



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Aislamiento, patogenicidad y  
transmisión con  
*Scaphytopius marginellatus* (Stal)  
de un fitoplasma asociado a  
cuero de sapo en yuca**

**Carlos Arturo Betancourth García**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Palmira, Colombia

2016



**Aislamiento, patogenicidad y  
transmisión con  
*Scaphytopius marginlineatus* (Stal)  
de un fitoplasma asociado a  
cuero de sapo en yuca**

**Carlos Arturo Betancourth García**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ciencias Agrarias**

Directores

I.A. Ph.D. Elizabeth Álvarez Cabrera

I.A. Ph.D. Jaime Eduardo Muñoz Flórez

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos

Grupo de Investigación:

Manejo Integrado de Enfermedades (Patología de Yuca CIAT)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2016



*Dedicatoria*

*A mi familia*



# Agradecimientos

## ASESORES

Directores: Elizabeth Álvarez Cabrera. Ph.D. Jefe de Patología de Yuca CIAT y Jaime Eduardo Muñoz Flórez. Ph.D. Profesor Titular Universidad Nacional de Colombia.

Juan Manuel Pardo García. MSc. Investigador Asociado Patología de Yuca CIAT. Por su permanente y generoso acompañamiento durante todo el desarrollo del trabajo.

## EQUIPO DE PATOLOGÍA DE YUCA

Investigadores, auxiliares de investigación, personal administrativo y personal de campo de Patología de Yuca. Por su constante apoyo.

María José Truke, Zulma Zamora, Viviana Domínguez, Germán Ceballos, Lederson Gañán, Michael Latorre, Juan Camilo Montoya Londoño y Carlos Mario Hernández.

## JURADOS EVALUADORES

Docentes Universidad Nacional de Colombia.

Por sus valiosos aportes académicos en la construcción del proyecto y la evaluación del trabajo final.

Lucia Afanador Kafuri. Ph.D.

Carlos Germán Muñoz. Ph.D.

Eyder Daniel Gómez López. Ph.D.

#### UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Institución donde laboro y quien me otorgó la Comisión de Estudios para poder llevar a cabo el programa de doctorado.

#### UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

Por la formación académica recibida durante el desarrollo del programa de doctorado.

#### CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT).

Por permitirme el desarrollo de la Tesis de investigación, la cual aportó de manera fundamental en mi formación profesional.

Al personal Directivo y Administrativo en general.

Biología: Dr. Ishitani Manabu. Préstamo de invernadero a prueba de insectos para mantenimiento de plantas in vitro.

Unidad de Biología: Roosevelt Escobar MSc., Investigador Asociado. Suministro de plantas de yuca in vitro.

Programa de Recursos Genéticos: Ericson Aranzales Rondón MSc., Coordinador Laboratorio de Conservación in vitro. Suministro de plantas de yuca in vitro.

Programa de Entomología: María Isabel Gómez Jiménez MSc, Investigadora Asistente.

Unidad de Virología: Dr. Wilmer Cuellar, Director Unidad de Virología y su equipo. Suministro de protocolos, cebadores y controles positivos para la detección de virus.

Università di Bologna: Doctores: Nicoletta Contaldo, Assunta Bertaccini, Samanta Paltinieri, Helena M. Windsor, G. David Windsor. Protocolo de aislamiento de fitoplasmas.

Mycoplasma Experience Limited: Doctores: Helena y David Windsor, suministro de medios de cultivo de fitoplasmas, PIVL y PIVS.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA): Dr. Robert Davis, Líder de Investigación en el Laboratorio de Patología Vegetal, por sus aportes y discusión para la implementación de ensayos y experimentación.

Iowa State University: Servicios de secuenciación.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Tibaitatá: Carlos Beltrán M.Sc. Entomólogo del Servicio de Diagnóstico, por la Identificación de los insectos.

EMBRAPA. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira, D. Sc. Investigador "A" en Fitopatología, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria

Universidad de Antioquia: Dr. Juan David Rodas G., Profesor asociado Sede de Investigación Universitaria, SIU, Laboratorio 233, Centauro de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.



# Contenido

	Pág.
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Antecedentes de investigación en cuero de sapo y generalidades sobre fitoplasmas .....</b>	<b>19</b>
1.1 Antecedentes .....	19
1.2 Generalidades sobre fitoplasmas .....	24
1.3 Sintomatología .....	25
1.4 Transmisión de fitoplasmas .....	26
1.5 Transmisión por semilla.....	26
1.6 Transmisión por insectos.....	26
1.7 Características genómicas de los fitoplasmas .....	28
1.8 Detección, taxonomía y filogenia de fitoplasmas .....	29
<b>Bibliografía .....</b>	<b>33</b>
<b>2. Aislamiento de un fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca (<i>Manihot esculenta Crantz</i>) .....</b>	<b>45</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>45</b>
2.1 Introducción.....	47
2.2 Materiales y métodos .....	48
2.2.1 Localización.....	48
2.2.2 Material vegetal .....	49
2.2.3 Aislamiento <i>in vitro</i> de fitoplasma 16SrIII-L .....	50
2.2.4 Pruebas Moleculares .....	54
2.2.4.1. Toma de muestras de medio líquido y sólido .....	54
2.2.4.2. Detección por PCR .....	54
2.2.4.3. PCR en tiempo real.....	55
2.2.4.4. Electroforesis .....	55
2.2.4.5. Patrones de restricción con enzima <i>Msel</i> .....	56
2.2.4.6. Secuenciación de ADN .....	56
2.2.4.7 Microscopia de Luz .....	56
2.2.4.8 Microscopia Electrónica de Transmisión .....	56
2.2.4.9. Pruebas de PCR complementarias .....	57
2.3 Resultados y Discusión .....	58
2.3.1 Aislamiento en medio líquido .....	58
2.3.2 Aislamiento en medio sólido .....	63

XII Aislamiento, patogenicidad y transmisión con *Scaphytopius marginelineatus* (Stal) de un fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca

---

2.3.2.1. Pruebas de PCR anidada .....	66
2.3.2.2. PCR en tiempo real .....	68
2.3.2.3 RFLP .....	68
2.3.2.4. Microscopia Electrónica .....	69
2.3.3 Secuenciación de ADN.....	73
2.3.4 Pruebas moleculares complementarias .....	74
2.4 Conclusiones y Recomendaciones .....	77
<b>Bibliografía .....</b>	<b>78</b>
<b>3. Pruebas de Patogenicidad con el fitoplasma 16SrIII-L en yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) .....</b>	<b>89</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>89</b>
3.1 Introducción .....	90
3.2 Materiales y métodos .....	93
3.2.1 Localización .....	93
3.2.2 Fuente de inóculo (inoculación por injerto) .....	94
3.2.3 Fuente de inóculo (fitoplasma crecido en medio PivL y PivS) .....	95
3.2.4 Material vegetal para pruebas de inoculación.....	96
3.2.5 Pruebas de Patogenicidad .....	98
3.2.6 Inoculación por injerto .....	98
3.2.7 Inoculación con medio PivL y PivS .....	100
3.2.8 Reaislamiento .....	102
3.2.9 Pruebas moleculares.....	102
3.2.10 Extracción de ADN total de plantas .....	103
3.2.11 Muestras de medio líquido y sólido (colonias) .....	103
3.2.12 Extracción de ARN (virus) .....	103
3.2.13 Detección por PCR (Fitoplasma) .....	104
3.2.14 Electroforesis .....	105
3.2.15 Secuenciación de ADN.....	105
3.2.16 RT-PCR.....	105
3.2.17 PCR en tiempo real (Fitoplasma y Reovirus).....	106
3.3 Resultados y Discusión.....	106
3.3.1 Fuente de inóculo (inoculación por injerto) .....	106
3.3.2 Fuente de inóculo (Fitoplasma crecido en medio PivL y PivS).....	108
3.3.3 Pruebas de Patogenicidad .....	110
3.3.3.1 Inoculación por injerto.....	110
3.3.3.2 Inoculación con medio PivL .....	115
3.3.3.3. Inoculación con medio PivS .....	117
3.3.4 Reaislamiento .....	120
3.4 Conclusiones y Recomendaciones .....	122
<b>Bibliografía .....</b>	<b>123</b>
<b>4. Transmisión de fitoplasma 16SrIII-L por <i>Scaphytopius marginelineatus</i> (Stal) Cicadellidae en yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....</b>	<b>135</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>135</b>
4.1 Introducción .....	136
4.2 Materiales y métodos .....	139

