo nagativo se utilizó

material de cocotero y teresita sanos y como testigo positivo los plásmidos que portaban los insertos de interés (269 pb y 1.2 kb).

El proceso de hibridación se realizó utilizando el protocolo de marcaje y detección de DNA de forma no radioactiva (Biochemica, Boehringer, Mannheim, 1989).

a). Marcaje con digoxigenina:

1). Se diluye el DNA que se utiliza como sonda (0.5 - 3 µg), en un volumen total de 15 µl y se desnaturaliza por calentamiento durante 10 min en un termoblock y se enfría rápidamente sobre hielo y cloruro de sodio.

2). Sobre hielo se añade:

2 µl de la mezcla de hexanucleótidos

2 µl de la mezcla de dNTP´s

1 µl de la enzima Klenow

(reactivos incluidos en el kit comercial)

3). La mezcla se centrifuga brevemente y se incuba por un tiempo mínimo de 60 min a 37°C.

4). Se añaden 2 µl de 0.2 M de EDTA, pH 8.0 para inactivar la reacción.

5). El DNA marcado se precipita añadiendo 2.5 µl de 4 M de LiCl y 75 µl de etanol enfriado a -20°C.

6). Se mezcla la solución y se deja por 30 min a -70°C o 2 h a -20°C.

7). Se centrifuga por 15 min y se lava el precipitado con 50 µl de etanol al 70% frío.

8). Se deja secar el DNA y se disuelve en 50 µl de solución amortiguadora TE.

b). Hibridación

1). Se prepara la membrana de nylón (marca Sigma), humedeciéndola en agua y después con la solución 20 x SSC (3 M NaCl; 0.3 M Na-citrato; pH 7.0). La membrana se seca antes de colocar el DNA.

2). Se transfiere el DNA a la membrana (previamente el DNA se desnaturaliza por calentamiento).

3). Se fija el DNA a la membrana dejándola por 2 h en un horno a 80°C.

4). Las membranas se prehibridizan en un mínimo de 20 ml de solución de hibridación [5 x SSC; 0.1% (p/v) N-lauroilsarcosin; 0.02% (p/v) de SDS; 1% (p/v) del bloqueador (reactivo incluido en el kit comercial)], por cada 100 cm^2 a 68°C por un mínimo de 1 h.

5). Se desecha la solución de prehibridación y se reemplaza con la solución de hibridación conteniendo la sonda marcada (conteniendo 20 ng de la sonda marcada en aproximadamente 2.5 ml de solución para 100 cm^2 de membrana). Las membranas no deben secarse cuando se cambia de la solución de prehibridación a la de hibridación.

6). La membrana se incuba por un mínimo de 6 h a 68°C, redistribuyendo la solución ocasionalmente.

7). La membrana se lava dos veces por 5 min a temperatura ambiente con un mínimo de 50 ml de la solución 2 x SSC; 0.1% (p/v) de SDS, por cada 100 cm2 de membrana y dos veces por 15 min a 68°C con la solución 0.1 x SSC; 0.1% (p/v) de SDS.

8). Las membranas pueden ser usadas directamente para la detección o pueden ser secados para realizar posteriormente la detección.

c). Detección

1). Se humedece la membrana brevemente (1 min) en la solución amortiguadora 1 (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7.5).

2). Se incuba la membrana por 30 min con aproximadamente 100 ml de solución amortiguadora 2 [0.5% (p/v) del bloqueador (reactivo incluido en el kit comercial), en la solución amortiguadora 1].

3). Se lava la membrana brevemente en la solución amortiguadora 1.

4). Se diluye la solución conjugado-anticuerpo (reactivo incluido en el Kit comercial), en una proporción de 1:5000 en la solución amortiguadora 1.

5). Se incuba la membrana por 30 min con aproximadamente 20 ml de la solución diluida conjugado-anticuerpo.

6). Se remueve la solución conjugado-anticuerpo lavando la membrana 2 veces por 15 min con 100 ml de la solución amortiguadora 1.

7). Se equilibra la membrana por 2 min con 20 ml de la solución amortiguadora 3 (100 mM Tris-HCl; 100mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$; pH 9.5).

8). Se incuba la membrana en obscuridad por un mínimo de 12 h con aproximadamente 10 ml de solución de color preparada recientemente (45 µl de

solución NBT; 35 µl de solución fosfato-X;10 ml de la soluciónn amortiguadora 3), las soluciones NBT y fosfato-X, están incluidos en el kit comercial.

9). Cuando las manchas son detectadas se para la reacción lavando la membrana durante 5 min con 50 ml de solución amortiguadora 4 (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8.0).

Todas las incubaciones son realizadas a temperatura ambiente y requieren agitación excepto la reacción de color.

3.10. Transmisión del fitoplasma que infecta a la teresita.

En este trabajo, se realizó un experimento de transmisión del fitoplasma que infecta a la teresita *C. roseus* mediante una planta parásita conocida comúnmente como cuscuta *Cuscuta spp.* Para tal efecto se localizó una planta de teresita mostrando síntomas de infección por fitoplasmas de manera natural (la presencia del fitoplasma en la planta se corroboró por medio de una prueba de PCR). La planta enferma se colonizó con la cuscuta y una vez que la planta parásita se estableció sobre la teresita enferma, se procedió a poner en contacto con una planta de teresita sana (por medio de la prueba de PCR, se determinó que la planta estaba libre de la presencia de fitoplasma), dejándose en contacto por 20 días, posteriormente la planta hasta entonces sin síntomas visibles de estar infectada por el fitoplasma se traslado a un invernadero y se podó para promover la brotación de hojas nuevas. Cuando empezaron a brotar hojas nuevas se extrajo DNA para realizar pruebas mediante PCR y corroborar la presencia o ausencia del fitoplasma. En las pruebas de PCR se utilizaron los iniciadores universales R16F2/R16R2; los iniciadores específicos MMF/MMR; y una combinación de ellos R16F2/MMR.

Capítulo 4
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Optimización de la extracción de DNA de cocotero y otras especies vegetales.

El aislamiento de DNA de alto peso molecular libre de inhibidores para la actividad de diversas enzimas, es un escollo difícil de salvar en estudios moleculares de diversos tipos. Las plantas son particularmente difíciles de trabajar, de manera tal, que un procedimiento de extracción que funciona bien con un grupo de plantas puede fracasar con otro, esto es debido a la diversidad de plantas y sus compuestos secundarios (Doyle y Doyle, 1990). Asimismo, muchos de los métodos utilizados para la extracción y purificación del DNA de vegetales, implican el uso del cloruro de cesio para eliminar polisacáridos inhibidores de enzimas (Bendisch *et al.*, 1980; Murray y Thompson, 1980; Taylor y Powell, 1982). Estos procedimientos son caros y consumen demasiado tiempo debido a que requieren etapas de ultracentrifugación (Doyle y Doyle, 1990; Rogers y Bendich, 1985; 1988).

En el presente trabajo se partió de tres métodos de extracción. Uno es utilizando muestras de sangre (Leal Klevezas *et al.*, 1995), y los otros dos son métodos de extracción de DNA de vegetales (Doyle y Doyle, 1990; Rogers y Bendich, 1985, 1988).

El DNA obtenido a partir de la modificación de los tres métodos fue de buena calidad, usándose con éxito en las reacciones de PCR. El método más rápido y sencillo fue una modificación del descrito por Leal Klevezas *et al.* (1995). Sin embargo, y coincidiendo con lo mencionado por Doyle y Doyle (1990), de que un solo método de extracción no necesariamente tiene éxito con todas las especies, el método modificado a partir de Leal Klevezas *et al.* (1995), no tiene el mismo éxito entre diferentes plantas evaluadas o entre diferentes órganos de una misma planta. De manera tal que en muestras como el meristemo apical, hojas inmaduras no emergidas, e inflorescencias no abiertas de cocotero el método funciona perfectamente y se obtiene DNA de buena calidad y en cantidades suficientes (10 µg/g de tejido inicial) (Fig. 3A), para ser utilizadas en las reacciones de PCR. Sin embargo, en hojas maduras, raíces y tallo de cocotero, así como en algunas especies

como teresita, yuca, cempaxúchitl, papa, y en general, en muestras con cierto grado de descomposición, es prácticamente imposible el aislamiento y purificación de DNA partiendo del método de Leal Klevezas *et al.* (1995).

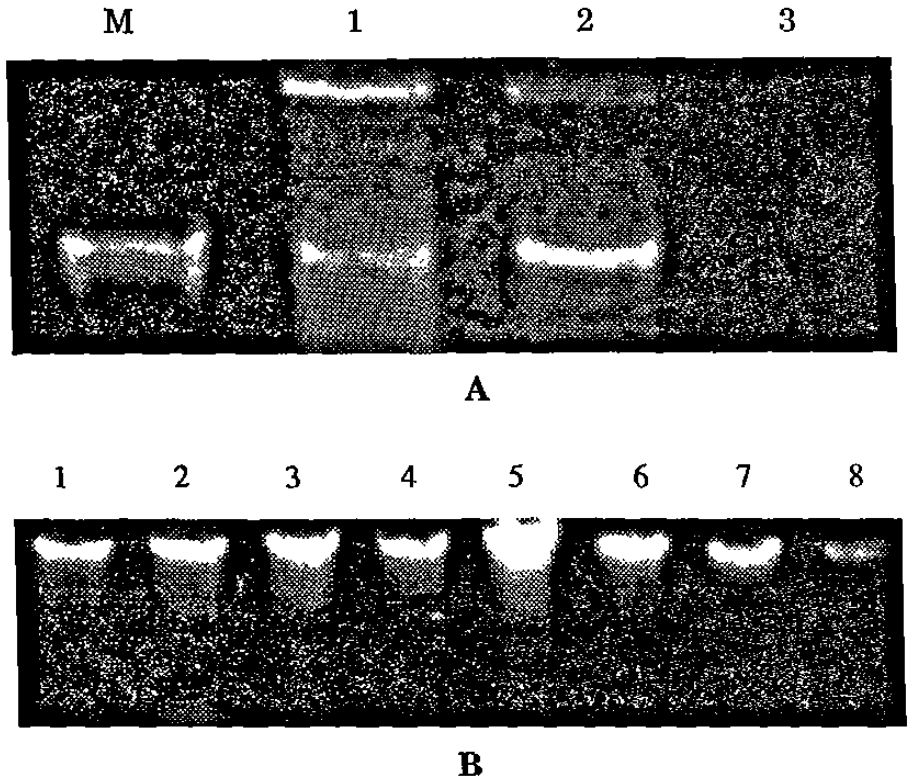

Fig. 3. DNA genómico de diversas especies vegetales. **A.** Método modificado de Leal Klevezas *et al.* (1995). Línea M= Marcador de peso molecular pBR 322 digerido con *Dde*I; Línea 1= DNA genómico de cocotero; Línea 2= DNA genómico de naranjo dulce; Línea 3= Muestra sin DNA. **B.** Métodos modificados de Doyle y Doyle, (1990) y Rogers y Bendisch, 1985; 1988). Línea 1= DNA genómico de cocotero (tallo); Línea 2= DNA genómico de cocotero (raíz); Línea 3= DNA genómico de cocotero (inflorescencia emergida); 4= DNA genómico de cocotero (hoja madura); Línea 5= DNA genómico de yuca; Línea 6= DNA genómico de teresita; Línea 7= DNA genómico de cempaxúchitl; Línea 8= DNA genómico de papa.

Alternativamente el método modificado a partir de los métodos de Doyle y Doyle (1990), y Rogers y Bendich (1985, 1988), permitió obtener DNA en cantidades suficientes (2 μg por g de tejido inicial), y de buena calidad (Fig. 3B), a partir de las muestras en las que inicialmente se tuvo serios problemas para el aislamiento del DNA debido al gran contenido de compuestos fenólicos y diversos inhibidores de la *Taq* DNA polimerasa en las pruebas de PCR; sin embargo, este método presenta las desventaja de que es más lento y se requieren reactivos con mayor grado de

peligrosidad y cuidado en su manejo.

4.2. Iniciadores diseñados.

Los iniciadores MMF/MMR, fueron diseñados con base en el análisis de todas las secuencias reportadas del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de los Organismos Tipo Micoplasma, sus características se indican en la Tabla 2.

Nombre	Secuencia	Posición	Tm (°C)
MMF	5´-AAGACCTAGCAATAGGTATG-3´	202-221	51
MMR	5´-TCAGCAATGATTTTTCCATC-3´	459-478	49

Tabla 2. Secuencia, posición en el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de fitoplasmas y la Tm de los iniciadores MMF/MMR.

El fragmento que se amplifica al utilizar los iniciadores MMF/MMR, es de un tamaño de 269 pb, su composición de bases, mapa de restricción y el mapa gráfico de sitios únicos de corte del fragmento amplificado, obtenido mediante el programa computacional DNA strider 1.01 (Marck, 1988), se indican en el apéndice.

4.3. Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En general se considera que los componentes indispensables para realizar *in vitro* el proceso bioquímico de duplicación del material genético (DNA), son: DNA molde, iniciadores, nucleótidos (dNTPs), y una enzima termoestable (*Taq* DNA polimerasa). Sin embargo, cuando se busca especificidad de apareamiento e incremento en la sensibilidad de la reacción, sobre todo cuando se trata de la detección de algún patógeno en particular, es necesario la optimización de la técnica. Lo anterior se logra a través del control de ciertos parámetros críticos de la prueba, como el tiempo de las etapas (desnaturalización, apareamiento y polimerización), la temperatura de apareamiento y el número de ciclos de amplificación. Asimismo, es necesario la estandarización en la concentración de los reactivos (iniciadores, ion magnesio, DNA blanco y dNTPs).

