



■ PROBLEMA ABORDADO

Detección de las dos cepas predominantes de fitoplasmas del amarillamiento letal en México

El cocotero es una especie de palmera cultivada en todo el mundo. Es muy importante porque de ella se pueden obtener varios productos, especialmente del fruto. Los mercados de productos de coco (agua de coco, aceite virgen y otros) están creciendo muy rápidamente. Desgraciadamente, la producción de fruta se está ralentizando, principalmente debido a los problemas fitosanitarios y a la edad de las plantaciones. El principal problema fitosanitario es el amarillamiento letal, una enfermedad devastadora asociada a la presencia de fitoplasmas. En América, el amarillamiento letal afecta a varias especies de palmeras, además del coco, como *Adonidia merrillii*, *Pritchardia pacífica*, *Phoenix canariensis*.

En México, existen dos cepas predominantes de fitoplasmas del amarillamiento letal, pertenecientes a los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D. Están ampliamente distribuidos por todo el país e infectan a diferentes especies de palmeras. Normalmente, para determinar la presencia de diferentes cepas de amarillamiento letal, las muestras de ADN de la planta o del insecto vector se someten a dos rondas de amplificación por PCR (PCR anidada) y a la secuenciación de los productos del gen 16S rRNA. Pero este proceso es largo y costoso.



- Síntomas de amarillamiento letal en palmeras de Manila (*Adonidia merrillii*) en Yucatán, México. Pardeamiento de las hojas (A). Inflorescencias necróticas (B). Una palmera con necrosis de la hoja de la espiga (C) y un primer plano de la hoja de la espiga necrosada (D). Palmera con la mayor parte de la corona afectada (E). Palmera asintomática no infectada (F) y sus correspondientes inflorescencias (G). Las palmeras de Manila pueden ser infectadas por las cepas 16SrIV-A y 16SrIV-D del fitoplasma.

■ PRÁCTICA/INNOVACIÓN PROPUESTA POR TROPICSAFE

Mejora de la detección de dos cepas de fitoplasmas del amarillamiento letal

Se ha desarrollado un nuevo ensayo de PCR cuantitativa (q-PCR) para facilitar la detección e identificación de las dos cepas del fitoplasma del amarillamiento letal 16SrIV-A y -D. El procedimiento se basa en las diferencias entre ellos, lo que reduce el tiempo de procesamiento. Aumenta la eficiencia de los recursos al eliminar los pasos necesarios para ejecutar los productos de PCR anidados, digerirlos con enzimas de restricción y determinar los perfiles de digestión, o secuenciar los amplicones.



■ ¿CÓMO SE ESTÁ IMPLEMENTANDO?

Desarrollo de un nuevo ensayo qPCR para la detección de fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A y -D en un solo tubo

Con el objetivo de detectar las dos cepas de fitoplasma del amarillamiento letal mexicano predominantes (16SrIV-A y -D) de una manera más simple y rápida, el nuevo protocolo de análisis fue diseñado para ser realizado en el mismo tubo con una sola reacción qPCR.

Se evaluó la especificidad y la sensibilidad de la nueva prueba. Fue capaz de detectar las cepas 16SrIV-A y -D, pero no otros fitoplasmas, y es capaz de detectar 0,01 ng de ADN de fitoplasma. Por lo tanto, el ensayo representa una mejora en la especificidad y/o sensibilidad con respecto a las pruebas descritas anteriormente (Bahder *et al.*, 2017; Cordova *et al.*, 2014; Harrison *et al.*, 1999).

	Cepa de fitoplasma (subgrupo ribosómico)	Test qPCR		PCR anidada		
		16SrIV-A	16SrIV-D			
Fitoplasmas en las palmeras	Disminución letal del coco, Tanzania ^A	16SrIV-C	-	-	+	
	Amarillamiento letal del coco, Mozambique ^A	16SrXXII-A	-	-	+	
	Amarillamiento letal del coco, Florida ^A	16SrIV-A	+	-	+	
	Amarillamiento letal del coco, México ^B	16SrIV-A	+	-	+	
	<i>Prichardia pacifica</i> , amarillamiento letal, México ^B	16SrIV-D	-	+	+	
	<i>Adonia merrillii</i> , amarillamiento letal, México ^B	16SrIV-D	-	+	+	
	Cocotero sano, México ^B	-	-	-	-	
	Cocotero sano, Mozambique ^A	-	-	-	-	
	Otros fitoplasmas	' <i>Ca. P. pruni</i> ', cepa PWX ^A	16SrIII-A	-	-	+
		' <i>Ca. P. ulmi</i> ', cepa EY ^A	16SrV-A	-	-	+
' <i>Ca. P. ziziphi</i> ', cepa JWB ^A		16SrV-B	-	-	+	
' <i>Ca. P. trifolii</i> ', cepa BLTVA ^A		16SrVI-A	-	-	+	
' <i>Ca. P. fraxini</i> ', cepa ASHY ^A		16SrVII-A	-	-	+	
' <i>Ca. P. hispanicum</i> ', cepa MPV ^A		16SrXIII-A	-	-	+	
Virescencia de la fresa, cepa SGP ^A		16SrXIII-B	-	-	+	
' <i>Ca. P. cynodontis</i> ', cepa BGWL ^A		16SrXIV-A	-	-	+	

Probado por duplicado. (-) no detectado; (+) fitoplasma detectado; '*Ca. P. Candidatus Phytoplasma*'. Fuentes de ADN de fitoplasma: (^A) Dr. Nigel Harrison, Universidad de Florida, FL 33314, USA; and (^B) CICY, Mérida, Yucatán, 97205 México.