---

4.2.1	Colecta de insectos .....	139
4.2.2	Identificación de insectos .....	140
4.2.3	Cría del insecto.....	140
4.2.4	Pruebas de transmisión .....	142
4.2.5	Pruebas moleculares para detección de fitoplasma .....	142
4.2.5.1	Extracción de ADN.....	143
4.2.5.2	Detección por PCR .....	143
4.2.5.3	PCR en tiempo real.....	144
4.2.5.4	Electroforesis .....	144
4.2.5.5	Secuenciación de ADN .....	145
4.3	Resultados y discusión.....	145
4.3.1	Identificación de insectos .....	145
4.3.2	Cría de insectos.....	147
4.3.3	Pruebas de transmisión .....	149
4.3.3.1	Secuencias de fitoplasmas.....	155
4.4	Conclusiones y Recomendaciones.....	156
<b>Bibliografía .....</b>		<b>157</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1.</b> Sintomatología Cuero de Sapo .....	49
<b>Figura 2-2.</b> Aislamiento de fitoplasmas en medio líquido .....	51
<b>Figura 2-3.</b> Aislamiento de fitoplasmas en medio sólido .....	52
<b>Figura 2-4.</b> Condición de anaerobiosis para aislamiento de fitoplasmas.....	53
<b>Figura 2-5.</b> Síntomas típicos causados por fitoplasmas en vinca .....	53
<b>Figura 2-6.</b> Cultivo de fitoplasmas a partir de raíces de yuca .....	60
<b>Figura 2-7.</b> Colonias de fitoplasmas obtenidas en medio PivL.....	61
<b>Figura 2-8.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de cultivo de fitoplasmas en medio PivL sembrado con tejido de plantas de yuca con síntomas de cuero de sapo.....	62
<b>Figura 2-9.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores M1/M2 de cultivo de fitoplasmas en medio PivL sembrado con tejido de plantas de vinca con síntomas causados por fitoplasmas .....	62
<b>Figura 2-10.</b> PCR en tiempo real de muestras de medio PivL sembrado con tejido de raíz de yuca .....	63
<b>Figura 2-11.</b> Colonias de fitoplasmas crecidas en medio PivS a partir de PivL, en una atmósfera de 95% de N <sub>2</sub> y 5% de CO <sub>2</sub> , fotografías entre 40 a 100 X.....	64
<b>Figura 2-12.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de colonias individuales de fitoplasmas crecidos en medio PivS a partir de tejido de yuca con síntomas de cuero de sapo.....	67
<b>Figura 2-13.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores universales M1/M2 de colonias individuales de fitoplasmas crecidos en medio PivS a partir de tejido de vinca con síntomas de fitoplasmas .....	67

<b>Figura 2-14.</b> PCR en tiempo real con cebadores específicos para el grupo 16SrIII de colonias individuales crecidas en medio sólido PivS a partir de tejido de yuca afectada por cuero de sapo .....	68
<b>Figura 2-15.</b> Perfil electroforético RFLP en gel de poliacrilamida de productos de PCR con cebadores M1/M2 de colonias individuales de fitoplasmas.....	69
<b>Figura 2-16.</b> Fotos de fitoplasmas tomadas en microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina a partir de cultivos en medio PivS (Parte I) .....	71
<b>Figura 2-17.</b> Fotos de fitoplasmas tomadas en microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina a partir de cultivos en medio PivS (Parte II) .....	72
<b>Figura 2-18.</b> Fotos de fitoplasmas tomadas en microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina a partir de cultivos en medio PivS. (Parte III) .....	73
<b>Figura 2-19.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos (OI1 - OI2c) para <i>Candidatus Liberibacter</i> .....	75
<b>Figura 2-20.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos (CS 78 y CS 323) para <i>Rickettsia</i> .....	75
<b>Figura 2-21.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores universales (EubB 27 y EubA 1522) para Bacterias .....	76
<b>Figura 3-1.</b> Fuente de inóculo .....	94
<b>Figura 3-2.</b> Inóculo de fitoplasmas 16SrIII-L crecido en medio de cultivo PivL a partir de raíces de plantas sintomáticas .....	95
<b>Figura 3-3.</b> Inóculo de fitoplasmas 16SrIII-L crecido en medio de cultivo PivS a partir de raíces de plantas sintomáticas .....	96
<b>Figura 3-4.</b> Material vegetal para pruebas de patogenicidad.....	97
<b>Figura 3-5.</b> Material vegetal para tercera prueba de patogenicidad .....	97
<b>Figura 3-6.</b> Proceso de inoculación por injertación .....	99
<b>Figura 3-7.</b> Métodos de inoculación con fitoplasma 16SrIII-L crecido en medio de cultivo PivL.....	101
<b>Figura 3-8.</b> Inoculación con fitoplasma crecido en medio PivS, tercera prueba de patogenicidad.....	102
<b>Figura 3-9.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de cultivo de fitoplasmas 16 SrIII-L en medio PivL (Fuente de inóculo).109	109
<b>Figura 3-10.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % de productos de amplificación por PCR con cebadores específicos del grupo III (R16 III F2 – R16 III R1) de cultivo de fitoplasmas 16SrIII-L en medio PivS (Fuente de inóculo) .....	109

<b>Figura 3-11.</b> Síntomas foliares en plantas de yuca de la variedad SM909-25 inoculadas por injerto.....	111
<b>Figura 3-12.</b> Síntomas de enfermedad cuero de sapo en raíces de yuca variedad SM909-25 inoculadas por injerto.....	113
<b>Figura 3-13.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de ADN de raíces de yuca inoculadas por injerto .....	114
<b>Figura 3-14.</b> Síntomas de enfermedad cuero de sapo en raíces de yuca variedad SM909-25 inoculadas con fitoplasmas 16SrIII-L crecidos en medio PivL .....	115
<b>Figura 3-15.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de ADN de plantas de yuca inoculadas con fitoplasmas en PivL en pruebas de patogenicidad.....	116
<b>Figura 3-16.</b> Síntomas de enfermedad cuero de sapo en raíces de genotipos (CM 2952, Col 1, Col 896 y Bra 184) de yuca, inoculados con fitoplasmas 16SrIII-L crecidos en medio PivS .....	117
<b>Figura 3-17.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de ADN de plantas de yuca (Col 2952, Col 1, Col 896 y Bra 184) ..	118
<b>Figura 3-18.</b> Fotografías de fitoplasmas tomadas bajo microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina .....	121
<b>Figura 4-1.</b> <i>Scaphytopius marginelineatus</i> .....	146
<b>Figura 4-2.</b> Estados inmaduros de <i>Scaphytopius marginelineatus</i> .....	147
<b>Figura 4-3.</b> Cría del insecto <i>Scaphytopius marginelineatus</i> .....	149
<b>Figura 4-4.</b> Electroforesis En gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de muestras de ADN de <i>Scaphytopius marginelineatus</i> .....	150
<b>Figura 4-5.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de muestras de ADN de ninfas de <i>Scaphytopius marginelineatus</i> . .....	150
<b>Figura 4-6.</b> PCR en tiempo real de muestras de ADN de <i>Scaphytopius marginelineatus</i> .....	152
<b>Figura 4-7.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de muestras de ADN de plantas de yuca en prueba de transmisión con insectos.....	154

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 3-1.</b> Cebadores específicos para detección de virus asociados a cuero de sapo en yuca .....	106
<b>Tabla 3-2.</b> Detección molecular de fitoplasmas del grupo 16SrIII y cuatro diferentes virus en 80 plantas de yuca, procedentes de yemas individuales .....	107
<b>Tabla 3-3.</b> Resultados de transmisión de fitoplasma por injerto de plantas enfermas del genotipo local “Parroquiana” a plantas sanas del genotipo SM 909-25. Detección de fitoplasmas a los dos meses y cosecha.....	110
<b>Tabla 4-1.</b> Condiciones climáticas de las Estaciones Experimentales de CIAT en Palmira y Santander de Quilichao, años 2014 y 2015 .....	141



# 1. Antecedentes de investigación en cuero de sapo y generalidades sobre fitoplasmas

## 1.1 Antecedentes

La yuca *Manihot esculenta* Crantz constituye un alimento básico en la dieta de millones de personas en el mundo, además, es un cultivo industrial con alto potencial que genera ingresos permanentes para pequeños y medianos agricultores, y aporta al desarrollo social de las regiones donde se cultiva (Howeler, 2014).

Dentro de los factores limitantes del cultivo de yuca se encuentran las plagas y enfermedades, las cuales ocasionan pérdidas en su rendimiento; siendo una de gran importancia económica, la conocida como el cuero de sapo. El disturbio causa pérdidas que pueden alcanzar el 90% o más (Pineda y Lozano, 1981; Álvarez *et al.*, 2003; 2009).

Los síntomas más característicos se presentan en las raíces, las cuales se tornan leñosas, de cáscara gruesa, corchosa y quebradiza con hendiduras profundas en forma de labios, que unidas entre sí, semejan una red o panal y en estados avanzados el esclerénquima y parénquima se tornan de color café y la epidermis del tubérculo adquiere el aspecto de cuero de sapo que le da el nombre a la enfermedad (Calvert *et al.*, 2004). Las raíces pueden ser muy delgadas, mientras el tocón y los tallos muy gruesos (Chaparro y Trujillo, 2001). Otros síntomas menos sobresalientes como mosaicos, clorosis y distorsiones se observan en la parte aérea (Álvarez, *et al.*, 2009).