En este trabajo fue de particular interés la optimización de la prueba de PCR, en virtud de que se pretendía además de realizar un diagnóstico confiable y seguro,

sobre todo en etapas tempranas del AL (plantas asintomáticas), conocer la distribución del agente causal de la enfermedad en toda la planta. Con base en las diferentes condiciones que se manejaron durante el desarrollo de esta investigación se establecieron dos condiciones de gran relevancia para el diagnóstico del AL por PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	No. de Ciclos
Desnaturalización	94 °C	2 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	30
Apareamiento	55 °C	1 min	30
Polimerización	72 °C	1 min	30
Polimerización	72 °C	4 min	1

Tabla 3. Condiciones de la PCR para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en plantas con síntomas de infección.

Etapa	Temperatura	Tiempo	No. de Ciclos
Desnaturalización	94 °C	2 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	35
Apareamiento	55 °C	1 min	35
Polimerización	72 °C	1 min 30 s	35
Polimerización	72 °C	4 min	1

Tabla 4. Condiciones de la PCR para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en plantas asíntomaticas.

4.4. Detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero por PCR.

La prueba de PCR, se realizó con DNA genómico extraído de diferentes órganos: meristemo apical, hoja inmadura no emergida, inflorescencia, hoja madura, tallo y de la raíz de una planta con síntomas visibles de estar infectada por el fitoplasma

causante del AL y también con DNA extraído de una planta de cocotero colectada en el estado de Tamaulipas donde la enfermedad no esta reportada, la cual se consideró como control negativo. Los iniciadores utilizados fueron el par MMF/MMR, diseñados en este trabajo de acuerdo a la secuencias reportadas para el gen que codifica para el 16S RNA ribosomal de diferentes OTMs.

La reacción fue positiva con el DNA proveniente de la palma con síntomas de estar afectada por el AL (Fig. 4), amplificando el fragmento esperado de 269 pb. La amplificación se consideró de mayor sensibilidad cuando se utilizó DNA proveniente del meristemo apical, al observarse una banda de gran intensidad al fragmentar el producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5% y ser teñido con bromuro de etidio.

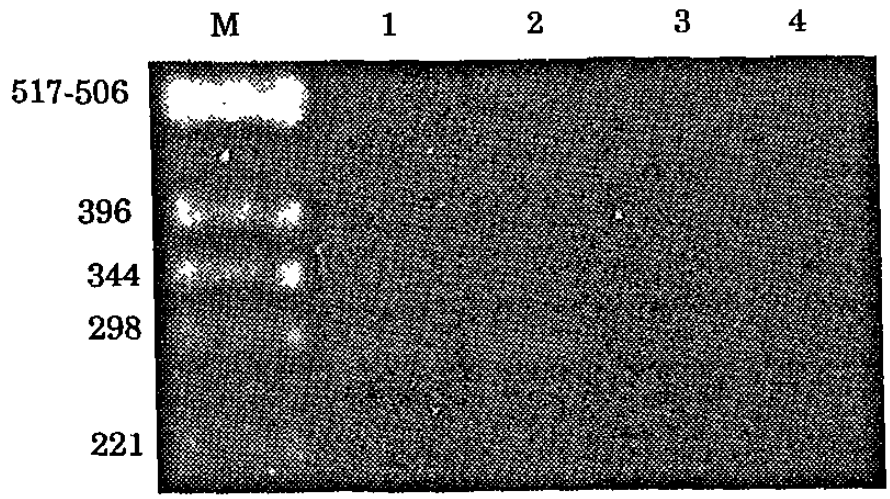

Fig. 4. Fragmentos amplificados por PCR usando los iniciadores MMF/MMR y DNA de cocotero sano e infectado con el fitoplasma causante del AL. Línea M= Marcador de peso molecular pBR 322 digerido con la enzima *Hinf* I; Línea 1= Inflorescencia inmadura de palma afectada por el AL; Línea 2= Hojas inmaduras (meristemo apical) de palma afectada por el AL; Línea 3= Hojas maduras de palma afectada por el AL; Línea 4= Hojas inmaduras de palma sana.

En las inflorescencias también se observa el fragmento amplificado (269 pb), aunque de menor intensidad que el observado cuando se utiliza el DNA proveniente del meristemo apical (Fig. 4). Cuando se utliliza DNA de hojas maduras, no se observa amplificación, siendo necesario en algunos casos, duplicar el número de ciclos (60 ciclos), para hacerla visible. Tampoco se observa ninguna amplificación cuando se utiliza el DNA molde proveniente del tejido de palma sana, incluso ni

duplicando el número de ciclos de la PCR (Fig. 4).

Los resultados anteriormente señalados corroboran el confinamiento de los fitoplasmas en los tejidos ricos en floema y se confirmó la irregular distribución de estos microorganismos en los diferentes órganos de las plantas hospederas reportada por otros investigadores (Lee *et al.*, 1994; Thomas, 1979; Thomas y Norris, 1980). Por otra parte el hecho de poder realizar la detección del fitoplasma a partir de inflorescencia, nos permite salvar el problema de eliminar la planta cuando la detección se realiza a partir del material genómico extraído del meristemo apical, esto toma gran relevancia cuando se pretende realizar el diagnóstico del AL en plantas asintomáticas.

4.5. Comparación de iniciadores utilizados en las PCRs.

Un factor determinante en el diagnóstico de cualquier enfermedad es la seguridad y confiabilidad del diagnóstico ya que de ello depende en gran medida un programa eficiente de manejo y control. La PCR es una técnica cuya especificidad de detección depende en gran medida de los iniciadores utilizados, cuando se utilizan iniciadores que presentan características de universalidad se tiene el riesgo de amplificar fragmentos del genoma de algún organismo genéticamente relacionado con el organismo de interés, entonces se corre el riesgo de realizar el diagnóstico de un falso positivo. Además, en un diagnóstico a nivel práctico, la ausencia de amplificaciones inespecíficas es crítica para que los resultados sean confiables y seguros (Nakamura *et al.*, 1996).

En este estudio en primera instancia se evaluaron el par de iniciadores R16F2/R16R2, que previamente habían sido reportados con éxito en la detección del fitoplasma asociado con el amarillamiento letal del cocotero (Lee *et al.*, 1993c). Sin embargo, los resultados obtenidos fueron inconsistentes. A pesar de que solamente se observó amplificación cuando se utilizó como blanco el DNA extraído de plantas con los síntomas característicos producidos por fitoplasmas, el fragmento amplificado de 1200 pb (Fig. 5), siempre estuvo acompañado por otros fragmentos de tamaño diferente al esperado de acuerdo a las condiciones sugeridas para la PCR (Lee *et al.*, 1993c; Lee *et al.*, 1994). La modificación de la temperatura de apareamiento (55°C a 60°C), y otros parámetros de la PCR (ion magnesio, concentración de nucleótidos), no cambiaron los resultados en la reacción.

La razón o causa de la amplificación de estos fragmentos inespecíficos es desconocida. Sin embargo, algunas posibilidades pueden ser hipotetizadas: 1) De acuerdo a un análisis de computadora se determinó que los iniciadores R16F2/R16R2, tienden a ser inestables debido a una alta incidencia en la formación de dímeros y autoapareamiento de los iniciadores. 2) Otra posibilidad es que los iniciadores R16F2/R16R2, se aparean a sitios múltiples del gen que codifica para el 16S RNA ribosomal del fitoplasma que infecta al cocotero.

Los iniciadores LYF1/LYR1, reportados con alta especificidad de apareamiento con el fitoplasma causante del AL (Harrison *et al.*, 1994b), también amplificaron con éxito en este trabajo. Sin embargo, al igual que con los iniciadores R16F2/R16R2, además del fragmento esperado de 1.0 kb, se observaron otros fragmentos inespecíficos de diferentes tamaños (Fig. 5).

Para eliminar el problema de amplificaciones inespecíficas que se tuvieron al utilizar los iniciadores R16F2/R16R2 y LYF1/LYR1, todas las secuencias reportadas del gen que codifica para el 16S RNA ribosomal de Micoplasmas y Organismos Tipo Micoplasmas, fueron alineadas, se comparó su homología y se diseñaron los iniciadores MMF/MMR.

Cuando el DNA proveniente de palmas afectadas por el AL se utilizó como blanco en las pruebas de PCR y se usaron los iniciadores MMF/MMR; se logró la amplificación de un fragmento del tamaño esperado de 269 pb (Fig. 5). No se observaron amplificaciones inespecíficas, tampoco se observaron señales de amplificación cuando se utilizó DNA extraído del tejido de palmas sanas. Estos resultados demuestran la especificidad de apareamiento de los iniciadores MMF/MMR con el DNA blanco y proporcionan sensibilidad y confiabilidad en el diagnóstico molecular del AL.

Además como el producto de la amplificación es un fragmento de tamaño pequeño (269 pb), nos permitió modificar las condiciones de la PCR (se acortó el tiempo de los períodos y el número de ciclos), lo cual probablemente optimiza la actividad de la *Taq* DNA polimerasa, cuando se compara en relación a las condiciones desarrolladas en otros laboratorios (Lee *et al.*, 1993c, Lee *et al.*, 1994, Harrison *et al.*, 1994b).

145330

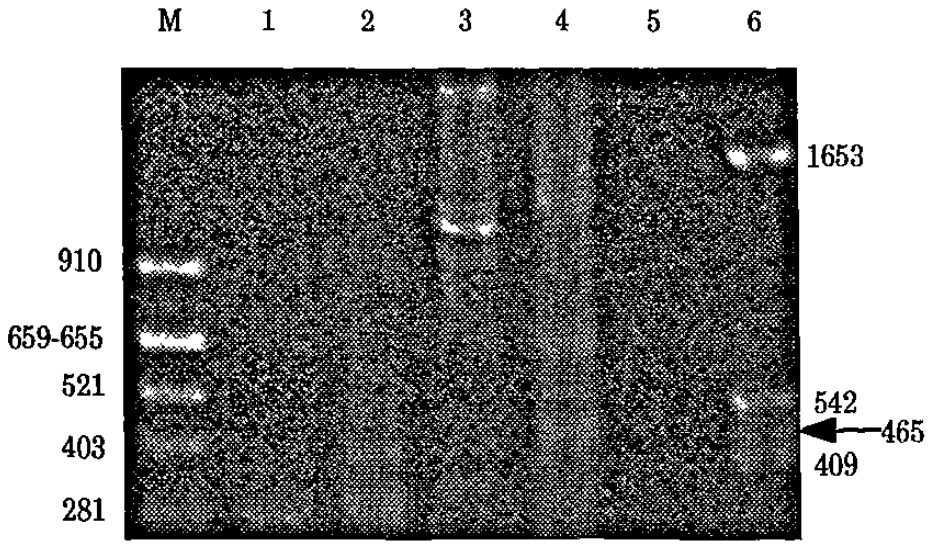

Fig. 5. Fragmentos amplificados por PCR usando diferentes iniciadores y DNA de cocotero sano e infectado con el fitoplasma causante del AL. Línea M= Marcador de peso molecular pBR 322 digerido con *Alu*I; Línea 1= Amplificación con los iniciadores MMF/MMR; Línea 2= Amplificación con los iniciadores R16F2/MMR; Línea 3= Amplificación con los iniciadores LYF1/LYR1; Línea 4= Amplificación con los iniciadores R16F2/R16R2; Línea 5= Cootero sano con los iniciadores R16F2/R16R2; Línea 6= Marcador de peso molecular pBR 322 digerido con *Dde*I.

Los resultados obtenidos en la detección del patógeno causante del AL por medio de PCR utilizando los iniciadores MMF/MMR, no fueron fortuitos ya que los citados iniciadores fueron diseñados sobre una región del gen 16S RNA ribosomal donde solamente se manifestará apareamiento con la secuencia de alta homología de los fitoplasmas que afectan a plantas monocotiledóneas.

En virtud de que los iniciadores MMF/MMR fueron diseñados en la región interna de donde se diseñaron los iniciadores R16F2/R16R2, se pudo realizar una combinación entre ellos (R16F2/MMR). Esta combinación permitió la amplificación de un fragmento de 330 pb aproximadamente (Fig.5).

La combinación de iniciadores R16F2/MMR, presenta mayor sensibilidad en la detección del fitoplasma causante del AL que el par MMF/MMR; sin embargo, la especicificidad de apareamiento es menor, ya que eventualmente se observan fragmentos de diferentes tamaños al esperado (Fig. 5).

4.6. Detección diferencial de diversos patógenos tipo fitoplasma.

La alta sensibilidad que tiene la técnica de PCR en el diagnóstico de enfermedades puede, en algunos casos, constituirse como una desventaja, si no se toman las precauciones necesarias para evitar contaminaciones en el DNA molde que pudieran llevar al diagnóstico de un falso positivo. Para reducir este problema es importante que los iniciadores utilizados en las PCRs tengan condiciones de alta especificidad, de manera tal que permitan en todo lo posible amplificar solamente el fragmento de interés.