- Detección específica de fitoplasmas de diferentes grupos y subgrupos ribosómicos con la nueva prueba qPCR en comparación con la prueba PCR anidada estándar.

Límite de detección del ensayo qPCR

ADN (ng)	100	10	1	0,1	0,01
16SrIV-A	20,3 ± 0,1	23,5 ± 0,1	27,0 ± 0,1	30,0 ± 0,1	34,0 ± 0,0
16SrIV-D	22,2 ± 0,0	24,8 ± 0,3	28,1 ± 0,1	31,2 ± 0,1	35,0 ± 0,1

Probado por duplicado. Ct: umbral del ciclo. DS: desviación estándar. Las muestras se consideraron negativas si el valor de Ct era ≥ 37 .

- Evaluación de la sensibilidad del nuevo protocolo de prueba qPCR para la detección de fitoplasmas de los subgrupos 16SrIV-A y 16SrIV-D. Las muestras de ADN utilizadas procedían de un cocotero infectado con 16SrIV-A y de una palmera infectada con *Adonia merrillii* para 16SrIV-D, analizadas en un solo tubo.

■ ¿CÓMO ESTÁ FUNCIONANDO?

Evaluación del ensayo qPCR para la detección de fitoplasmas del subgrupo 16SrIV-A y -D en un solo tubo

Para evaluar el funcionamiento del nuevo ensayo qPCR, se analizó un conjunto de muestras de ADN obtenidas de tejidos del tronco de diferentes especies de palmeras que mostraban síntomas de amarillamiento letal y resultaron positivas para los fitoplasmas 16SrIV-A o 16SrIV-D. Estos resultados coinciden con el análisis de secuenciación realizado por separado. Por lo tanto, estos resultados confirman la capacidad de la prueba para detectar específicamente el ADN del fitoplasma 16SrIV-A o 16SrIV-D en un solo tubo y con una sola reacción de qPCR. Esta prueba es útil para la investigación y los fines epidemiológicos.



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.



Especies de palmeras	Síntomas	qPCR no específica (Ct)	Nueva prueba qPCR de detección específica (Ct)		Subgrupo por prueba qPCR
			16SrIV-A	16SrIV-D	
Cocotero	No	ND	ND	ND	-
Cocotero	Sí	16,6	16,5	ND	16SrIV-A*
Cocotero	Sí	23,3	22,9	ND	16SrIV-A*
Cocotero	Sí	18,24	30,9	ND	16SrIV-A*
<i>Thrinax radiata</i>	Sí	14,58	25,6	ND	16SrIV-A*
<i>Phoenix canariensis</i>	Sí	21,5	ND	28,2	16SrIV-D*
<i>Phoenix canariensis</i>	Sí	23,2	ND	35,1	16SrIV-D*
<i>Phoenix canariensis</i>	Sí	25,7	ND	21,7	16SrIV-D*
<i>Phoenix canariensis</i>	Sí	22,2	ND	19,2	16SrIV-D*

Ct: umbral de ciclo; ND: no se detecta amplificación. Las muestras se consideraron negativas si el valor de Ct era ≥ 37 . Prueba de qPCR non específica según lo informado por Cordova *et al.*, 2014. (*) Subgrupo confirmado por el análisis de la secuencia.

- Detección de las cepas de fitoplasma 16SrIV-A y 16SrIV-D en muestras de ADN del tronco de la palmera mediante la nueva prueba qPCR. Se obtuvieron muestras de ADN de palmeras del estado de Yucatán (cocotero y *Thrinax radiata*) y del estado de Coahuila (*Phoenix canariensis*) en México.

PALABRAS CLAVE

Amarillamiento letal, fitoplasmas, palmeras, PCR cuantitativa

MÁS INFORMACIÓN

Bahder B.W., Helmick E.E., Harrison N. 2017. Detecting and differentiating phytoplasmas belonging to subgroups 16SrIV-A and 16SrIV-D associated with lethal declines of palms in Florida using qPCR and high-resolution melt analysis (HRMA). *Plant Disease* 101(8), 1449-1454.

Cordova I., Oropeza C., Puch-Hau C., Harrison N., Collí-Rodríguez A., Narvaez M., Nic-Matos G., Reyes C., Sáenz L. 2014. A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16SrIV subgroups -A, -D and -E found in the Americas. *Journal of Plant Pathology* 96, 343-352.

Córdova I., Oropeza C., Harrison N., Ku-Rodríguez S., Puch H.C., Narvaez M., Sáenz L. 2019. Simultaneous detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas (group 16SrIV) by real-time PCR assays using 16Sr- and groEL-based TaqMan probes. *Journal of Plant Pathology* 101(3), 609-619.

Harrison N.A., Cordova I., Richardson P., Di Bonito R., 1999. Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: Oropeza C., Verdeil J-L., Ashburner G.R., Cardeña R., Santamaria J.M. (eds). *Current Advances in Coconut Biotechnology*, pp. 183- 196. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

CRÉDITOS

Luis Sáenz Carbonell Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México vyca@cicy.mx

Iván Córdova Lara Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México cordoval@cicy.mx

Antonio Graciano Puch-Hau Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México antoniopuch71@gmail.com

Germán Nic-Matos Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México gnicmatos@gmail.com

Carlos Oropeza Salin Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México cos@cicy.mx

Noviembre, 2021



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.