Por el material vegetativo usado para la siembra, la incidencia y severidad pueden alcanzar niveles epidémicos y desde hace ya más de una década su prevalencia y distribución ha incrementado hasta llegar a departamentos como: Atlántico, Bolívar, Córdoba, Sucre, Magdalena, Arauca, Amazonas, Casanare, Meta, Vaupés, Quindío, Tolima, Huila, Cauca y Valle del Cauca, lo que hace sospechar, además, de un posible vector. También se ha reportado en Brasil, Costa Rica, Panamá, Perú y Venezuela (Calvert y Cuervo, 2002;

Cuervo *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2006). Y reportes recientes confirman su incidencia en Brasil (Oliveira *et al.*, 2014; De Souza *et al.*, 2014) y Paraguay (Cardozo *et al.*, 2016). Además, se han registrado síntomas de la enfermedad en cultivos de yuca en China y Tailandia (Comunicación personal, Álvarez, 2016).

Los grupos de investigación en Patología de Yuca y La Unidad de Virología Vegetal del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), han venido trabajando durante más de 40 años en el esclarecimiento del agente causante de la enfermedad cuero de sapo en yuca, y los resultados de sus estudios indican la asociación de varios virus y un fitoplasma al disturbio mencionado. A continuación, se presenta una breve reseña del estado del arte de la investigación y la ciencia en diferentes tópicos relacionados y que fueron elementos relevantes para el desarrollo de la presente tesis.

En primera instancia, los fitoplasmas (anteriormente llamados MLO`s) están citados como agentes causantes de enfermedades en más de 600 especies de plantas, algunas de ellas de gran importancia económica (McCoy *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 2015). Además, desde 1967 se detectaron por primera vez, en tubos cribosos del floema de plantas de petunia afectadas con el amarillamiento del aster (Doi *et al.*, 1967). Los mismos autores reportaron que la remisión de síntomas ocurría sólo frente a tratamientos con oxitetraciclina y no con penicilina (Ishii *et al.*, 1967), encontrando procariontes pleomórficos sin pared, asociados al floema de plantas afectadas por amarillamiento.

Estos resultados dieron paso a un reordenamiento en la etiología de algunas enfermedades categorizadas como amarillamientos, que hasta ese momento se consideraban producidas por virus, pero que en realidad eran causadas por fitoplasmas (McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1994; Maramorosh, 2011). Adicionalmente, la aplicación de tecnologías moleculares resolvió el estatus enigmático de estos procariontes y los ubicó en un grupo denominado Fitoplasmas y posteriormente en una nueva taxa denominada "*Candidatus Phytoplasma*" (IRPCM, 2004).

En otros casos, la etiología fitoplasmática no reemplaza la viral, sino que la complementa, es decir se ha determinado también, que virus y fitoplasmas pueden encontrarse de manera simultánea afectando una misma especie vegetal y en cuyo caso la patología se

convierte en un complejo, como por ejemplo, lo que ocurre en maíz: *Maize Bushy Stunt* (Achaparramiento colorado de maíz, fitoplasma), *Corn Stunt Spiroplasma* (Achaparramiento del maíz, *Spiroplasma kunkelii*) y varios virus, de los cuales es importante destacar Maize rayado fino Marafivirus (Virus del Rayado fino del maíz), puesto que los tres patógenos son transmitidos por *Dalbulus maidis* (De long y Wolcott) (Cicadellidae) (Varón y Sarria, 2007; Conci, 2009). Un ejemplo adicional lo representa el síndrome de la hoja amarilla en caña de azúcar, el cual está asociado a un Luteovirus, un fitoplasma 16SrIII en África (Arocha y Jones, 2008), y un fitoplasma del grupo 16SrXII en India (Gaur *et al.*, 2008), los cuales ocurren naturalmente y causan efectos deletéreos sinérgicos sobre la planta afectada.

El caso de la enfermedad de cuero de sapo es similar, ésta fue descrita por primera vez, en 1971, en el Departamento del Cauca. En la región amazónica de Colombia y Brasil se le conoce como “lagarto” o “jacaré” debido a la sintomatología observada en las raíces, por cuanto presentan similitud a la piel del lagarto. En la costa norte de Colombia se reportó una enfermedad llamada “mosaico caribeño” por los síntomas en las hojas. Investigaciones posteriores sugirieron que “jacaré”, “lagarto” y “mosaico caribeño” son el mismo “cuero de sapo” (Calvert *et al.*, 2001), sospechándose en todo momento de una etiología de tipo viral (CIAT, 1982; Pineda *et al.*, 1983).

Algunos estudios realizados en la década de los 80’s, indicaron la presencia de varios virus que afectan la yuca en la región endémica al “cuero de sapo”, uno de ellos, denominado virus “X”, el cual se registró como asintomático en un amplio rango de clones y otro que produce mosaico severo, distorsión de hojas y síntomas moderados de “cuero de sapo” (CIAT, 1984; Harrison y Lennon, 1986).

Luego, investigaciones tendientes a determinar la presencia de vectores de la enfermedad mostraron que porcentajes muy bajos de la población de moscas blancas (< 5%) transmiten el denominado “agente mosaico”, el cual fue transmitido por *Bemisia tuberculata* y, un segundo patógeno, asintomático (denominado CsXV, Potexvirus) por *Aleurotrachelus sociales* (Ángel *et al.*, 1987). Los autores manifestaron que el papel de los dos virus en la etiología del “cuero de sapo” debía continuar en estudio, puesto que no se recuperaron síntomas en raíces.

De otra parte, los efectos epidemiológicos del vector encontrado (*B. tuberculata*) asociado al agente mosaico, con respecto a la diseminación de la enfermedad, no son severos, puesto que no es la especie más común en las plantaciones de yuca. Por tanto, concluyen Calvert *et al.* (2001), el control de este vector no es efectivo para controlar la enfermedad.

En una revisión hecha por Calvert y Cuervo (2002), referente a enfermedades virales en yuca, plantean que solamente tres tienen importancia económica. El primero es el Mosaico común de la yuca (CsMCV), clasificado como un Potexvirus (Costa y Kitajima, 1972). El segundo es el virus del mosaico de las nervaduras (CVMV), el cual se clasificó como un Pararetrovirus (Calvert *et al.*, 1995), los cuales tienen mayor incidencia en Brasil. Finalmente, afirman que la enfermedad de cuero de sapo es una de las más serias en el cultivo de yuca, puesto que afecta directamente la producción de raíces.

En cuanto a la enfermedad cuero de sapo, estudios realizados por la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), demostraron la presencia de partículas isométricas similares a virus de 70 nm de diámetro en tejidos foliares, peciolo, tallos y raíces y la existencia de un ARN de doble cadena de origen viral en tejidos de yuca afectados por cuero de sapo (Cuervo, 1989; Calvert *et al.*, 2004). Así mismo, las técnicas moleculares de RTPCR, hibridación y clonación de ADNc, permitieron postular un virus de la familia Reoviridae asociado a plantas de yuca afectadas por cuero de sapo (Calvert *et al.*, 2004; Calvert *et al.*, 2008).

Carvajal *et al.* (2014) registraron la presencia de cinco tipos de virus diferentes asociados a las plantas de yuca con síntomas de cuero de sapo en Colombia, estos son: Cassava frogskin associated virus (Reoviridae), Cassava New Alphaflexivirus (CsNAV) Potexvirus, Cassava Polero like virus (CsPLV) Luteovirus y dos variantes de Cassava Torrado like virus (CsTLV) Torradovirus Segmentos RNA1 y RNA2. Los autores manifiestan que se presentan en diferentes combinaciones y con diferentes sintomatologías, dependiendo de dichas interacciones.

De otra parte, a pesar de que la información generada durante 30 años en el CIAT (1971 – 2002), apuntaba únicamente a una posible etiología viral de la enfermedad cuero de sapo, para el año 2003, Álvarez y colaboradores haciendo uso de la técnica de PCR

anidado, detectaron fitoplasmas en tejidos de plantas de yuca de variedades comerciales y con síntomas de cuero de sapo.

Adicionalmente, el grupo de patología de yuca en CIAT, mediante pruebas moleculares determinaron la presencia de fitoplasmas del grupo 16 SrIII en plantas de yuca y vinca (*Catharanthus roseus* L. G. Don) luego de haberlas inoculado usando cuscuta a partir de una planta de yuca enferma por cuero de sapo. Lograron también, la transmisión de los fitoplasmas a plantas sanas mediante injerto de tejidos afectados; remisión de síntomas en plantas de yuca con aplicación de tetraciclina y detectaron con el mismo método fitoplasmas en el Cicadellidae *Scaphytopius marginelineatus* (CIAT, 2003; 2005), lo cual resultó de gran interés para pruebas de transmisión, ya que los insectos pertenece a una familia que se ha determinado como principal vectora de fitoplasmas a nivel mundial (Maramorosch y Harris, 1980).