Para determinar su especificidad de apareamiento, los iniciadores MMF/MMR y los reportados por otros autores (Lee *et al.*, 1993c; Smart *et al.*, 1996), se evaluaron en las pruebas de PCR utilizando el DNA extraído de diversas especies vegetales que presentaban síntomas de estar infectados por fitoplasmas.

Los iniciadores R16F2/R16R2, dieron una reacción positiva cuando se utilizó DNA blanco proveniente de tejidos de cocotero, cempaxúchitl, teresita, papa y yuca. En algunas muestras, adicionalmente al fragmento esperado de 1200 pb, se observó la amplificación de fragmentos inespecíficos de tamaño diferente al esperado (Figs. 6A y 6B). Estos resultados muestran la característica de universalidad de los iniciadores R16F2/R16R2, que prácticamente se aparean con el DNA de todos los fitoplasmas y algunos organismos relacionados como los Spiroplasmas y Acholeplasmas con los que han sido probados. La característica de universalidad de los iniciadores R16F2/R16R2, esta dada por el hecho de que fueron diseñados sobre regiones altamente conservadas del gen 16S RNA ribosomal de todos los fitoplasmas, lo que indudablemente le elimina su especificidad de apareamiento.

Los iniciadores MMF/MMR, solamente reaccionaron de manera positiva cuando se utilizó DNA blanco proveniente de tejido de cocotero, cempaxúchitl y teresita siendo negativo cuando se utilizó DNA molde proveniente de papa y yuca (Fig 6B y 6C). Es importante remarcar que en todos los casos en los cuales los iniciadores MMF/MMR reaccionan positivamente, solamente se observó el fragmento esperado de 269 pb, lo cual de alguna manera determina la especificidad de apareamiento de los citados iniciadores con el DNA blanco.

La combinación R16F2/MMR, reaccionaron positivamente cuando se utilizó DNA molde extraído de cocotero, cempaxúchitl, teresita y aunque muy débilmente se observa amplificación con papa (Fig. 6C). Sin embargo, también se observó un fragmento de mayor tamaño al esperado con el DNA de papa, lo cual manifiesta menor especificidad de apareamiento que los iniciadores MMF/MMR.

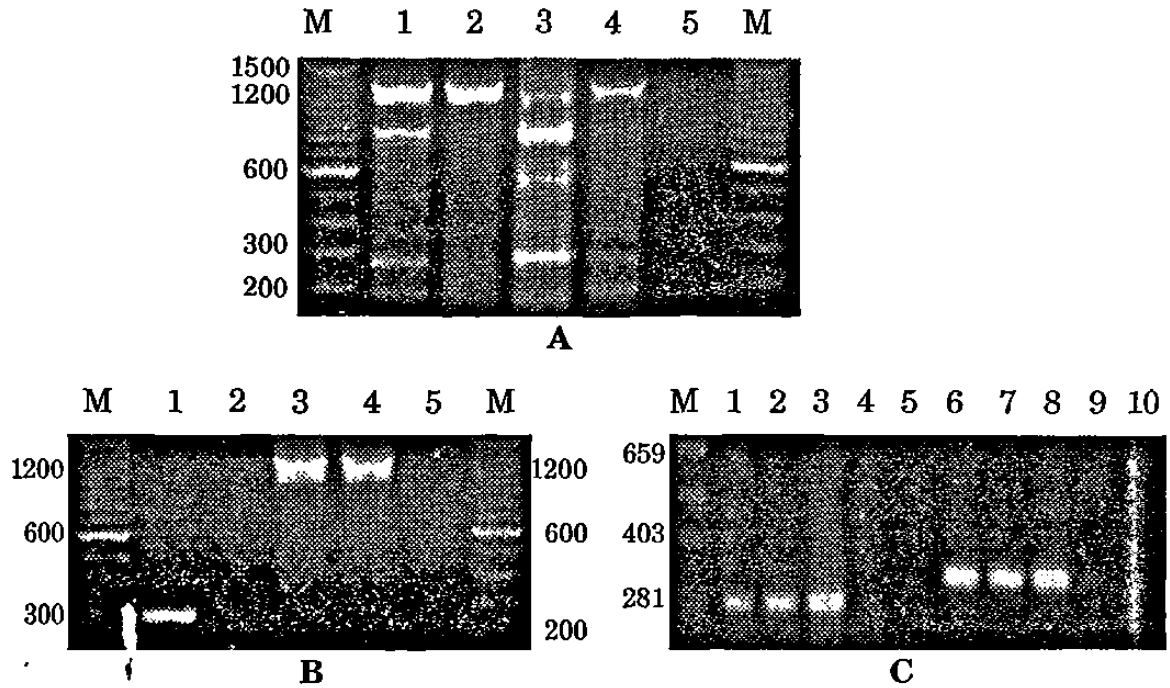

Fig. 6. Fragmentos amplificados por PCR usando los iniciadores R16F2/R16R2, MMF/MMR y R16F2/MMR y distintas especies vegetales infectados por fitoplasmas. **A.** Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100; Líneas 1- 4= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa con los iniciadores R16F2/R16R2; Línea 5= Testigo negativo. **B.** Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100; Líneas 1 - 2= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero infectado por fitoplasma con los iniciadores MMF/MMR; Líneas 3 - 4= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de yuca infectado por fitoplasma con los iniciadores R16F2/R16R2; Línea 5= Testigo negativo. **C.** Línea M= Marcador de peso molecular pBR322 digerido con *Alu*I; Líneas 1 - 4= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa respectivamente, con los iniciadores MMF/MMR; Líneas 6 - 9= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa con los iniciadores R16F2/MMR; Líneas 5 y 10= Testigos negativo.

No se observó la amplificación cuando los iniciadores MMF/MMR, R16F2/R16R2 y la combinación de ellos R16F2/MMR, se utilizaron en las pruebas de

PCR, con la finalidad de diagnosticar la presencia del patógeno causante del AL en una serie de muestras de cocotero colectadas en el estado de Tabasco y que presentaban síntomas similares a los ocasionados por el AL, pero sí se observó amplificación en el testigo positivo.

Los resultados anteriores dieron origen al desarrollo de nuevos experimentos que permitieran determinar el ámbito de especificidad de los iniciadores MMF/MMR. De esta manera en los laboratorios de Agdia Inc. (USA), se realizaron una serie de comparaciones entre los iniciadores MMF/MMR y los iniciadores de uso común de esa empresa para conocer el grado de especificidad de los pares de iniciadores en las pruebas de PCR. Los iniciadores MMF/MMR reaccionaron positivamente con 5 de los DNAs utilizados como blanco en las PCRs, amplificando un solo fragmento del tamaño esperado de 269 pb, mientras que los iniciadores de Agdia Inc. amplificaron con todos los DNAs utilizados como blanco en las pruebas de PCR (Tabla 5).

Nombre de la enfermedad	Iniciadores MMF/MMR	Iniciadores de Agdia Inc.
Aster yellows	Positiva	Positiva
Western X-disease	Positiva	Positiva
Clover proliferation	Positiva	Positiva
Tomato big bud	Positiva	Positiva
Potato witches-broom	Positiva	Positiva
Beet leafhopper transmitted virescence	Negativa	Positiva
Elm yellows	Negativa	Positiva
Pear decline X	Negativa	Positiva
Soybean OTM	Negativa	Positiva
Poinsettia OTM	Negativa	Positiva
Potato OTM	Negativa	Positiva

Tabla 5. Comparación de diferentes fitoplasmas detectados en muestras vegetales, entre los iniciadores MMF/MMR diseñados en el laboratorio de Patologia Molecular del INIFAP-UANL y los iniciadores diseñados en otro laboratorio.

Un dato de gran importancia lo constituye el hecho de que los fitoplasmas que afectan a las plantas donde se tomaron las muestras que dieron reacción positiva cuando se usaron los iniciadores MMF/MMR, son miembros del grupo del aster yellows (Lee *et al.*, 1993b; Schneider *et al.*, 1993), lo que permite establecer que los iniciadores MMF/MMR presentan especificidad de apareamiento con este grupo de fitoplasmas.

La mayoría de los iniciadores utilizados en las PCRs se han diseñado sobre la secuencia de fragmentos clonados al azar del genoma de fitoplasmas (Jarausch *et al.*, 1994; Schaff *et al.*, 1992; Harrison *et al.*, 1996), y sobre las secuencias reportadas del gen que codifica para el 16S RNA ribosomal (Ahrens y Seemüller, 1992; Deng y Hiruki, 1991a; Kummert y Rufflard, 1997; Lee *et al.*, 1993c; Lorenz *et al.*, 1995). Sin embargo, debido a que estas secuencias en fitoplasmas relacionados es muy similar, es difícil o imposible diseñar iniciadores que puedan identificar a un fitoplasma en particular (Smart *et al.*, 1996). Por tal razón se evaluaron una serie de iniciadores diseñados tanto en el gen que codifica para el 16S RNA ribosomal, como en la región intergénica de los genes 16S y 23S RNA ribosomal de diversos fitoplasmas (Smart *et al.*, 1996), y así aprovechar la variabilidad que existe en la región intergénica y realizar la detección específica de cierto grupo de fitoplasmas, además de comparar y corroborar la especificidad de apareamiento de los iniciadores MMF/MMR con los fitoplasmas miembros del grupo del aster yellows.

Cuando se utilizaron los iniciadores P1/P7, las reacciones de PCR fueron positivas con el DNA genómico proveniente de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa, al amplificar un fragmento esperado de 1.8 kb aproximadamente (Fig. 7A). Estos resultados se consideran normales dada la condición de universalidad de los iniciadores utilizados. Se observaron resultados similares cuando se utilizaron los iniciadores P3/P7, al reaccionar positivamente las muestras de cocotero, cempaxúchitl, teresita, y papa, amplificando el fragmento esperado de 350 pb aproximadamente (Fig. 7A). Estos iniciadores también se consideran como universales ya que aparean prácticamente con todos los fitoplasmas con los que han sido evaluados (Smart *et al.*, 1996).

Con los iniciadores P1/Tint, las reacciones de PCR fueron positivas con el DNA genómico extraído de cocotero, cempaxúchitl, teresita, y papa, al amplificar un

fragmento de 1600 pb aproximadamente (Fig. 7B). A pesar de que el iniciador Tint, fue diseñado sobre la secuencia de la región intergénica entre los genes 16S y 23S RNA ribosomal, se mantuvo su característica de universalidad.

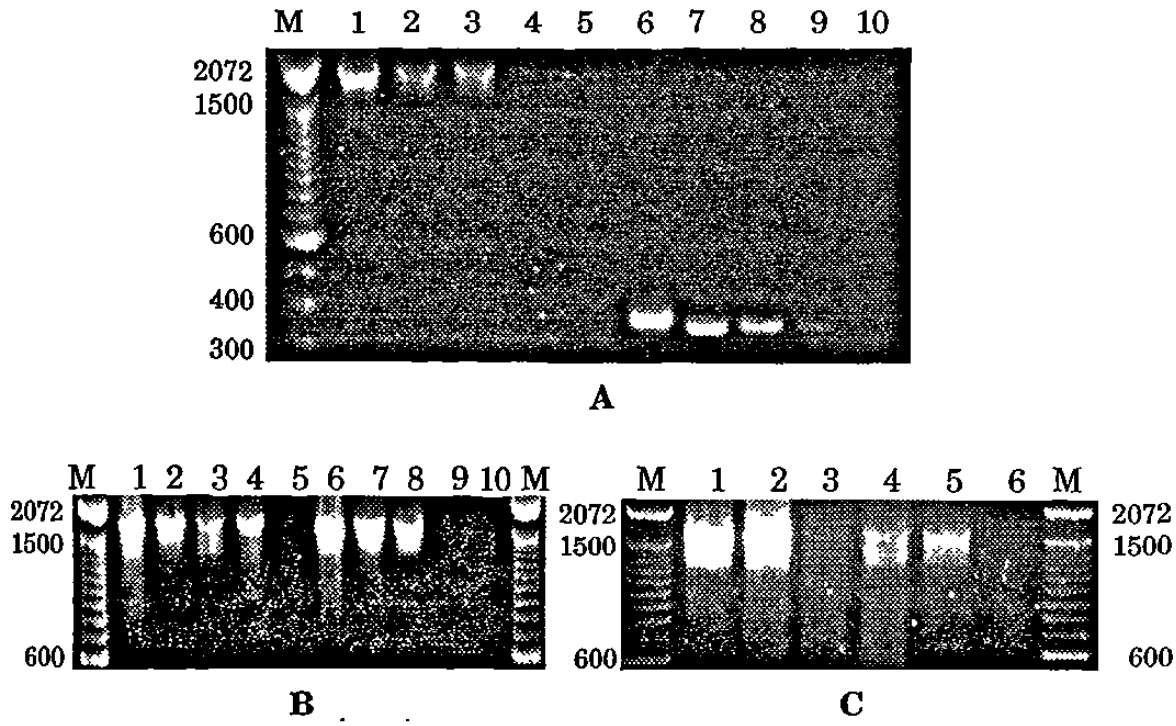

Fig. 7. Fragmentos amplificados por PCR usando los iniciadores P1/P7, P3/P7, P1/Tint, P1/PAyint y DNA de diferentes especies vegetales infectados por fitoplasmas. **A.** Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100; Líneas 1 - 4= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa respectivamente con los iniciadores P1/P7; Líneas 6 - 9= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa con los iniciadores P3/P7; Líneas 5 y 10= Testigos negativos. **B.** Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100; Líneas 1 - 4= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa respectivamente con los iniciadores P1/Tint; Líneas 6 - 9= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero, cempaxúchitl, teresita y papa respectivamente con los iniciadores P1/Ayint; Líneas 5 y 10= Testigos negativos. **C.** Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100; Líneas 1 - 5= Fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de cocotero (inflorescencia), cocotero (material híbrido), cocotero (planta asintomática), palma jipi y yuca respectivamente con los iniciadores P1/Tint; Línea 6= Testigo negativo.