Posteriormente, aplicando la técnica de RFLP y análisis de secuencia del ADNr amplificado, se determinó que el fitoplasma asociado a yuca, corresponde al grupo 16SrIII. Además, pruebas de PCR con cebadores específicos para este grupo y para el gen rARN (proteína ribosomal rp), indicaron que difiere de todos los fitoplasmas descritos anteriormente dentro del grupo 16SrIII. Sobre esta base se clasificó tentativamente en un nuevo subgrupo denominado 16SrIIIL y rplII-H respectivamente (Álvarez *et al.*, 2009).

En búsqueda de posibles microorganismos vectores presentes en suelo, se desarrollaron experimentos con suelo procedente de lotes donde la enfermedad fue registrada epidémicamente. Se montaron ensayos en invernadero con la variedad M Tai 8, la cual es altamente susceptible. Los resultados permitieron descartar la posible influencia del suelo como fuente de inóculo o potenciales vectores (CIAT, 2003). En el mismo año, se probaron aislamientos patogénicos de *Agrobacterium tumefaciens*, que inoculados en yuca no permitieron reproducción de síntomas de cuero de sapo.

Los anteriores resultados mostraron una nueva posibilidad de explicar la naturaleza etiológica del cuero de sapo y surgieron opciones diferentes de investigación con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la enfermedad y su causa. Todos los aportes

hechos por el grupo de patología de yuca, revelaron evidencia de un fitoplasma asociado a plantas enfermas y la necesidad de comprobar su efecto sobre la planta.

En 2013, Pardo, diseñó sondas TaqMan® y cebadores, a partir del gen *rp* para la detección del fitoplasma (16SrIII-L) y ARN 4 para el reovirus CFSV. Para la detección simultánea de los dos microorganismos asociados a la enfermedad cuero de sapo en yuca. La técnica de qPCR desarrollada, presentó una sensibilidad en la detección de 100 y 1000 veces en comparación con RT-PCR y PCR anidado respectivamente; mostrando para la detección de fitoplasma una excelente correlación entre la presencia de síntomas en raíces enfermas y el porcentaje de detección (92.5%), mientras que el virus presentó un porcentaje de 76.47%.

Finalmente, pocos son los casos de aislamientos exitosos de fitoplasmas en medios de cultivo, destacándose los resultados obtenidos por Skripal *et al.*, (1984) y (Poghosyan y Lebsky, 2004), los cuales tuvieron éxito haciendo uso del medio de cultivo CMIMB-72, que infortunadamente no se produce comercialmente. Pero, los novedosos resultados aportados por Contaldo *et al.* (2012), quienes lograron crecer fitoplasmas de diferentes grupos en un medio de cultivo artificial (patentado), provee herramientas adicionales para el estudio de estos microorganismos y poder confirmar si son los causantes de la enfermedad a través de los postulados de Koch.

En este documento de investigación, el lector podrá encontrar a través de tres capítulos el aislamiento, pruebas de patogenicidad y transmisión por un vector del fitoplasma 16SrIII de yuca, en la cual se demostró biológica y genéticamente que es la causa de la enfermedad de cuero de sapo, manifestando síntomas en infección individual.

## 1.2 Generalidades sobre fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular, que vistos al microscopio electrónico aparecen como cuerpos pleomórficos y poseen genoma reducido. Pertenecen a la Clase Mollicutes y causan enfermedades conocidas como “amarillamientos” en numerosas especies de plantas en todo el mundo (McCoy *et al.*, 1989; Bertaccini, 2007; Weintraub y Jones, 2010).

Los fitoplasmas están rodeados por una membrana trilaminar, de unos 10 nm de grosor, compuesta de proteínas y lípidos. Esta característica los convierte en organismos difíciles de aislar debido a que las variaciones en la presión osmótica o en el pH del medio ocasionan en la mayoría de los casos lisis celular. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis proteica, y una molécula de ADN doble cadena circular, habiéndose detectado también la presencia de ADN extracromosómico (Nakashima y Hayashi, 1995; Nishigawa *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2012).

Es un grupo de patógenos de origen monofilético que presenta gran diversidad (Lee *et al.*, 1998). Seemüller *et al.* (1998) recopilaron información de un total de 75 fitoplasmas, estableciendo al menos 20 grupos 16Sr y numerosos subgrupos dentro de cada uno. En la actualidad se reconocen aún mayor cantidad de fitoplasmas, clasificados mediante el análisis del gen 16Sr ARN, genes de proteínas ribosomales (rp) y factores de elongación TUF (gen EF-Tu) (Gundersen *et al.*, 1994; Jomantiene *et al.*, 1998; Marcone *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2007; Duduk y Bertaccini, 2011).

### 1.3 Sintomatología

Los fitoplasmas causan una serie de síntomas, dependiendo del momento de infección, tipo de fitoplasma y genotipo del huésped. Los más frecuentes son amarillamiento o clorosis, enrojecimiento de las hojas, esterilidad de las flores, virescencia (pétalos adoptan un color verde), filodia (transformación de los órganos florales en estructuras foliares), y esterilidad de flores. Otros síntomas que predominan son las escobas de bruja, originadas por la proliferación anormal de yemas adventicias, arrosamiento, debido al acortamiento de entrenudos, malformación de tallos, enanismo generalizado, enrollamientos de las hojas y decaimiento general de la planta (Lee *et al.*, 2000).

Los fitoplasmas se localizan en las células del floema donde pueden causar deposición de calosa (polisacárido) en las placas cribosas, decoloración y colapso de los elementos cribosos y células acompañantes, producción de abundantes elementos cribosos de menor tamaño por hiperactividad cambial, y decoloración de laticíferos (Siddique *et al.*, 1998).

## 1.4 Transmisión de fitoplasmas

Los mecanismos conocidos son: (a) propagación vegetativa de material de plantas ya infectadas, (b) conexión vascular producida entre plantas infectadas y no infectadas y usando injertos o plantas parasíticas tales como *Cuscuta* spp., y (c) insectos vectores infectados que se alimentan de plantas sanas de la misma o diferente especie (Weintraub y Beanland, 2006). Adicionalmente, la transmisión por semilla ha ganado gran interés en la última década.

## 1.5 Transmisión por semilla

Hasta el momento se han demostrado pocos casos de transmisión por semilla, debido posiblemente a la pobre conexión del embrión con la madre (Calari *et al.*, 2011). Además se sabe que las estructuras florales son las más colonizadas por fitoplasmas en muchas especies de plantas, las cuales no producen semilla o se reducen significativamente (De la Rue *et al.*, 2002). Sin embargo, infecciones tardías que permiten la formación de semilla en plantas afectadas, incrementan la posibilidad de transmisión por esta vía (Olivier y Galka, 2008). Así, después del primer reporte de fitoplasmas 16SrII en plántulas de alfalfa (Khan *et al.*, 2002), y en plántulas de arveja (Zwolinska *et al.*, 2010), se publicaron también resultados de transmisión por semilla en palma de coco (Cordova *et al.*, 2003), palma de coco y maíz (Nipah *et al.*, 2007) y en tomate y maíz (Calari *et al.*, 2011).

## 1.6 Transmisión por insectos

En la naturaleza, los fitoplasmas se transmiten mayormente a través de insectos vectores pertenecientes al orden hemiptera (auquenorrincos y esternorrincos), en la forma persistente (Purcell, 1982).

El orden Hemiptera posee varias características por las cuales sus miembros son eficientes vectores de fitoplasmas: (a) son hemimetábolos: tanto estados inmaduros como adultos exhiben similares conductas alimentarias, a menudo ambos estados transmiten fitoplasmas, (b) se alimentan selectivamente de ciertos tejidos vegetales, lo cual hace que sean eficientes vectores de patógenos residentes en estos tejidos, (c) su alimentación no es destructiva, promoviendo una eficiente transmisión de patógenos sin dañar los tejidos

conductivos ni provocar respuestas defensivas en el huésped, (d) tienen una relación persistente y propagativa con los fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2006).

Los hemípteros comprenden un grupo de insectos que presentan un distintivo aparato bucal picador - chupador, que les ha conferido un relevante efecto en su extensa radiación adaptativa (Goodchild, 1966). Dentro de ellos, hay especies que por sus altas tasas reproductivas y su capacidad para transmitir patógenos constituyen plagas reconocidas en todo el mundo (Catalano, 2011).