Los iniciadores P1/Tint también reaccionaron positivamente cuando se utilizó como blanco DNA genómico de cocotero que mostraban síntomas de infección por el fitoplasma causante del AL (muestras colectadas de material criollo y de un material híbrido considerado como resistente al AL); DNA genómico de diferentes

plantas de cocotero asintomáticas que fueron colectadas en zonas devastadas por el AL y DNA genómico extraído de palma jipi y yuca, las cuales presentaban los síntomas característicos de estar infectadas por fitoplasmas (Fig. 7C).

Los iniciadores P1/Ayint, solamente reaccionan positivamente cuando se utiliza DNA molde proveniente de cocotero, cempaxúchitl y teresita con síntomas de estar infectados por fitoplasmas, al amplificar un fragmento esperado de 1500 pb aproximadamente, siendo la reacción negativa con el DNA molde extraído de plantas de yuca y papa con síntomas de infección por fitoplasmas (Fig. 7B). Estos resultados son los mismos que se obtuvieron con los iniciadores MMF/MMR, lo que confirma la característica de especificidad de apareamiento de estos iniciadores y del iniciador Ayint con el DNA de los fitoplasmas que pertenecen al grupo del aster yellows. Lo anterior se ha confirmado en pruebas de PCR realizadas en otros laboratorios, donde el iniciador Ayint reacciona de manera positiva solamente con los fitoplamas que pertenecen al grupo del aster yellows.(Smart *et al.*, 1996).

También se evaluaron los iniciadores P1/BLTVAint. Sin embargo, no hubo reacción positiva con ninguna de las muestras evaluadas, este resultado no es inesperado ya que el iniciador BLTVAint fue diseñado para aparearse solamente con el DNA de los fitoplasmas pertenecientes al grupo de beet-leafhopper-transmitted virescence agent, lo cual indica que ninguno de los fitoplasmas que afectan a las especies evaluadas pertenecen al grupo anteriormente señalado.

Los resultados obtenidos al realizar la detección diferencial de los fitoplasmas que infectan al cocotero y otras especies vegetales por PCR, nos permiten considerar el posible uso de esta técnica en el monitoreo del avance real del AL en el campo, tanto en el cocotero, como en el vector y hospederos alternantes, en la certificación de material de introducción al país, y en la detección del patógeno en las huertas productoras de material híbrido con características de resistencia o tolerancia al patógeno.

4.7. Análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR.

Los fragmentos del genoma de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl y teresita, amplificados por PCR utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, y que fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR*I, presentan el mismo patrón de

fragmentos, siendo imposible distinguir diferencia entre ellos (Fig. 8A). Estos resultados confirman que realmente se amplificó el gen 16S RNA ribosomal de fitoplasmas y concuerdan con los resultados obtenidos por Schneider *et al.* (1993), quienes indican que todos los aislados de diferentes OTMs que fueron sometidos al análisis de restricción muestran un sitio único de corte para *EcoR*I. Sin embargo, cuando el fragmento fue digerido con la enzima de restricción *Alu*I, se observaron dos patrones de restricción (Fig. 8A). Asimismo se observó un mismo patrón en cempaxúchitl y teresita el cual fue similar al obtenido por Lee *et al.* (1993b) y Schneider *et al.* (1993) cuando digieren con *Alu*I diferentes cepas de OTMs que pertenecen al grupo del aster yellows. El patrón que se observó en cocotero es parecido al patrón observado en cempaxúchitl y teresita, pero difieren por un fragmento de 220 pb aproximadamente. Lo anterior permite hipotetizar que el fitoplasma que infecta al cocotero queda comprendido en un subgrupo diferente al de los fitoplasmas que infectan al cempaxúchitl y teresita, dentro del grupo del aster yellows.

Con la finalidad de establecer una mayor contundencia en cuanto a las interrelaciones existentes entre los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl y teresita, se amplificó por PCR un fragmento de 1.6 kb utilizando los iniciadores P1/Tint, con estos iniciadores se amplifica prácticamente todo el gen 16S RNA ribosomal y parte de la región intergénica del 16S y 23S RNA ribosomal; en este análisis de restricción también se incluyeron los fragmentos amplificados con los iniciadores P1/Tint, utilizando como molde el DNA extraído de yuca y papa, todos los fragmentos amplificados fueron digeridos con la enzima *Alu*I y se obtuvó 4 patrones en el perfil de restricción (Fig. 8B).

El patrón de restricción fue prácticamente idéntico para el caso de cempaxúchitl y teresita. Sin embargo, se observó diferencia en relación al patrón de restricción del cocotero; lo cual concuerda con lo observado cuando se utiliza la enzima *Alu* I para digerir el fragmento de 1.2 Kb utilizando los iniciadores R16F2/R16R2. La diferencia en el patrón de restricción que se observó entre estos tres fitoplasmas puede reforzar la hipótesis de la existencia de un subgrupo, como lo indican Schneider *et al.*, (1993), al observar ligeras diferencias en el patrón de restricción de los fitoplasmas miembros del grupo del stolbur, digeridos con la enzima *Alu*I.

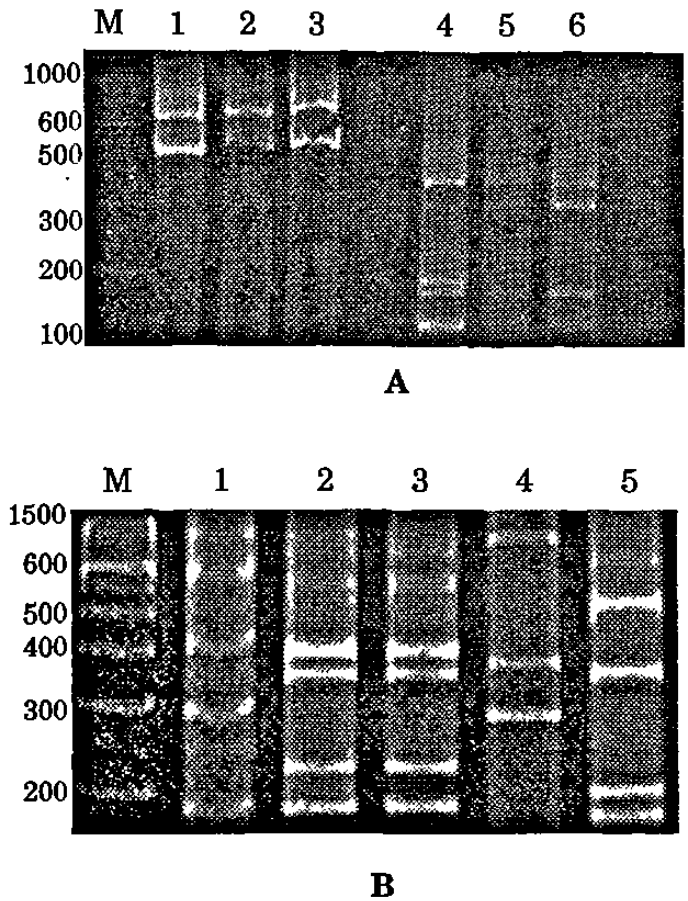

Fig. 8. Patrón de restricción de fragmentos del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S y el espacio intergénico entre los genes que codifican para los RNAs ribosomales 16S y 23S de los fitoplasmas que infectan a diversas especies vegetales, amplificados por PCR utilizando los iniciadores R16F2/R16R2 y P1/Tint, digeridos con *Eco*RI y *Alu*I. **A.** Línea M= MPM Ladder 100; Líneas 1 - 3= DNA de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl y teresita respectivamente, amplificados utilizando los iniciadores R16F2/R16R2 y digeridos con *EcoR*I; Líneas 4 - 6= DNA de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl y teresita respectiv. mente, amplificados utilizando los iniciadores R16F2/R16R2 y digeridos con *Alu*I. **B.** Línea M= MPM Ladder 100; Líneas 1 - 5= DNA de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa respectivamente, amplificados utilizando los iniciadores P1/Tint y digeridos con *Alu*I.

El patrón de restricción que se observó en yuca y papa fue diferente entre sí y también con respecto a los perfiles observados en cocotero, cempaxúchitl y teresita, indicando que ambos fitoplasmas no están muy relacionados y probablemente no pertenezcan al grupo del aster yellows. Estos resultados no son inesperados ya que ambos fitoplasmas no amplifican cuando se utilizan en las PCRs, los iniciadores

MMF/MMR y P1/Ayint que se consideran específicos para aparearse con fitoplasmas que pertenecen al grupo del aster yellows. Es indudable que para confirmar la información obtenida en el análisis de restricción es necesario realizar la secuenciación de estos u otros fragmentos de los diferentes fitoplasmas en estudio para determinar con total seguridad sus relaciones genéticas.

4.8. Estimación de la relación taxonómica de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa.

El perfil de restricción del fitoplasma que afecta al cocotero presenta mayor índice de similitud con los fitoplasmas que afectan al cempaxúchitl y teresita con 0.66, el índice de similitud más bajo se observó con el fitoplasma que afecta a la papa con un 0.00 (Tabla 6), lo cual indica que los fitoplasmas que afectan al cocotero y papa pertenecen a grupos diferentes y muy poco relacionados. El patrón de restricción de los fitoplasmas que afectan al cempaxúchitl y teresita fue muy similar, con un índice de similitud de 1.0 (Tabla 6), coincidiendo con el patrón de restricción que se observó cuando se sometio a tratamiento con la endonucleasa *Alu*I el fragmento de 1.2 kb amplificado sobre la secuencia del gen 16S RNA ribosomal de estos fitoplasmas (Fig. 8A), lo anterior nos indica que se puede tratar de el mismo patógeno o que están estrechamente relacionados. El índice de similitud más bajo del o de los fitoplasmas que afectan al cempaxúchitl y teresita fue con el fitoplasma que afecta a la yuca, con un valor de 0.00. El índice de similitud entre el patrón de restricción de los fitoplasmas que afectan a la yuca y papa fue de un 0.00 (Tabla 6), lo que indica que pertenecen a grupos diferentes y muy poco relacionados.

	Cocotero	Cempaxúchitl	Teresita	Yuca	Papa
Cocotero	1.00				
Cempaxúchitl	0.66	1.00			
Teresita	0.66	1.00	1.00		
Yuca	0.28	0.00	0.00	1.00	
Papa	0.00	0.20	0.20	0.00	1.00

Tabla 6. Matriz del índice de similitud entre el perfil de restricción de los fragmentos amplificados por PCR (utilizando los iniciadores P1/Tint y digeridos con *Alu* I), de los fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl, teresita, yuca y papa.

4.9. Clonación de fragmentos amplificados por PCR.

De los diferentes fragmentos amplificados por PCR, se seleccionaron dos para su clonación y posterior utilización como sondas en las pruebas de hibridación no radioactiva. Los fragmentos seleccionados fueron uno de 269 pb amplificado a partir del DNA genómico de cocotero utilizando los iniciadores MMF/MMR y el fragmento de 1.2 kb amplificado a partir del DNA genómico de teresita utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, tanto el cocotero como la teresita presentaban los síntomas característicos inducidos por fitoplasmas. Los dos fragmentos fueron clonados mediante el sistema pGM-T Vector (Promega, 1993-1996), y se utilizó la cepa JM-109 de *Escherichia coli*. La comprobación de la presencia del inserto se realizó mediante la prueba de PCR, lográndose amplificar el fragmento de interés al utilizar los iniciadores adecuados (Fig. 9).

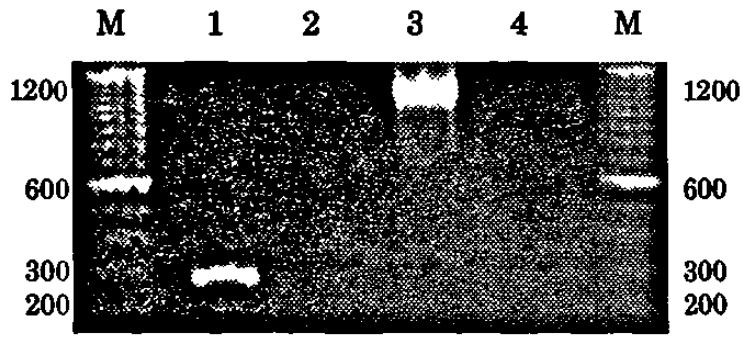

Fig. 9. Fragmentos del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de los fitoplasmas que infectan al cocotero y teresita (269 pb y 1.2 kb respectivamente), clonados en *E. coli*, JM109 y amplificados por PCR utilizando los iniciadores MMF/MMR y R16F2/R16R2. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100; Línea 1= Fragmento de 269 pb amplificado utilizando los iniciadores MMF/MMR; Línea 3= Fragmento de 1.2 kb, amplificado utilizando los iniciadores R16F2/R16R2; Líneas 2 y 4= Testigos negativos.

4.10. Hibridación molecular.

La sonda AL269, hibridó con el testigo positivo (plásmido recombinante que porta el inserto de 269 pb), con el DNA proveniente de cocotero con síntomas de estar infectado por fitoplasma causante del AL (meristemo apical e inflorescencia), con el DNA de palma jipi con síntomas de AL, con el DNA de 5 palmas de cocotero asíntomaticas y aunque muy débilmente amplifica con el DNA de teresita. No se

observó hibridación con el DNA de cempaxúchitl, yuca y papa con síntomas característicos de infección por fitoplasmas, tampoco hibridó con el DNA proveniente de plantas sanas de cocotero, teresita y yuca (Fig. 10A).

La ausencia de las señales de hibridación entre la sonda AL269 y el DNA de los fitoplasmas que infectan a cempaxúchitl, yuca y papa, tal vez pueda atribuirse a una baja similitud en la homología de la sonda y el DNA evaluado, ya que la homología de las secuencias se constituye como un factor determinante para el éxito o fracaso en la detección de fitoplasmas por medio de hibridación (Harrison *et al.*, 1992). Estos resultados concuerdan con los análisis de restricción realizados con los fragmentos amplificados por PCR usando la enzima *Alu* I, donde se observa un patrón diferente entre el fragmento amplificado a partir del DNA de cocotero y los amplificados a partir de yuca y papa, lo que indica divergencia en la secuencia de estos fitoplasmas, por lo que indudablemente se ubican en grupos diferentes. La débil señal de hibridación de la sonda AL269 y el DNA extraído de teresita y la ausencia de señal de hibridación con el DNA extraído de cempaxúchitl, también manifiesta concordancia con el patrón de restricción observado entre estos fragmentos amplificados y el que se observa en cocotero, ya que si bien es cierto que existe cierta similitud entre el perfil se puede observar que no son idénticos, lo que apoya la hipótesis de existencia de un subgrupo entre estos miembros del grupo del aster yellows.

La sonda AL 1.2, hibridó con el testigo positivo (plasmido recombinante que porta el inserto de 1.2 kb), con el DNA proveniente cocotero con síntomas de estar infectado por fitoplasma causante del AL (meristemo apical (débilmente) e inflorescencia), con el DNA de cempaxúchitl, teresita, yuca, débilmente con papa y palma jipi con síntomas característicos producidos por la infección con fitoplasmas, y con prácticamente todas las plantas de cocotero asintomáticas. No se observó hibridación con el DNA proveniente de plantas sanas de cocotero, teresita y yuca (Fig. 10B).

La diferencia en la intensidad de la señal de hibridación fue evidente entre las diferentes muestras. La menor intensidad de hibridación en algunas muestras puede ser atribuida tal vez a una baja concentración de DNA del patógeno o a una menor homología entre las sondas y el DNA probado o ambas razones como lo sugieren Harrison *et al.* (1994a).

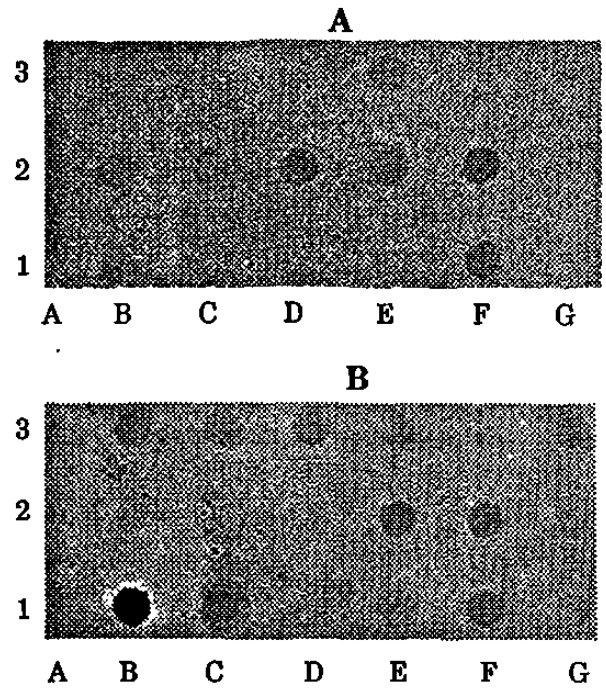

Fig. 10. Reacción de hibridación (DoBlot), de las sondas AL269 y AL1.2, con el DNA extraído de diferentes especies vegetales sanas e infectadas por fitoplasmas. **A.** A1= Cocotero sano; A2= Teresita sana; A3= Yuca sin síntomas; B1= Testigo positivo (plásmido con el inserto de 269 pb); B2= Cocotero (meristemo apical); B3= Cocotero (inflorescencia); C1= Cempaxúchitl; C2= Teresita; C3= Yuca con síntomas; D1= Papa; D2= Palma jipi; D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3, G1, G2 y G3= Cocotero asintomático. **B.** A1= Cocotero sano; A2= Teresita sana; A3= Yuca sin síntomas; B1= Testigo positivo (plásmido con el inserto de 1.2kb); B2= Cocotero (meristemo apical); B3= Cocotero (inflorescencia); C1= Cempaxúchitl; C2= Teresita; C3= Yuca con síntomas; D1= Papa; D2= Palma jipi; D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3, G1, G2 y G3= Cocoteros asintomáticos.

El hecho de que las sondas no hibriden con el DNA de plantas sanas garantiza que solamente lo hará con el DNA de fitoplasmas, por consecuencia, proporciona seguridad en el diagnóstico de alguna enfermedad ocasionada por estos patógenos. Es indudable que para realizar una afirmación de mayor confiabilidad sobre la especificidad de hibridación con el DNA de fitoplasmas de las sondas AL269 y AL1.2, es necesario evaluar las sondas con otros organismos estrechamente relacionados con los fitoplasmas como son los Spiroplasmas y los Acholeplasmas.

4.11. Transmisión del fitoplasma que infecta a la teresita.

El fitoplasma que infecta a la teresita, ocasionándole proliferación de yemas y deformación de las hojas (Fig. 11 A), pudo ser transmitido de una planta enferma a una planta sana (Fig. 11B), mediante la planta parásita *Cuscuta* spp. Para que este fenómeno ocurriera fue necesario mantener en contacto a la plantas sana y enferma mediante la cuscuta (Fig. 11C), por un período de 20 días y después de que la planta, inicialmente sana se podó, las hojas nuevas emergieron con los síntomas típicos ocasionados por la infección con fitoplasmas (Fig. 11D).

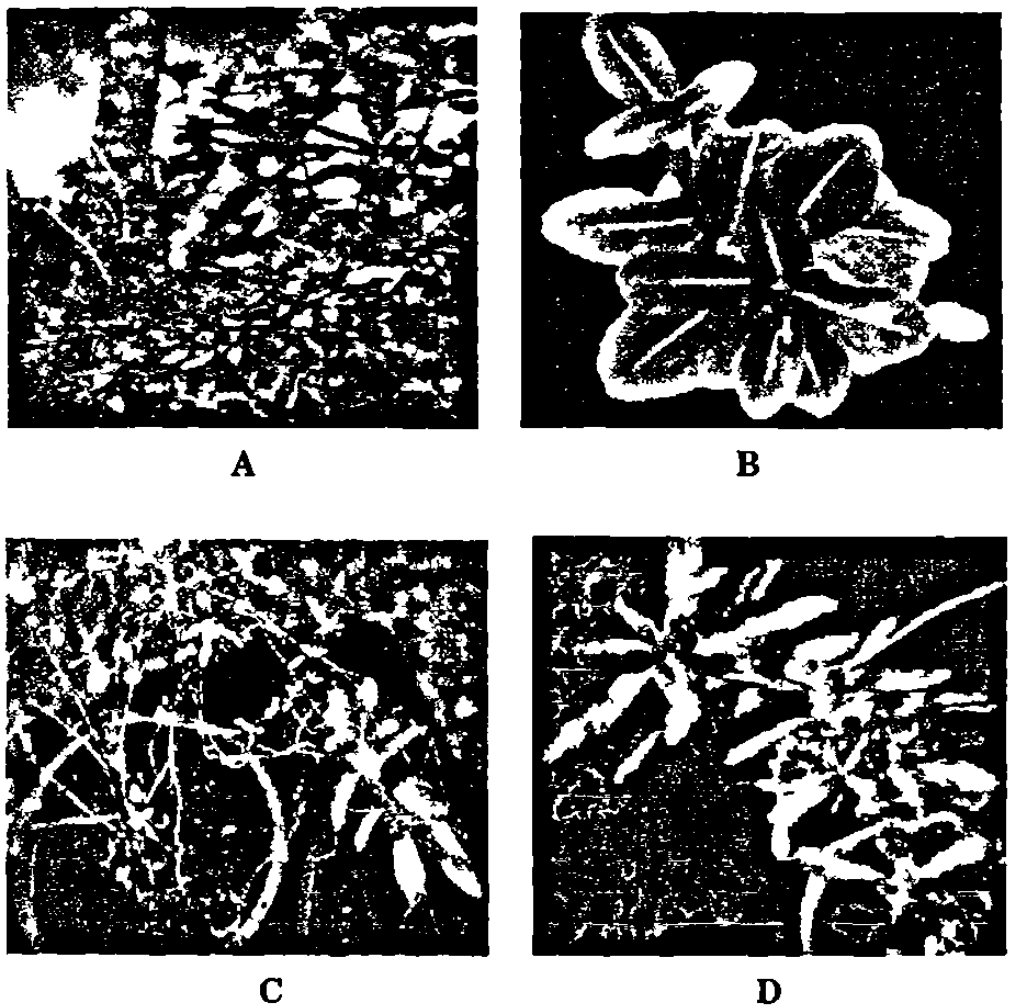

Fig. 11. Esquema de transmisión del fitoplasma que infecta a teresita (*Catharanthus. roseus* (L.) G. Don), por medio de la planta parásita *Cuscuta* spp. A. Planta con los síntomas de proliferación excesiva de brotes característicos de infección por fitoplasma. B. Planta sana. C. Conección de una planta con síntomas por fitoplasma con una planta sana, por medio de *Cuscuta* spp. D. Expresión de síntomas ocasionados por la infección por fitoplasma.

En las pruebas de PCR, que se realizaron para corroborar que el causante de la sintomatología observada en la teresita era un fitoplasma y que la teresita sin síntomas estaba libre del patógeno, los tres pares de iniciadores evaluados (MMF/MMR; R16F2/R16R2 y R16F2/MMR), reaccionaron positivamente con el DNA proveniente de la planta enferma y no se observó amplificación con el DNA proveniente de la planta sana (Fig. 12). Sin embargo, después de que la planta sana estuvo en contacto con la enferma y aparecieron las hojas nuevas, las cuales mostraban los síntomas típicos producidos por fitoplasmas, la prueba de PCR fue positiva.

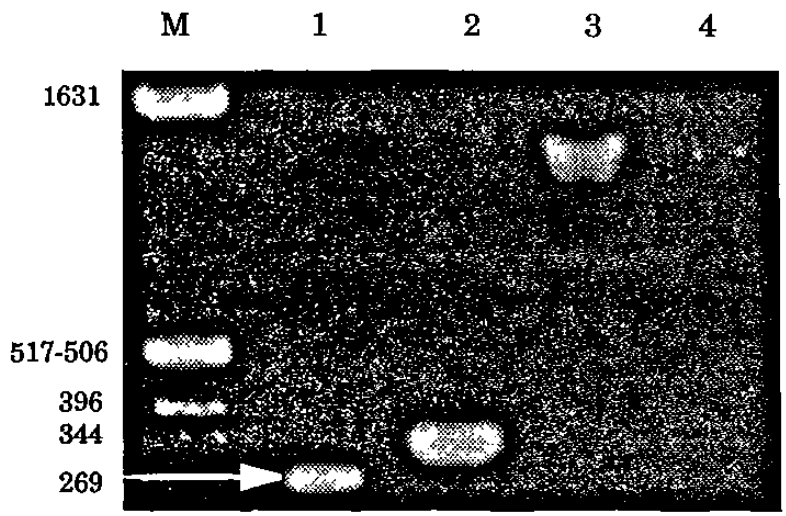

Fig. 12. Fragmentos amplificados por PCR usando diferentes iniciadores y DNA de teresita *C. roseus* sana e infectada por fitoplasma. Línea M= Marcador de peso molecular pBR 322 digerido con *Hinf*I; Línea 1= Amplificación con los iniciadores MMF/MMR; Línea 2= Amplificación con los iniciadores R16F2/MMR; Línea 3= Amplificación con los iniciadores R16F2/R16R2; Línea 4= Teresita sana con los iniciadores R16F2/R16R2.

El éxito obtenido en la transmisión del fitoplasma que infecta a la teresita, de una planta sana a una planta enferma por medio de la planta parásita *Cuscuta* spp., ofrece una posibilidad de estudio para diversos fitoplasmas a nivel de invernadero, pudiéndose salvar el escollo de que estos patógenos no pueden ser cultivados *in vitro*. También se pretendió realizar la transmisión de teresita a cocotero, sin embargo, la cuscuta no se estableció en el cocotero. Por consecuencia, en primera instancia sería necesario transmitir el patógeno a una planta dicotiledónea por medio de vectores naturales como la chicharrita pálida *M. crudus* y de ahí realizar los trabajos de

transmisión en forma masiva a otras especies dicotiledóneas, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios realizados, la cuscuta no coloniza plantas monocotiledóneas.