La familia más importante es Cicadellidae Latreille, 1825, la cual comprende a los insectos fitófagos comúnmente conocidos como “chicharritas” o saltahojas (leafhoppers). Esta familia contiene aproximadamente 22.000 especies distribuidas en todo el mundo (McKamey, 2002), constituyendo la familia más numerosa del orden Hemiptera, y una de las 10 familias más diversas de insectos (Hamilton, 1984). El número de subfamilias reconocidas es variable de acuerdo a los diferentes autores, pero una de las más utilizadas es la clasificación de Oman *et al.* (1990), la cual propone 40 subfamilias y 119 tribus.

La importancia fitosanitaria de la familia Cicadellidae radica en la cantidad de especies asociadas a disturbios de distinta etiología. Son severos los efectos que provocan durante la alimentación particularmente por la toxicidad de la saliva, y por su intervención en la transmisión, dispersión y reservorio de patógenos como virus, espiroplasmas, bacterias y principalmente fitoplasmas. Afectan especialmente gramíneas y otras plantas cultivadas y silvestres (Nault y Ammar, 1989), estimándose que el 70 % de los insectos vectores de enfermedades a las plantas pertenecen a esta familia (Nielson, 1979), y que más de 70 especies son conocidas como vectores de fitoplasmas en diferentes especies vegetales (Weintraub y Beanland, 2006).

Las especies de cicadélidos capaces de transmitir fitoplasmas se alimentan del floema (Wilson y Weintraub, 2007). Al presente, más del 75% de las especies confirmadas como vectores de fitoplasmas pertenecen a la subfamilia Deltocephalinae. Sin embargo, otras subfamilias tienen proporciones similares de especies que se alimentan de floema o que se han identificado como vectores de fitoplasmas.

De las especies de cicadélidos presentes en Colombia, hasta el presente se ha demostrado la capacidad vectora de fitoplasmas de *Dalbulus maidis*, una especie encontrada en áreas maiceras (Varón y Sarria, 2007) es capaz de transmitir el *Maize Bushy Stunt phytoplasma* (Ebbert *et al.*, 2001). Y *Scaphytopius fuliginosus* transmitiendo el fitoplasma causante del amachamiento de la soya (Granada, 1979). Además, *Scaphytopius marginelineatus* fue también reportado por investigadores de patología de yuca en CIAT como portador de fitoplasmas asociados a cuero de sapo en yuca (CIAT, 2003; 2005).

## 1.7 Características genómicas de los fitoplasmas

Al igual que los demás Mollicutes, los fitoplasmas poseen un genoma pequeño, mostrando una considerable variabilidad en el tamaño de los mismos, en un rango entre 530 y 1350 kb. El contenido promedio de guanina y citosina (G + C) en los genomas fue calculado entre 23 y 29 % (Oshima *et al.*, 2004; Kube *et al.*, 2012).

En 2004 se publicó la primera secuencia completa del fitoplasma *Candidatus Phytoplasma asteris*, OY. Este presenta 754 marcos abiertos de lectura (genes u ORF's), de los cuales el 66% tiene una homología muy significativa con otras secuencias ya publicadas. Este conocimiento permite establecer claramente las relaciones con el huésped y con otras bacterias, los mecanismos de patogenicidad y virulencia, fundamentales para el desarrollo de estrategias que apunten al control de la enfermedad (Oshima *et al.*, 2004).

Se ha determinado que los fitoplasmas carecen de genes considerados esenciales para la vida de otros organismos, como aquellos relacionados con biosíntesis de amino ácidos y ácidos grasos, esto sugirió una evolución reductiva como consecuencia de la vida de parásito intracelular en un ambiente rico en nutrientes (Oshima *et al.*, 2004; Kube *et al.*, 2012).

La secuenciación de fitoplasmas ha contribuido al conocimiento de la biología de estos microorganismos. Dos fitoplasmas secuenciados, el OY-M (onion yellows, cepa M) y el AY-WB (Aster yellows, cepa witches – broom), están relacionados a "*Ca. Phytoplasma asteris*" (Bai *et al.*, 2006). Aunque las dos cepas están estrechamente relacionadas, se han observado importantes diferencias entre ambas. Las secuencias de los fitoplasmas

“*Ca. Phytoplasma australiense*” (Subgrupo tuf-Australia I; rp-A) y “*Ca. Phytoplasma mali*” cepa AT, han revelado diferencias aún mayores (Kube *et al.*, 2008; 2012; Tran-Nguyen *et al.*, 2008). Los estudios de estos cuatro genomas han demostrado la gran variabilidad que existe entre las distintas especies de “*Ca. Phytoplasma*”. A pesar del reducido tamaño del genoma de estos organismos, se registraron genes presentes en múltiples copias en los distintos genomas (Bai *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2008).

De otra parte, la presencia o ausencia de PMU (Putative mobile units) en las secuencias repetidas de estos cuatro organismos, demuestra que el genoma de los fitoplasmas está aún bajo proceso de reducción (Kube *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2012). Así mismo, la evolución reductiva del genoma de los fitoplasmas provocó la pérdida de genes involucrados en importantes vías metabólicas (Christensen *et al.*, 2005).

## **1.8 Detección, taxonomía y filogenia de fitoplasmas**

Hasta finales de los 80's las enfermedades causadas por fitoplasmas eran identificadas por la sintomatología producida y junto a estudios sobre especificidad de algunos vectores, se emplearon para intentar caracterizar grupos. Este sistema además de laborioso, resultaba en determinaciones confusas debido a que en muchos casos, un fitoplasma en particular puede estar asociado con más de una sintomatología en diferentes especies vegetales; o una misma enfermedad puede estar asociada, en diferentes regiones geográficas, con distintos fitoplasmas (Gundersen *et al.*, 1996).

Si bien la remisión de síntomas por tratamientos con oxitetraciclinas y la observación del patógeno al microscopio electrónico pueden utilizarse para detectar los fitoplasmas en planta, carecen de eficiencia y especificidad cuando se desean realizar diagnósticos masivos de la enfermedad. Los sistemas de detección por serología resultan muy útiles en la primera etapa, debido a la presencia de una serie de determinantes antigénicos comunes, pero además de la dificultad en su producción, carecen de especificidad para identificar a un fitoplasma en particular (Fos *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1996), salvo que se empleen anticuerpos monoclonales (Lee *et al.*, 1993).

Métodos alternativos como la hibridación con sondas de ADN, o la amplificación por PCR de regiones variables del genoma tienen mayor especificidad. Para las reacciones de PCR se han diseñado oligonucleótidos iniciadores universales a partir de regiones conservadas del genoma (ARNr 16S), de este modo se hace posible detectar la presencia de fitoplasmas de cualquier grupo. Una identificación aún más específica puede realizarse por análisis de RFLP de los fragmentos amplificados según el esquema de clasificación de fitoplasmas (Lee *et al.*, 1998) o bien con el uso de algunos primers específicos. También se han analizado algunos genes de proteínas ribosomales (rps3, rps19 y rp/22). Estos menos conservados que el gen ARNr 16S (Marcone *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2004). Asimismo, el gen del factor de elongación Tu (tuf) fue secuenciado evaluando su utilidad para distinguir y clasificar fitoplasmas.

La PCR en tiempo real (Q-PCR) ha reemplazado la PCR tradicional en un esfuerzo por incrementar la velocidad y sensibilidad de detección y para mejorar las técnicas de revisión masiva de muestras. Los reactivos para Q-PCR son de fácil consecución y ofrecen especificidad, sensibilidad y detección cuantitativa. Durante una corrida de Q-PCR, los amplicones que se generan son monitoreados en cada ciclo por métodos de detección por fluorescencia, y así no hay necesidad de manipulación posterior al PCR, como procesos de electroforesis, los cuales sí se requieren al final de una PCR tradicional. La cantidad de fluorescencia en cada ciclo de amplificación monitoreado, es proporcional al logaritmo de la concentración objeto de la PCR, y por esta razón Q-PCR es además una poderosa técnica para cuantificación de ADN específico. Los amplicones de Q-PCR son visualizados en pantalla a través de técnicas de rotulación, la mayoría de las cuales ligan específicamente a través de sondas la secuencia blanco en el amplicon (Galetto y Marzachi, 2010).

Las sondas TaqMan son las más comúnmente usadas para el diagnóstico de fitoplasmas, aunque otras herramientas de detección de secuencias específicas están disponibles (Monis y Giglio, 2006), las cuales, en teoría, pueden ser adaptadas para detectar estos fitopatógenos. La sonda TaqMan está marcada en el extremo 5' con un fluorocromo y el extremo 3' con una molécula blanqueadora; durante cada ciclo de PCR en presencia de un ADN específico blanco, la sonda TaqMan, ligada a su secuencia blanco, es degradada por la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa cuando extiende el cebador. La

fluorescencia de la sonda es liberada desde la porción marcada y es detectada por el sistema óptico del aparato (Galetto y Marzachi, 2010).