Capítulo 5
CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se comprobaron la hipótesis planteadas, lo cual nos permite establecer las conclusiones siguientes:

1).- Es posible la detección molecular del agente causal del amarillamiento letal del cocotero por medio de PCR e hibridación molecular, aún cuando el fitoplasma se encuentre en bajas concentraciones y no se manifiesten los síntomas típicos de la enfermedad.

2).- El diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero, se logra con mayor seguridad a partir del DNA genómico extraído del meristemo apical e inflorescencia.

3).- Los iniciadores MMF/MMR, presentaron mayor especificidad de apareamiento con el DNA del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero que los iniciadores R16F2/R16R2.

4).- Los iniciadores MMF/MMR diseñados en este trabjo, presentaron especificidad de apareamiento con los fitoplasmas que pertenecen al grupo del aster yellows

5).- El fitoplasma que infecta al cocotero queda comprendido en el grupo del aster yellows y presentó un mayor índice de similitud con los fitoplasmas que infectan al cempaxúchitl y teresita.

6).- Mediante el uso de las condiciones establecidas para las técnicas de PCR e hibridación molecular en este trabajo, es posible la detección de los fitoplasmas que infectan a cempaxúchitl, teresita, papa, yuca, y palma jipi.

LITERATURA CITADA

1.- Addison, E. A. 1978. The Cape St. Paul wilt disease in Ghana: the present position . (Abstr.) Proc 3rd Meeting Int. Counc. Lethal Yellowing, Univ. of Florida, Agric. Res. Cent., Ft. Lauderdale. Publ. FL-78-2:7.

2.- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. 3rd Ed. Academic Press. San Diego, EUA. pp 597-598.

3.- Ahrens, U. y Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifieds a sequence of the 16S rRNA gene. Phytopathology **82**:828-832.

4.- Alma, A., Davis, R.E., Vibio, M., Danielli, A., Bosco, D., Arzone, A. y Bertaccini, A. 1996. Mixed infection of gravepines in northern Italy by Phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. Plant Disease **80**:418-4221.

5.- Almeyda, L.I.H., Martínez, S.J.P., Piña, R.J., Reyes, G.D. y Byerly, M F.K. 1996. Caracterización molecular y conservación del germoplasma de cocotero con características de resistencia al "Amarillamiento Letal". Proyecto Nacional INIFAP-SAGAR-MEXICO. 27 pp.

6.- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local aligment search tool. J. Mol. Biol. **215**:403-410.

7.- Anonymous. 1986. Palm lethal yellowing mycoplasm. EPPO Bull. **16**:61-65.

8.- Barcelón, M.A., McCoy, R.E. y Donselman, H.M. 1983. New liquid chromatographic approaches for free amino acid analysis in plants and insects. II. Thin-layer chromatographic analysis for eighteen varieties of palm trees. J. Chromatogr. **260**:147-155.

9.- Beakbane, A.B., Slater, C.H.W. y Posnette, A.F. 1972. Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. Joeurnal of Horticultural Science **47**:265.

10.- Bendich, A.J., Anderson, R.S. y Ward, B.L. 1980. Plant DNA: long, pure and simple. In: Leaver CJ (ed) Genome organization and expression. Plenum Press, New York, 1980. pp 31-33.

11.- Bonnet, F., Saillard, C., Kollar, A., Seemüller, E. y Bovs, J.M. 1990. Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with apple proliferation disease using cloned DNA probes. Molecular Plant-Microbe Interactions **3**:438-443.

12.- Bruner, S.C. y Boucle, L. 1943. La enfermedad conocida por "pudrición del cogollo del cocotero en Cuba". Rev. Agric. **26**:132-141.

13.- Carrillo, R.H. 1990. Monitoreo del amarillamiento letal del cocotero en la Península de Yucatán. informe técnico. 89-90 CIFAP-QRoo. Chetumal QRoo, México.

14.- Carrillo, R.H., Domínguez, C.E., Piña, R.J. y Bierly, M.F.K. 1996. Proyecto Nacional: Normas y técnicas para la producción y certificación de material genético de cocotero *Cocos nucifera* L. resistente al amarillamiento letal. SAGAR-INIFAP. Mérida, Yucatán, México. 37 pp.

15.- Carrillo, R.H. y Piña, R.J. 1989. Situación actual del amarillamiento letal en el Sureste de México. Memorias de la segunda reunión científica, forestal y agropecuaria. CIFAP-Q.Roo. Chetumal, Q.Roo, México. 123-147 pp.

16.- Carrillo, R.H, y Piña, R.J. 1990. Amarillamiento letal del cocotero en la Península de Yucatán. Folleto Técnico. Mérida, Yucatán, México. 7 pp.

17.- Carrillo, R.H. y Piña, R.J. 1993. Plagas y enfermedades del cocotero en la Península de Yucatán. Folleto Técnico SARH-INIFAP-MEXICO. 16 pp.

18.- Carrillo, R.H. y Piña, R.J. 1994. Investigación y algunas estrategias de manejo sobre el amarillamiento letal del cocotero en la Península de Yucatán. FolletoTécnico INIFAP-SARH-MEXICO. 26 pp.

19.- Carter, W. 1966. Susceptibility of coconut palm to lethal yellowing disease. Nature (London) **212** :320.

20.- Carter, W. y Suah, J.R.R. 1964. Studies on the spread of lethal yellowing disease of the coconut palm. FAO Plant Prot. Bull. **12**:73-78.

21.- Charudattan, R. y McCoy, R.E. 1975. Antigenic difference in phloem exudates of healthy and lethal yellowing disease coconut palms. Proc. Amer. Phytopathol. Soc. **2**:71.

22.- Chen, R.A. 1966. Nutritional aspects of lethal yellowing in coconuts. Trop. Agric. (Trinidad) **43**:211-218.

23.- Chen, k.H., Guo, J.R., Wu, X.Y., Loi, N., Carrao, L., Guo, Y.H., Chen, Y.D., Osler, R., Pearson, R. y Chen, T.A. 1993. Comparision of monoclonal antibodies , DNA probes, and PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. Phytopathology **83**:915-922.

24.- Chen, T.A. y Jiang, X.F. 1988. Monoclonal antibodies against the maize bushy stunt agent. Can. J. Microbiol. **34**:6-11.

25.- Ciferri, R. 1929. Phytopathological survey of Santo domingo, 1925-1929. j. dept. Agric. Porto Rico **14**:5-44.

26.- Clark, M.F., Morton, A. y Buss, S.L. 1989. Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO-associated antigens. Ann. Appl. Biol. **114**:111-124.

27.- Corbett, M.k. 1959. Disease of the coconut palm. Principes **3**:5-13.

28.- Cortazar, R.M. y Carrillo, R.H. 1996. Guía ilustrada para la formación de híbridos de cocotero. Publicación Especial SAGAR-INIFAP-CIR-SURESTE-MEXICO. 13 pp.

29.- Crisci, J.V. y López, A.M.F. 1983. Introducción a la teoría práctica de la taxonomía númerica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 129 pp.

30.- Dabek, A.J. 1974. Biochemestry of coconut palms affected with the lethal yellowing disease in Jamaica. Phytopathol. Z. **81**:346-353.

31.- Dabek, A.J. y Waters, H. 1980. Attempts to transmit coconut lethal yellowing disease with palmm-feeding Fulgoroidea in Jamaica, 1977-79. (Abstr.) Proc. 4th meeting Int. counc. Lethal Yellowing. Univ. of Florida, agric. res. cent., ft. Lauderdale. publ. FL-80-1:13.

32.- Dabek, A.J y Hunt, P. 1976. Biochemistry of leaf senescence in coconut lethal yellowing, a disease associated with mycoplasma-like organisms. Trop Agric. (Trinidad) **53**:115-123.

33.- Dabek, A.J., Jhonson, C.G. y Harries, H.C. 1976. Mycoplasma-like organisms associated with Kaincope and Cape St. Paul wilt diseases of coconut palms in west africa. PANS **22**:354-358.

34.- Davis, M.J, Tsai, J.H, Cox, R.L, McDaniel, L.L. y Harrison, N.A. 1988. Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasmalike organism that causes maize bushy stunt disease. Molecular Plant-Microbe Interactions **1**:295-302.

35.- Davis, R.E. y Lee, I-M. 1993. Cluster-Specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasmalike organism. Phytopathology. **83**:1008-1011.

36.- Davis, R.E., Prince, J.P. Hammond, R.W. Dally, E.L. y Lee, I.-M. 1992. Polymerase chain reaction detection of Italian periwinkle virescence mycoplasmalike organism (MLO) and evidence for relatedness with aster yellows MLOs. Petria **2**:184-193.

37.- De La Torre, C. 1906. La enfermedad de los cocoteros. Rev. de la Facultad de Let. y Cienc. (Havana) **2**:269-281.

38.- Deng, S, y Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. J. Microbiol. Methods **14**:53-61.

39.- Deng, S, y Hiruki, C. 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasmalike organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. Phytopathology **81**:1475-1479.

40.- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. y Asuyana, H. 1969. Mycoplasma or P.L.T. group-like organism found in the floem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows or paulownia witches broom. Ann. Phytopathology. Soc. Jpn. **33**:259-266.

41.- Dollet, M. y Giannotti, J. 1976. Maladie de Kaïncopé, présence de Mycoplasmes dans le phloéme des cocotiers malades. Oléagineux **31**:169-171.

42.- Dollet, M., Giannotti, J., Renard, J.L. y Ghosh, S.K. 1977. Étude d´un jaunissement létal des cocotiers au Cameroun: la maladie de kribi. Observations d´organismes de type mycoplasmes. Oléagineux **32**:317-322.

43.- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus **12**:13-15.

44.- Eden-Green, S.J. 1978. rearing and transmission techniques for Haplaxius sp., a suspected vector of lethal yellowing disease of coconut palms in Jamaica. Ann. appl. Biol. **89**:173-176.

45.- Elizondo, S. F. 1981. La roña del cocotero en el estado de Colima. Folleto para productores Núm. 2 SARH-INIA. Tecomán, Colima, México. 10 pp.

46.- Firrao, G, Gobbi, E y Locci, R. 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligunucleotide probes for mycoplasmalike organisms. Phytopathology **83**:602-607.

47.- Fiskell, J.G.A. Martínez, A.P. y Van Weerdt, L.G. 1959. Chemical studies on the roots and leaves of coconut palms affected by lethal yellowing. Proc. Florida State Hortic. Soc. **72**:408-413.

48.- Foissac, X., Danet, J.L,. Saillard, C., Gaurivaud, P., Laigret, F., Paré, C. y Bové, J.M. .1997. Mutagenesis by insertion of Tn4001 into the genome of Spiroplasma citri: Characterization of mutants affected in plant pathogenicity and transmission to the plant by the leafhopper vector Circulifer haematoceps. Molecular Plant-Microbe Interactions **10**:454-461.

49.- Gibb, K.S., Persley, D.M., Schneider, B. y Thomas, J.E. 1996. Phytoplasmas associated with papaya diseases in Australia. Plant Disease **80**:174-178.

50.- Griffiths, H.M, Sinclair, W.A, Davis, R.E, Lee, I.-M, Dally, E.L, Guo, Y-H, Chen, T.A. y Hibben, C.R. 1994. Characterization of micoplasmalike organisms from Fraxinus, Syringa, and associated plants from geographically diverse sites. Phytopathology **84**:119-126.

51.- Harries, H.C. 1978. Lethal yellowing disease of coconuts in global perspective. Philippine J. Coconut Sci. **3**:1-4.

52.- Harrison, N.A., Tsai, J.H., Bourne, C.M. y Richardson, P.A. 1991. Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of mycoplasmalike organisms associated with witches'-broom disease of pigeon pea in Florida. Molecular Plant-Microbe Interactions **4**:300-307.

53.- Harrison, N.A., Bourne, C.M., Cox, R.L., Tsai, J.H. y Richardson, P.A. 1992. DNA probes for detection of mycoplasmalike organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida. Phytopathology **82**:216-224.

54.- Harrison, N.A. y Oropeza, C. 1997. Recent studies on detection of lethal yellowing disease phytoplasmas in the Americas. pp. 221-234. In: Proceedings of an international workshop on lethal ytellowing-like diseases of coconut, Elmina, Ghana, November 1995. Eden-Green and Ofori F. (eds.). Natural Resources Institute (NRI).

55.- Harrison, N.A., Richardson, P.A. y Tsai, J.H. 1993. Detection and diagnosis of lethal yellowing: Conventional methods and molecular techniques. Simposium Internacional sobre el Amarillamiento Letal del Cocotero. Mérida, Yucatán, México. 16 pp.

56.- Harrison, N.A., Richardson, P.A., Jones, P., Tymon, A.M. Eden-Green, S.J. y Mpunami, A.A. 1994. Comparative Investigation of MLOs Associated with Caribbean and African Coconut Lethal Decline Diseases by DNA Hybridization and PCR Assays. Plant Disease **78**:507-511.