El gen mejor caracterizado hasta el momento en la mayoría de los fitoplasmas es el ARNr 16S, cuya secuencia presenta una similitud desde 88% hasta 99% o más entre fitoplasmas, mientras que es entre 87% y 88,5% con especies de *Acholeplasma* (Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Bertaccini, 2007; Duduk y Bertaccini, 2011). El genoma de los fitoplasmas posee dos copias de operones para el ARN ribosomal. La organización de estos genes es conservada en ambos operones y se presentan en el mismo orden que en otras bacterias: 5´- ARNr 16S/ARNr 23S/ ARNr 5S – 3´. Esta región del genoma, sometida a elevada presión de selección, sirve como “reloj molecular” donde su análisis puede proveer importantes datos acerca de las relaciones existentes de los fitoplasmas entre sí y también con otros procariontes. De todos modos, el análisis por RFLP si bien posibilita detectar y simultáneamente caracterizar a un fitoplasma, no permite determinar una unidad taxonómica, debido a que más de un fitoplasma puede compartir el mismo patrón de restricción (Ahrens y Seemüller, 1992; Gundersen *et al.*, 1994; 1996).

El tamaño reducido del genoma y la simplicidad de la morfología de los Mollicutes llevó a pensar que eran organismos primitivos que precedieron evolutivamente a las bacterias. Estudios realizados por comparación del gen ARNr 16S entre varios Mollicutes y otros procariontes con pared celular, indicaron que los Mollicutes provienen de un ancestro Gram positivo del tipo *Clostridium*, y los Mollicutes constituyen una clase dentro del Dominio Bacteria. Estos se distinguen fenotípicamente de las bacterias Gram positivas principalmente por su tamaño reducido y por la ausencia de pared celular. Los fitoplasmas comparten las principales características de los Mollicutes, la secuenciación de los genes ARNr 16S dio evidencia para establecer que estos procariontes sin pared celular que colonizan insectos y floema de plantas constituyen un grupo monofilético dentro de la clase Mollicutes, separado de los espiroplasmas y micoplasmas. Por lo tanto, se propuso adoptar el nombre de Fitoplasmas para identificarlos (Gundersen *et al.*, 1994).

Posteriormente, se establecieron esquemas de clasificación, que fueron enriquecidos por los aportes de la detección y descripción de nuevos fitoplasmas (Schneider *et al.*, 1993;

Gundersen, 1994; Seemüller *et al.*, 1998). Como resultado de esta clasificación, se definieron grupos y subgrupos basados en RFLP del ADNr 16S (Seemüller *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). Y también analizado genes de proteínas ribosomales (Marcone *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2004).

La filogenia basada en la secuencia del gen 16S ADN r divide los fitoplasmas en tres grupos (Hogenhout *et al.*, 2008). El primer grupo (Cluster I) contiene los fitoplasmas Aster yellows (AY) 16SrI y el stolbur (STOL) 16SrXII. Estos grupos han divergido pero están estrechamente relacionados en comparación con otros grupos de fitoplasmas (Hogenhout *et al.*, 2008). El Segundo grupo (Cluster II) contiene los fitoplasmas apple proliferation (AP) 16SrX, y el tercer grupo (Cluster III) contiene el más grande número de fitoplasmas, incluyendo Western X (WX, 16SrIII), Palm Lethal Yellowing (LY, 16SrIV) y Elm Yellows (EY, 16SrV) (Hogenhout *et al.*, 2008).

Los subgrupos están definidos por fitoplasmas que presentan uno o más patrones de RFLP diferentes a los otros miembros del mismo grupo y sus relaciones confirmadas por el agrupamiento a partir del análisis filogenético de las secuencias (Seemüller *et al.*, 1998).

Finalmente, el grupo de los fitoplasmas debe ser considerado a nivel de género (*Phytoplasma*) y, cada grupo representar por lo menos una especie potencial. Además se debe tener en cuenta que la clasificación de fitoplasmas corresponde aplicar la categoría provisional de “*Candidatus*” (IRPCM, 2004).

## Bibliografía

- Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Álvarez, E., Mejía, J. F., Loke, J. B., Hernández, L., and Llano, G. A. 2003. Detecting the phytoplasma-frogskin disease association in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia. (Abstr.) *Phytopathology*, 93:S4 (Also presented as a poster at the APS annual meeting, held in Charlotte, 9 - 13 aug. 2003. USA.
- Álvarez, E., Mejía, J.F, Loke, J.and Llano, G. 2006. Detection and characterization of a phytoplasma associated with cassava frogskin disease. *Fitopatología Colombiana*, 24, No 2.
- Álvarez, E., Mejía, J., Llano, G., Loke, J., Calari, A., Duduk, B. and Bertaccini, A. 2009. Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease*, 93: 1139 - 1145.
- Ángel, J.; Nolt, B. y Pineda, B.1987. Estudios sobre la transmisión por moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) de virus asociados con el cuero de sapo en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Acta Agronómica*, Vol. 37 (4): 27 – 39.
- Arocha, Y. and Jones, P. 2008. Phytoplasmas affecting sugarcane and papaya in Cuba. In: Harrison, N., Rao, G.P. and Marcone, C. (eds) *Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas*. Studium Press LLC. Texas, pp. 249–273.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S., Radek, A., Shevchenko, D., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. and Hogenhout, S. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.

34 Aislamiento, patogenicidad y transmisión con *Scaphytopius marginelineatus* (Stal) de un fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca

---

- Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673–689.
- Calari, A.; Paltrinieri, S.; Contaldo, N.; Sakalieva, D.; Mori, N.; Duduk, B. and Bertaccini, A. 2011. Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. *Bulletin of Insectology*, 64: S157-S158.
- Calvert, L., Ospina, M. and Shepherd, R. 1995. Characterization of cassava vein mosaic virus; a distinct plant pararetrovirus. *Journal of General Virology*. 76(5): 1271-1278.
- Calvert, L., Cuervo, M. y Pineda, B. 2001. Cuero de Sapo, una enfermedad que ataca la yuca. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Plegable informativo.
- Calvert, L. y Cuervo, M. 2002. Enfermedades virales de la yuca en América del Sur. En: *La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. B. Ospina y H. Ceballos (ed.). 262-268 p.
- Calvert, L. A., Cuervo, M., Lozano, J., Villareal, N., and Arroyave, J. 2004. Identification of a reovirus-like virus infecting *Manihot esculenta* and associated with cassava frog-skin disease. Sixth Int. Sci. Meet. Cassava Biotechnol. Network. PS4:68.
- Calvert, L. A., Cuervo, M., Lozano, J., Villareal, N., and Arroyave, J. 2008. Identification of three strains of a virus associated with cassava plants affected by frog-skin disease. *Journal of Phytopathology*, 156, 647 – 653 p.
- Cardozo, L., Pardo, J., Zacher, M., Torres, A. and Álvarez, E. First Report of a 16SrIII Phytoplasma Associated with Frog-skin Disease in Cassava (*Manihot esculenta*) in Paraguay. *American Phytopathological Society*. July 2016, Volume 100, Number 7, Page 1492. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1102-PDN>.

- Carvajal, M., Olaya, C., Lozano, I., Cuervo, M., Castaño, M. y Cuellar, W. 2014. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research*. 186, 76–86.
- Catalano, M. 2011. Cicadélidos vectores de fitoplasmas a cultivos de importancia económica en la Argentina, Sistemática y bioecología (Insecta- Auchenorrhyncha- Cicadellidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Argentina. 134 p.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 1982. Annual report, Cassava Program. p. 6-8.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 1984. Cassava pathology. Internal program review (1983).Annual report Cassava Program.Cali. p. 5 -6.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 2003. Integrated pest and disease management in major agroecosystems. Annual report (of) Proje PE-1. Cali (Colombia). p. 110, 141.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 2005. Crop and agrosystem health management.Annual report (of) Proje PE -1. Cali (Colombia). p. 51- 53.
- Chaparro, E., and Trujillo, G. 2001. First report of frog skin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela.*Plant Disease*, 85:1285.
- Conci, L. 2009. Mollicutes fitopatógenos. En: Cuarto curso internacional sobre caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) eInstituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Córdoba, Argentina.

- Christensen, N., Axelsen, K., Nicolaisen, M. and Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10 (11): 526 – 535.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H. and Windsor, G. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Università di Bologna. Firenze University Press. Phytopathologia Mediterranea*, 51, 3: 607 -617 p.
- Cordova, I.; Jones, P.; Harrison, N.A.; Oropeza, C. 2003. In situ detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*, 4: 99-108.
- Costa, A. and Kitajima, E. 1972. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brasil. In: *Cassava mosaic workshop. International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan, Nigeria.* p. 18-36.
- Cuervo, M. 1989. Caracterización de los ácidos ribonucleicos de doble cadena (ARN cd) asociados a enfermedades virales en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 96 p.
- Davis, R., Dally, E., Zhao, Y., Lee, I. Wei, W., Wolf, T., Beanland, L., LeDoux, D., Johnson, D., Fiola, J., Peterson, H., Dami, I. and Chien, M. 2015. Unraveling the Etiology of North American Grapevine Yellowing (NAGY): Novel NAGY Phytoplasma Sequences Related to 'Candidatus Phytoplasma pruni'. *Plant Disease*. 99 (8): 1087-1097.
- De La Rue, S. J.; Hopkinson, R.; Gibb, K. S. 2002. Assessment of *Stylosanthes* seed yield reduction caused by phytoplasma associated diseases.- *Australian journal of experimental agriculture*, 42(8): 1053-1056.
- De Souza, A., Da Silva, F., Bedendo, I., and Carvalho, C. 2014. A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. *Plant Disease*. 98 (6): 771-779.

- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches´broom, aster yellows or paulownia witches´broom. Annual Phytopathology Society.Japan, 33: 259 – 266.
- Duduk, B. and Bertaccini, A. 2011. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough?. Phytotop. Mollicutes. 1(1): 3-13
- Ebbert, M., Jeffers, D., Harrison, H. and Nault, L. 2001. Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. Entomologia Experimentalis et Applicata, 101: 49-57.
- Fos, A., Danet, J., Zreik, L., Garnier, M., and Bove, J. 1992. Use of monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma like organism in plants and insects and to identify a vector in frence. Plant disease, 76: 1092 – 1096.
- Galetto, L. and Marzachi, C. 2010. Real-time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas. In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors (eds. P.G. Weintraub and P. Jones). CAB International, 2-19 p.
- Gaur, R.K., Raizada, R. and Rao, G.P. 2008. Sugarcane yellow leaf phytoplasma associated for the first time with sugarcane yellow leaf syndrome in India. Plant Pathology. 57, 772.
- Gómez, G., Conci, L., Ducasse, D. and Nome, S. 1996. Purification of the phytoplasma associated with China-tree (*Melia azedarach* L.) decline and the production of a polyclonal antiserum for its detection. Journal of Phytopathology, 144: 473-477.
- Goodchild, A. 1966. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. Biological Reviews, 41: 97-140.
- Granada, G. A. 1979. Machismo disease of soybeans: I. Symptomatology and transmission. Plant Disease Reporter, 63(1): 47-50.

Gundersen, D., Lee, I., Rehner, S., Davis, R. and Kingsbury, D. 1994. Phylogeny of mycoplasma like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176: 5244-5254.

Gundersen D., Lee I., Schaff, D., Harrison, N., Chang, C., Davis, R. and Kingsbury, D. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows) and III (X-disease). *International Journal Systematic Bacteriology*, 46: 64-75.

Hamilton, K. 1984. The tenth largest family? In: *Tymbal Auchenorrhyncha Newsletter*, No. 3: 4-5.

Harrison, B. and Lennon, A. 1986. Properties of four previously uncharacterized cassava viruses. *Scottish Crop Research Institute*. 8p.

Hogenhout, S., Oshima, K., Ammar, E., Kakizawa, S., Kingdom, H. and Namba, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9: 403–423.

Howeler, R. 2014. Sustainable soil and crop management of cassava in Asia. For the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) and the Nippon Foundation in Tokyo, Japan. (CIAT Publication No. 389). ISBN 978-958-694-125-9. 280 p.

IRPCM. 2004. "*Candidatus* Phytoplasma", a taxon for wall - less, non - helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243 – 1255.

Ishii, T., Doi, Y., Yora, K. And Asuyama, H. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Annual Phytopathology Society Japan*, 33: 267 – 275.

- Jomantiene R., Davis, R., Maas, J. and Dally, E. 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269-277.
- Khan, A. J.; Botti, S.; Paltrinieri, S.; Al-Subhia, M. and Bertaccini, A. 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds?. *Book of Abstracts of the 14<sup>th</sup> International Congress of the IOM, Vienna, 07-12 July*: 6.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdo, A., Reinhardt, R. and Seemüller, E. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics*. 9, 306.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R. and Seemüller, E. 2012. Current View on *Phytoplasma* Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 185942, 25 pages doi:10.1100/2012/185942.
- Lee, I., Hammond, R. and Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- Lee, I., Gundersen, D., Hammond, R. and Davis, R. 1994. Use of mycoplasma like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559 – 566.
- Lee, I., Gundersen, D., Davis, R. and Bartoszyk, E. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 1153-1169.
- Lee, I., Davis, R. and Gundersen, D. 2000. *Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.

- Lee, I., Martini, M., Marcone, C. and Zhu, S. 2004. Classification of phytoplasmastrains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of '*Candidatus* Phytoplasmaulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 337–347.
- Lee, I., Zhao, Y. and Bottner, K. 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 87–91.
- Maramorosch, K. and Harris, F. 1980. *Vectors of plant pathogens*. Academic Press. New York. 467p.
- Maramorosch, K. 2011. Historical reminiscences of phytoplasma discovery. *Bulletin of Insectology*, 64 (Suppl), S5-S8.
- Marcone C., Lee, I., Davis, R., Ragozzino, A. and Seemüller, E. 2000. Classification of Aster Yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1703-1713.
- McCoy, R., Caudwell, A., Chang, C., Chen, T., Chiykowski, L., Cousin, M., Dale de Leeuw, G. Golino, D., Hackett, K., Kirkpatrick, B., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R., Sugaira, M., Whitcomb, R., Yaqng, I., Zhu, B. and Seemuller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma – like organism. In: *The Mycoplasmas* (Whitcomb, R. and Tully, J. eds.), pp 546 – 640. New York. Academic Press.
- McKamey, S. 2002. Leafhoppers of the World database: progress report. In: Hoch, Asche, H.; Homberg, C. and Kessling, P. (eds). 11th. International Auchenorrhyncha Congress, 5-9 August. Berlin (Germany).
- Monis, P. and Giglio, S. 2006. Nucleic acid amplification based techniques for pathogen detection and identification. *Infection Genetics and Evolution*, 6: 2–12.

- Nakashima, K. y Hayashi, T. 1995. Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Phytopathological Society of Japan*, 61:451-455.
- Nault, L. and Ammar, E. 1989. Leafhoppers and planthoppers transmission of plantviruses. *Annual Review Entomology*, 34: 503-529.
- Nielson, M. 1979. Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. Pp. 3–27. In: Maramorosch, K. y Harris, K. (eds.). *Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents*. London: Academic.
- Nipah, J. O.; Jones, P.; Hodgetts, J. and Dickinson, M., 2007. Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. *Bulletin of Insectology*, 60 (2): 385-386.
- Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A. and Kuboyama, T. 2001. Plant expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*, 147: 507-513.
- Oman, P., Knight, W. and Nielson, M. 1990. *Leafhoppers (Cicadellidae): a bibliography, generic check-list and index to the world literature 1956-1985*. CAB International Institute of Entomology. Wallingford. U.K. 368 p.
- Olivier, C. and Galka, B. 2008. Consequences of phytoplasma infection on canola crop production in the Canadian prairies. *Proceedings of Endure International Conference, Diversifying crop protection*. 12-15 October, La Grande- Motte, France, O-47: 1-4.
- Oliveira, S., Abreu, E., Araújo, T., Oliveira, E., Andrade, E. Pardo, J., Álvarez, E. 2014. First Report of a 16SrIII-L Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. *Plant Disease*, 98 (1): 153.

42 Aislamiento, patogenicidad y transmisión con *Scaphytopius marginelineatus* (Stal) de un fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca

---

- Oshima K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36: 27–29.
- Pardo, J. 2013. Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en protección de Cultivos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira (Colombia). 114p.
- Pineda, B. y Lozano, J. C. 1981. Investigaciones sobre la enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, CIAT. 16 p. (Seminarios Internos).
- Pineda, B., Jayasinghe, U. y Lozano, J. C. 1983. La enfermedad "Cuero de Sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA* 4:10-12.
- Poghosyan, A. y Lebsky, V. 2004. Aislamiento y estudio ultra-estructural de tres cepas de fitoplasmas causantes de enfermedades tipo "STOLBUR" en Solanaceae. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Méjico. *Fitopatología Colombiana*, 28: 21-30 p.
- Purcell, A. 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 20: 397-417.
- Schneider, B., Aherns, U., Kirkpatrick, B. and Seemuller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139: 519–527.
- Seemüller, E., Marcone, C., Laurer, U., Ragozzino, A. and Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80 (1): 3-26.