57.- Harrison, N.A, Richardson, P.A, Kramer, J.B, y Tsai, J.H. 1994. Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in florida by polymerase chain reaction. Plant Pathology **43**:998-1008.

58.- Harrison, N.A., Richardson, P.A., Tsai, J.H., Ebbert, M.A. y Kramer, J.B. 1996. PCR assay for detection of the Phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. Plant Disease **80**:263-269.

59.- Heinze, K.G., Petzold, H. y Marwitz, R. 1972. Beitrag zür Atiologie der Todlichen Vergilbung der Kokospalme. Phytopathology Z. **74**:230-237.

60.- Hibben, C.R., Sinclair, W.A., Davis, R.E. y Alexander, J.H.II. 1991. Relateness of mycoplasmalike organisms associated with ash yellows and lilac witvhes´-broom. Plant Dis. **75**:1227-1230.

61.- Howard, F.W. 1980. Attractiveness of date and coconut palms to *Myndus crudus* and other homopterans. Proc. Florida State Hortic. Soc. **93**:199-201.

62.- Howard, F.W. y Collins, M.E. 1978. Palm species susceptible and resistant to mycoplasmalike organism-associated lethal declines in Fair-child Tropical Gardens, 1971-1977. Univ. of Florida, Agric. Res. Cent., Ft. Lauderdale, Publ. FL-78-5:1-26.

63.- Howard, F. W. y McCoy, R.E. 1980. Reduction in spread of mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm Veitchia merrillii by the use of insecticides. J. Econ. Ent. **73**:268-270.

64.- Howard, F.W. y Mead, F.M. 1980. A survey of Auchenorryncha (Insecta: Homoptera) associated with palms in southern Florida. Trop. Agric. (Trinidad) **57**:145-153.

65.- Howard, F.W. y Thomas, D.L. 1980. Transmission of palm lethal decline to *Veitchia merrillii* by planthopper, *Myndus crudus*. J. Econ. Ent. **73**:715-717.

66.- INIFAP. 1997. Proyecto: Producción de híbridos para la reactivación de 850 hectáreas de cocotero.SAGAR-INIFAP. México, D.F. 21 pp.

67.- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F. y Bové, J.-M. 1994. Differentiation of mycoplasmalike organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. Appl. Environ. Microbiol. **60**:2916-2923.

68.- Jhonson, C.G. y Eden-Green, S.J. 1978. The search for a vector of lethal yellowing of coconuts in Jamaica: reapprasial of experiments from 1962-1971. FAO plant Prot. Bull. **26**:137-149.

69.- Jhonston, J.R. 1912. The history and cause of coconut bud-rot. USDA Bureau Plant Indust. Bull. No. 228. 175 pp.

70.- Kirkpatrick, B.C. 1992. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. pp 4050-4067. *In*: A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (ed). The prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.

71.- Kirkpatrick, B.C., Fisher, G.A., Fraser, J.D. y Purcell, A.H. 1990. Epidemiological and phylogenetic studies on western X-disease mycoplasma-like organisms. pp 288-302 ***In***: Recent advances in mycoplasmology. G. Stanek, G.H. Cassell, J.G. Tully, and R.F. Whitcomb, eds. Gustav Fischer Verlag, New York.

72.- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. y Purcell, A.H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. Science **238**:197-200.

73.- Ko, H.C. y Lin, C.P. 1994. Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasmalike organism associated with sweetpotato witches'-broom. Phytopathology **84**: 468-473.

74.- Kramer, J.P. 1979. Taxonomic study of the planthopper genus Myndus in the Americas (Homoptera: Fulgoroidea: Cixiidae). Trans. Amer. Ent. Soc. **105**:301-389.

75.- Kranz, J., Schmutterer, H. y Koch, W. eds. 1977. Diseases, pests, and weeds in tropical crops. Jhon Wiley & Sons, Ltd., Chichester, New York, Brisbane, Toronto. 666 pp.

76.- Kummert, J., y Rufflard, G. A. 1997. Preliminary report on the detection of Phytoplasmas by PCR. Biochemica **1**:19-22.

77.- Kuske, C. R. y Kirkpatrick, B.C. 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasmalike organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**:226-233.

78.- Kuske, C.R., Kirkpatrick, B.C., Davis, M.J. y Seemüller, E. 1991. DNA hybridization between western aster yellows mycoplasma-like organism plasmids and extrachromosomal DNA from other plant pathogenic mycoplasma-like organisms. Mol. Plant-Microbe Interact. **4**:75-80.

79.- Kuske, C.R., Kirkpatrick, B.C. y Seemüller, E. 1990. Differentiation of virescence mycoplasmalike organisms using western aster yellows mycoplasmalike organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polimorphism analysis. J. Gen. Microbiol. **137**:153-159.

80.- Leach, R. 1946. The unknown disease of coconut palm in Jamaica. Trop. Agric. (Trinidad) **23**:50-60.

81.- Leal, K. D.S., Martínez, V.I.O., López, M. A. y Martínez, S. J.P. 1995. Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol. **33**:3087-3090.

82.- Lee, I.-M., Bertaccini, A., Vibio, M. y Gundersen, D.E. 1995. Detection of multiple Phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology **85**:728-735.

83.- Lee, I.-M., y Davis, R.E. 1988. Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organisms using cloned DNA and RNA probes. Mol. Plant-Microbe Interact. **1**:303-310.

84.- Lee, I.-M., y Davis, R.E. 1992. Mycoplasmas wich infect plants and insects. pp 379-390 *In*: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. J. Maniloff, L.R. Finch, and J.B. Baseman, eds. American Society for Microbiology, Washington, DC.

85.- Lee, I-M, Davis, R.E., Chen, T.-A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C. y Schaff, D.A. 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasmalike organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. Phytopathology **82**:977-986.

86.- Lee, I-M, Davis, R.E, y Hsu, H.-T. 1993. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasmalike organism strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies. Plant Disease **77**:815-817.

87.- Lee, I.-M, Davis, R.E., Sinclair, W.A, DeWitt, N.D. y Conti, M. 1993. Genetic Relatedness of Mycoplasmalike Organisms Detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by Means of DNA Probes and Polymerase Chain Reactions. Phytopathology **83**:829-833.

88.- Lee, I.-M, Gundersen, D.E, Hammond, R.W. y Davis, R.E. 1994. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. Phytopathology **84**:559-566.

89.- Lee, I.-M, Hammond, R.W, Davis, R.E. y Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology **83**:834-842.

90.- León, R., Santamaría, J.M., Alpizar, L., Escamilla, J.A. y Oropeza C. 1996. Physiological and biochimical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. Nwe Phytol. **134**:227-234.

91.- Leza, M. A. 1993. Amarillamiento letal del cocotero y otras palmas. En: L.M. Alejandro (comp.). Amarillamiento letal del cocotero y otras palmas. CICY. Mérida ,Yucatán, México. 1-28 pp

92.- Lim, P.O. y Sears, B.B. 1989. 16S rRNA sequence indicated that plant-pathogenic mycoplasmalike organisms are evolucionarily distinct from animal mycoplasmas. J. Bacteriol. **171**:5901-5906.

93.- Liu, H.W., Goodwin, P.H. y Kuske, C.R. 1994. Quantification of DNA from the aster yellows mycoplasmalike organism in aster leafhoppers (*Macrosteles fascifrons* Stal) by a competitive polymerase chain reaction. Syst. Appl. Microbiol. **17**:274-280.

94.- Lorenz, K-H, Schneider, B, Ahrens, U, y Seemüller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology **85**:771-776.

95.- Malinowski, T., Zandarski, J., Komoirowska, B. y Zawadzka, B. 1996. Detection of pear decline phytoplasma in declining pear trees in Poland. Research Institute of Pomology and Floriculture. Plant Dis. **80**:464.

96.- Maramorosch, K. 1964. A survey of coconut disease of unknown etiology. FAO, Rome. 39 pp.

97.- Maramorosch, K. 1978. Amarelecimiento letal do coqueiro: distribuicao, impacto, e implicacoes mundiais. Fitopat. Brasileira **3**:135-148.

98.- Maramorosch, K. y Hunt P. 1981. Lethal yellowing disease of coconut and other plants. In: Mycoplasma diseases of trees and ahrubs. 1ra. Ed. Maramorosch K. y Raychaudhuri (Eds.) USA pp. 185-211.

99.- Marcone, C., Ragozzino, A., Schneider, B., Lauer, U., Smart, C.D. y Seemüller, E. 1996. Genetic characterization and classification of two Phytoplasmas associated with spartium witches´- broom disease. Plant Disease **80**:365-371.

100.- Marcone, C., Ragozzino, A. y Seemüller, E. 1997. Detection of bermuda grass white leaf disease in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP nalalysis. Plant Disease **81**:862-866.

101.- Mark, C. 1988. DNA strider. A. C. program for DNA and protein sequences analysis. Department de Biologie. Institut de Recherche Fondamentale.

102.- Martyn, E.B. 1949. Further observations on the "unknown disease" of coconuts. Trop. Agric. (Trinidad) **26**:110-112.

103.- Marwitz, R. 1990. Diversity of yellows disease agents in plant infections. Zbl. Bakt. Hyg (Suppl.) **20**:431-434.

104.- Marx, J.L. 1985. New sickle cell test. science **230**:1365.

105.- Matteoni, J.A. y Sinclair W.A. 1983. Stomatal closure in plants infected with mycoplasmalike organisms. Phytopathology **73**:398-402.

106.- McCoy, R.E. 1976. Uptake, translocation, and persistence of oxytetracycline in coconut palm. Phytopathology **66**:1039-1042.

107.- McCoy, R.E. 1982. Use of tetracycline antibiotics to control yellow diseases. plant Disease **66**:539-542.

108.- McCoy, R.E. y Gwin, G.H. 1977. Response of micoplasmalike organism-infected Pritcharida, Trachycarpus, and Veitchia palms to oxytetravcycline. Plant Dis. Reptr. **61**:154-158.

109.- McCoy, R.E., Carroll, V.J., Poucher, C.P. y Gwin, G.H. 1976. Field control of coconut lethal yellowing with oxytetracycline-hydrocloride. Phytopathology **66**:1148-1150.

110.- McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt, L. y Collins, M.E. 1983. Lethal yellowing of palms. Agricultural Experiment Stations. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville. Bulletin 834. 100 pp.

111.- McCoy, R.E., Miller, M.E., Thomas, D.L. y Amador, J. 1980. Lethal decline of Phoenix palms in Texas associated with mycoplasmalike organisms. Plant Disease **64**:1038-1039.

112.- McDonough, J. y Zimmermann, M.H. 1979. Effect of lethal yellowing on xylem pressure in coconut palms. principes **23**:132-137.

113.- McLaughlin, G.L., Edlind, T.D. y Ihler, G.M. 1986. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. J. Protozoology **33**: 125-128.

114.- Mijailova, P.T. 1967. Informe sobre la investigación de la enfermedad "Pudrición del cogollo del cocotero" (*Cocos nucifera* L.). Rev. de Agric. (Habana) **1**:74-110.

115.- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American **262**:36-43.

116.- Mullis, K.B. y Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro: a polymerase-catalysed chain reaction. Methods Enzymol. **155**:335-350.

117.- Murray, H.G. y Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.

118.- Nakamura, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Sahashi, N., Kubono, T. y Shoji, T. 1996. Evaluation of primer pairs for the reliable diagnosis of paulownia witches'-broom disease using a polymerase chain reaction. Plant Disease **80**:302-305.

119.- Nakashima, K., Kato, S., Iwanami, S. y Murata, N. 1991. Cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA from Mycoplasmalike organisms that cause yellow dwarf disease of rice. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3570-3575.

120.- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaisu, H., Shiozawa, H. y Tsuchizaki, T. 1993. Detection and differentation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. Phytopathology **83**:786-791.

121.- Nocard, E., Roux, E.R. y Dujardin, B. 1898. Le microbe de la peripneumonie. Ann. Inst. Pasteur, Paris **12**:240.

122.- Nutman, F.J. y Roberts, P.M. 1955. Lethal yellowing: the "unknown disease of coconut palm in Jamaica". Emp. J. Exp. Agric. **23**:257-267.

123.- Okuda, S., Prince, J.P., Davis, R.E., Dally, E.L., Lee, M., Mogen, B y Kato, S. 1997. Two groups of Phytoplasmas from Japan distinguished on the basis of amplification and restriction analysis of 16S rDNA. Plant Disease **81**:301-305.

124.- Oliver, P.L. 1961. The Pacific Islands. doubleday and Co., Inc. Garden City, New York. 456 pp.

125.- Oropeza, C. y Arellano, J. 1994. The coconut industry in Latin America and the Caribbean. pp. 33-47. In: *Coconut Industry into the 21st Century*. Pangahas, B.B. (ed.). Jakarta, Indonesia: Asia and Pacific Coconut Community (APCC).

126.- Oropeza, C.M., Santamaría, J.M., Villanueva, M.A. y Loyola-Vargas, V.M. 1991. Physiology and biochemestry of lethal yellowing in Cocos nucifera. Principes **35**:208-212.

127.- Parthasarathy, M.V. 1974. Mycoplasmalike organisms associated with lethal yellowing disease palms. Phytopathology **64**:667-674.

128.- Petterson, B., Johansson, K.-E., y Uhlen, M. 1994. Sequence analysis of 16S rRNA from mycoplasmas by direct solid-phase DNA sequencing. American Society for Microbiology **60**:2456-2461.

129.- Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M. y Johansson, K.E. 1996. Phylogeny of the Mycoplasma mycoides cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. Journal-Bacteriology **14**:4131-4132.

130.- Piña, R.J. y Carrillo, R.H. 1985. Distribución y propagación del amarillamiento letal del cocotero en el estado de QRoo. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Fitopatología. México.

131.- Plavsic - Banjac, B., Hunt, P. y Maramorosch, K. 1972. Mycoplasmalike bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. Phytopathology **62**:298-299.

132.- Purseglove, J. I. 1975. Tropiocal crops, monocotyledons. Jhon Wiley and Sons, New York. 607 pp.

133.- Rahardja, U., Whalon, M.E., García, S.C. y Yan, Y.T. 1992. Field detection of X-disease mycoplasmalike organism in *Paraphlepsius irroratus* (Say) (Homoptera:Cicadellidae) using a DNA probe. Environ. Entomol. **21**:81-88.

134.- Rogers, S.O. y Bendich, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology **5**:69-76.

135.- Rogers, S.O. y Bendich, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual **A6**:1-10.

136.- Rommey, D.H. 1972. Past studies on and present status of lethal yellowing disease of coconuts. PANS **18**:386-395.

137.- Roy, P. 1989. Use of Nucleic Acids in Diagnosis. Biotechnology for livestock production. New York, Plenum Press. 301-310 pp.

138.- Russel, W.C., Newman, C. y Williamson, D.H. 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature **253**:461-462.

139.- Saiki, R.K, Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T, Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzimatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**:487-491.

140.- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G., Erlich, H. y Arnheim, N. 1985. novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia. Am. J. Hum. Gen. **37**:P.P. 172.

141.- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a labotatory manual , 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

142.- Schaff, D., Lee, I.-M. y Davis, R.E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasmalike organisms in plants by polymerase chain reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**:1503-1509.

143.- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C. y Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organism using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. Journal of General Microbiology **139**:519-527.

144.- Schneider, B. y Gibb, K.S. 1997. Detection of Phytoplasmas in declining pears in Southern Australia. Plant Disease **81**:254-258.

145.- Schuiling, M. 1976. A survey of insect populations on *Cocos nucifera*. (Abstr.) Principes **20**:67.

146.- Schuling, M. y Mpunami, A. 1990. Lethal yellowing disease in Tanzania: Review of research up to date and preliminary results of resistance trials. pp 171-183 *In*: La problemática del Amarillamiento Letal del Cocotero en México. M.L. Robert and Zizumbo V., eds. CICY, Mérida, Yucatán, México.

147.- Seemüller, E. 1976. Investigations to demostrate mycoplasmalike organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. Acta Hortic. **67**:109-112.

148.- Simone, G.W. 1992. Lethal yellowing disease. In: Diseases and disordes of ornamental palms. 1 Ed. Chase, A.R. y Broschat, T.K. (Eds.) APS Press St. Paul, Minessota. pp 16-20.

149.- Sinclair, W.A., Griffiths, H.M., Davis, R.E. y Lee, I.-M. 1992. Detection of ash yellows mycoplasmalike organisms in different tree organs and in chemically preserved specimes by a DNA probe vs DAPI. Pant Dis. **76**:154-158.

150.- Sinclair, W.A., Griffiths, H.M. y Whitlow, T.H. 1997. Comparisons of tolerance of Ash Yellows Phytoplasmas in Fraxinus species and rootstock-scion combinations. Plant Disease **81**:395-398.

151.- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E. y Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer-Region. Applied and Environmental Microbiology **62**:2988-2993.

152.- Stanoz, G.R, Heimann, M.F, y Lee, I-M. 1997. Purple coneflower is a host of the Aster Yellows Phytoplasma. (Abstr.) Plant Disease **81**:424.

153.- Steiner, K.G. 1976. Epidemiology of Kaïncopé disease of coconut palms in Togo. Plant Dis. Reptr. **60**:613-617.

154.- Taylor, B. y Powell, A. 1982. Isolation of plant DNA and RNA. Focus **4**:4-6.

155.- Thomas, D.L. 1979. Mycoplasmalike bodies associated with lethal declines of palms in Florida. Phytopathology **69**:928-934.

156.- Thomas, D.L. y Norris, R.C. 1980. The use of the electron microscope for lethal yellowing diagnosis. Proc. Fla. State Hortic. Soc. **93**:196-199.

157.- Tsai, J.H. 1975. Transmission studies of three suspected insect vectors of lethal yellowing of coconut palm. FAO Plant Prot. Bull. **25**:140-145.

158.- Tsai, J.H. 1977. Attempts to transmit lethal yellowing of coconut palm by the planthopper *Haplaxius crudus*. Plant Dis. Reptr. **61**:304-307.

159.- Tsai, J.H. 1979. Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. pp.266-307. *In:* R.F. Whitcomb and J.G. Tully, eds. The Mycoplasmas. Vol. III. Academic Press, New York, N.Y.

160.- Tsai, J.H. 1980. Lethal yellowing of coconut palm: search for a vector. *In*: Harris, K.F. and Maramoroch eds. "Vectors of plant pathogen". Academic press, New York, N.Y. pp 177-200.

161.- Tully, J.G. y Whitcomb, R.F. (eds.). 1979. Human and animal mycoplasmas. vol. 2 of the Mycoplasmas (Academic Press, N.Y.).

162.- Van der Plank, J.E. 1963. Plant diseases: epidemics and control. Academic Press, New York, N.Y. 349 pp.

163.- Villanueva, B.J.R. 1990. Dispersión del amarillamiento letal del cocotero en México. en: Tercera reunión anual del CIFAP-Veracruz. Publicación Especial Núm. 2. Veracruz Ver., México. pp. 247-259.

164.- Villanueva, B. J.R., Piña, R.J. y Carrillo, R.H. 1985. Amarillamiento letal del cocotero. Folleto Técnico Núm, 84. SARH-INIA. México, D.F. 11 pp.

165.- Whitcomb, R.F. y Tully, J.G. 1990. The mycoplasmas. Spiroplasmas, Acholeplasmas, ar d Mycoplasmas of plants an arthropods. Academic Press, Inc. V.

166.- Zizumbo, V.D. 1993. Variedades de cocotero y disponibilidad de germoplasma en México. En: L.M. Alejandro (comp.). Amarillamiento letal del cocotero y otras palmas. CICY. Mérida ,Yucatán, México. pp78-87.

167.- Zreik, L., Carle P., Bové, J.M. y Garnier M. 1995. Characterization of the Mycoplasmalike Organism Associated with Witches'-Broom Disease of lime and proposition of a Candidatus Taxon for the Organism, "Candidatus Phytoplasma aurantifolia". International Journal of Systematyc Bacteriology **45**:449-453.

APENDICE

aagacctagcaataggtatgcttagggaggagcttgcgtcacattagttagttggt

ggggtaaaggcctaccaagactatgatgtgtagccgggctgagaggttgaacggcc

acattgggactgagacacggcccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatttt

cggcaatggaggaaactctgaccgagcaacgccgcgtgaacgatgaagtatttcgg

tacgtaaagttcttttattagggaagaataaatgatggaaaaatc

Fig. 1. Composición de bases del fragmento amplificado por PCR, a partir del DNA genómico de cocotero con síntomas de infección por AL, utilizando los iniciadores MMF/MMR.

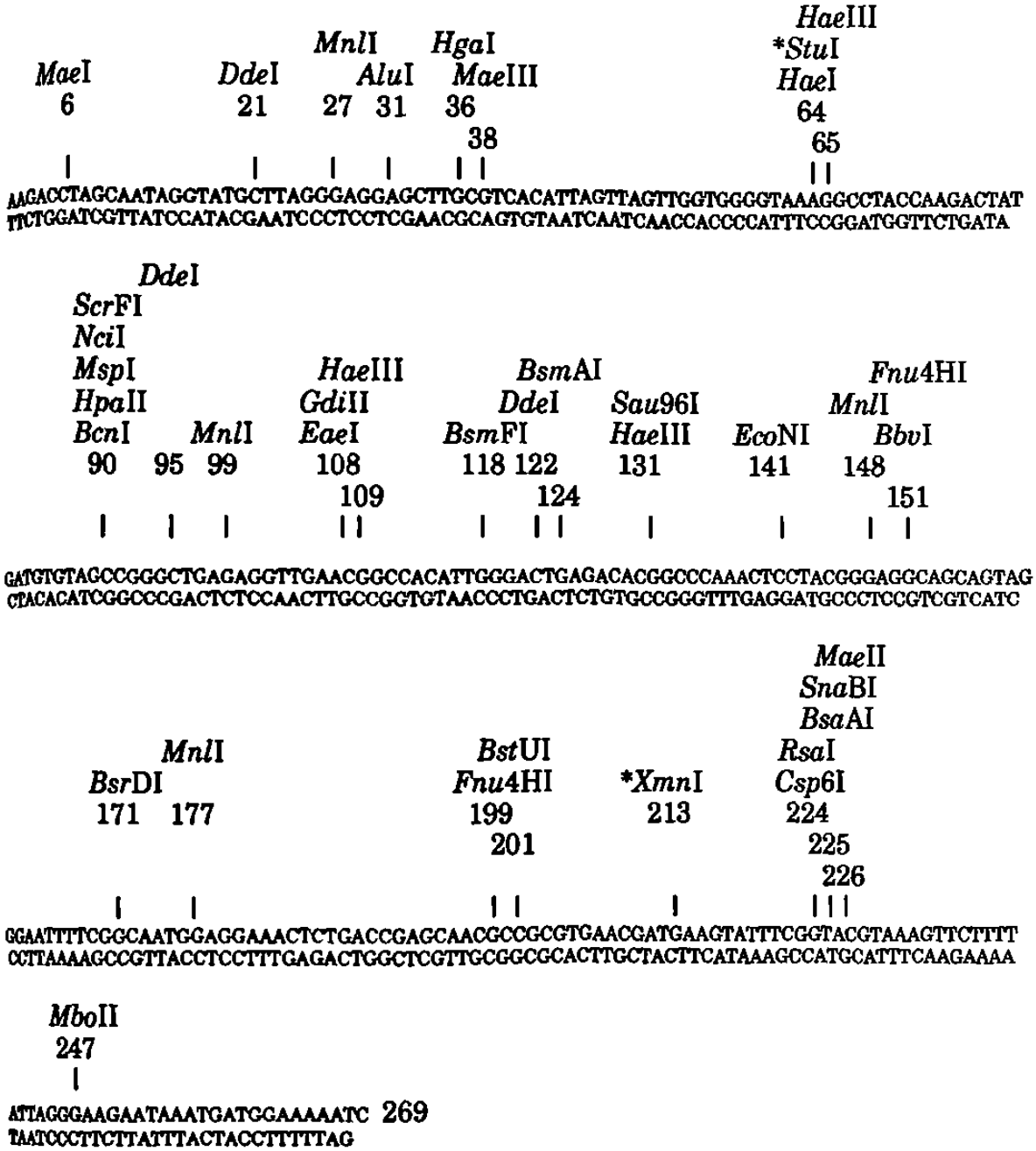

Fig. 2. Mapa de restricción obtenido mediante el programa computacional DNA Strider 1.01 (Marck, 1988), del fragmento amplificado por PCR, a partir del DNA genómico de cocotero con síntomas de infección por AL, utilizando los iniciadores MMF/MMR.

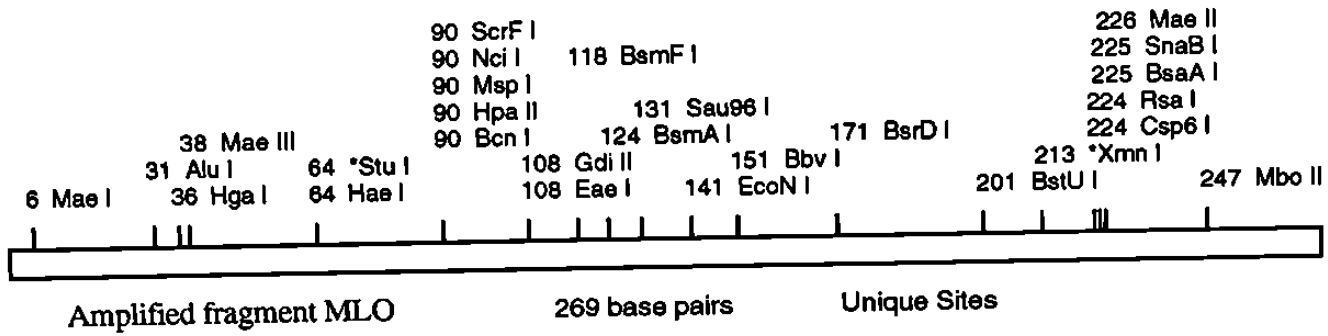

Fig. 3. Mapa gráfico de sitios únicos de cortes, obtenido mediante el programa computacional DNA Strider 1.01 (Marck, 1988), del fragmento amplificado por PCR, a partir del DNA genómico de cocotero con síntomas de infección por AL, utilizando los iniciadores MMF/MMR.