- Siddique, A., Gurthrie, J., Walsh, K., White, D. and Scott, P. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease*, 82: 1112-1120.
- Skripal, I., Malinovskaya, L. y Onishchenko, A. 1984. Método de aislamiento de micoplasmas agentes causales de amarillamientos de plantas. *Microbiol. Zh.* 46(1): 93-96 (rus).
- Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R. and Gibb, K. 2008. Comparative genome analysis of '*Candidatus Phytoplasma australiense*' (subgroup tuf-Australial; rp-A) and '*Ca. Phytoplasma asteris*' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190: 3979–3991.
- Varón, F. y Sarria, G. 2007. Enfermedades del maíz y su manejo; compendio ilustrado. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Federación Nacional de Cultivadores de Cereales (FENALCE) e Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá. Produmedios. 56p.
- Wei, W., Davis, R., Lee, I. and Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNS genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867.
- Wilson, M. and Weintraub, P. 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology*, 60: 177-178.
- Weintraub, P. and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review Entomology*, 51: 91-111.
- Weintraub, P. and Jones, P. 2010. Phytoplasmas. Genomes, plant hosts and vectors. CAB International. 348 p.
- Zwolinska, A.; Krawczyk, K. and Pospieszny, H. 2010. First report of stolbur phytoplasma infecting pea plants, p. 152. In: 18th International Congress of the IOM (BROWN D. R., BERTACCINI A., Eds). Chianciano Terme, Italy, July 11-16.



## **2. Aislamiento de un fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca (*Manihot esculenta Crantz*)**

### **Resumen**

En Colombia, el “cuero de sapo” es la enfermedad más limitante del cultivo de yuca, ocasiona pérdidas en producción de raíces hasta del 90%. Estudios del Centro Internacional de Agricultura Tropical, indican que su naturaleza puede ser viral o fitoplasmática; pero no se ha confirmado su causa. La presente investigación se desarrolló con el objetivo de lograr el aislamiento *in vitro* del fitoplasma asociado a cuero de sapo. Para ello, se emplearon medios de cultivo líquido (PivL) y sólido (PivS) desarrollados por Contaldo *et al.* (2012) y producido por Mycoplasma Experience Ltda, usando tejidos de raíces, peciolos, tallos, hojas y semillas de yuca afectada por la enfermedad. Estudios moleculares de PCR, qPCR, RFLP, secuenciación y microscopia de luz y electrónica fueron necesarios para verificar el crecimiento de fitoplasmas y descartar la presencia de otros microorganismos. Los resultados indicaron que los medios PivL y PivS permiten consistentemente el crecimiento de fitoplasmas, obteniendo colonias en medio sólido a partir de medio líquido con cambio de color (indicador pH) y las pruebas de PCR, qPCR y secuenciación confirmaron presencia de Cassava frogskin phytoplasma del grupo 16SrIII, en los dos medios de cultivo.

Con microscopio electrónico de transmisión aplicando la técnica de inmersión en resina, se lograron fotografías de células con morfología y tamaño similares a las fitoplasmáticas. Es la primera vez en el mundo que se consolida información suficiente del aislamiento de fitoplasmas en medio artificial. Adicionalmente, se logró el aislamiento de Pigeon pea witches´broom phytoplasma del grupo IX, a partir de tallos, peciolos y flores de vinca (*Catharanthus roseus*) con síntomas causados por fitoplasmas. Este proceso permitió

corroborar la efectividad del medio y la morfología de las células fitoplasmáticas bajo microscopía electrónica.

**Palabras clave:** Inóculo, etiología, patógenos vasculares, cultivos industriales.

## **Abstract**

In Colombia, the " Frogskin " is the most cassava disease limiting, cause's losses in production of roots to 90%. Studies of the International Center for Tropical Agriculture indicate that its nature can be viral or phytoplasmatic; but it has not confirmed the cause. The investigation goal was to achieve *in vitro* isolation of phytoplasma associated with Frogskin. For this purpose, liquid (PivL) and solid (PivS) culture media developed by Contaldo *et al* (2012) and produced by Mycoplasma Experience Ltd and tissues of roots, stalks, stems, leaves and seeds of cassava affected by the disease were used. Molecular studies of PCR, qPCR, RFLP, sequencing, light and electron microscopy were required to check the growth of phytoplasma and rule out the presence of other microorganisms. The results indicated that the PivL and PIVS media consistently allow the growth of phytoplasma, obtaining colonies on solid media from liquid medium with color change (pH indicator) and PCR, qPCR and sequencing assays, confirmed the presence of Cassava frogskin phytoplasma of 16SrIII group in both culture media.

The technique of resin immersion to transmission electron microscope examination, allowed photographs of cells with morphology and size similar to phytoplasms. It is the first time in the world that sufficient information consolidated about of isolation phytoplasma in artificial medium. In addition, the isolation of Pigeon pea witches'broom phytoplasma of group IX be achieved, using stems, petioles and flowers of vinca (*Catharanthus roseus*) with symptoms caused by phytoplasma. This process corroborated the effectiveness of medium and morphology under electron microscopy of phytoplasma cells.

**Key words:** Inoculum, etiology, vascular pathogens, industrial crops.

## 2.1 Introducción

La yuca es el cuarto producto básico más importante después del arroz, trigo y maíz; es componente principal en la dieta de más de 1000 millones de personas y uno de los vegetales de mayor fuente de energía en el mundo, tanto para consumo humano como animal (Buitrago, 1990; FAO/FIDA, 2000; Ceballos, 2012). Dentro de los factores limitantes para la producción de yuca en Colombia se destaca la enfermedad del “cuero de sapo”, puesto que afecta directamente las raíces, provocando pérdidas del 90% o más en el rendimiento (Pineda y Lozano, 1981; Pineda *et al.*, 1983; Calvert 1994; Lozano y Nolt, 1989; Calvert y Cuervo, 2002; Álvarez *et al.*, 2003; 2009; Carvajal, 2014). Además, se ha registrado en Brasil, Costa Rica, Panamá, Perú y Venezuela (Oliveira *et al.*, 2014; De Souza *et al.*, 2014; Cuervo *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2006).

En cuanto a la etiología, los estudios por más de 40 años en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), indican que su naturaleza puede ser de tipo viral (Hernández *et al.*, 1975; Pineda y Lozano, 1981, Lozano *et al.*, 1983; Jahasinghe y Lozano, 1983; Cuervo *et al.*, 2004; Calvert *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010; Carvajal *et al.*, 2014) o fitoplasmática (Cassava frogskin phytoplasma16SrIII-L) (Álvarez *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2010), y durante este tiempo se han logrado avances importantes en caracterización y detección de los microorganismos asociados.

Sin embargo, para avanzar en el conocimiento de una enfermedad y entender el efecto que un microorganismo causa en la planta, es necesario lograr su aislamiento y desarrollar pruebas de patogenicidad. En este sentido, a nivel mundial crece el interés por avanzar en la solución de problemas fitopatológicos asociados con fitoplasmas y para esto, es necesario plantear estrategias de manejo que tienen como punto de partida el conocimiento del agente causante.

Así, las principales limitaciones para su estudio son su aislamiento y cultivo en medio artificial, existiendo un amplio consenso entre los especialistas, sobre la dificultad y casi imposibilidad de crecerlos de esta forma. Los intentos de cultivo de fitoplasmas se registran desde hace más de 40 años, sin éxito (Hampton *et al.*, 1969; McCoy, 1979; Lee, 1986; Lee *et al.*, 2000; Conci, 2009 y otros).

No obstante, el paradigma existente, se han publicado también algunos artículos científicos donde se afirma haber aislado fitoplasmas, tal es el caso de Fudl Allah *et al.*, (1972; 1973); Ghosh *et al.*, (1975); sin que se haya podido demostrar plenamente la identidad del organismo aislado y por ende existe la duda si efectivamente correspondía o no a un fitoplasma. Además, Skripal y Malinovskaya (1984) y Skripal *et al.* (1984), trabajando con el medio CMIMB-72, en el Instituto de Microbiología y Virología de la Academia de Ciencias en Kiev, Ucrania, reportaron haber obtenido más de cien aislados de fitoplasmas a partir de diferentes plantas, principalmente con amarillamiento “Stolbur” en tomate. Posteriormente, Poghosyan y Lebsky (2004), haciendo uso del mismo medio reportaron el aislamiento de fitoplasmas tipo Stolbur en papa y tomate.

En 2012 Contaldo y colaboradores, investigadores de la Universidad de Bologna en Italia, lograron crecer fitoplasmas de varios subgrupos en un medio de cultivo artificial. A diferencia de los casos anteriores, el medio de cultivo usado, se encuentra cubierto por patente W02013186591 A1 de 19 diciembre de 2013 y es posible conseguirlo comercialmente en Mycoplasma Experience Ltda., permitiendo el uso por parte de otros investigadores.

Con base en los antecedentes expuestos, se desarrolló la presente investigación con el objetivo de lograr el aislamiento *in vitro* del fitoplasma 16SrIII-L, detectado en yuca afectada por cuero de sapo, y posteriormente utilizarlo como fuente de inóculo para el desarrollo de pruebas de patogenicidad.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Localización**

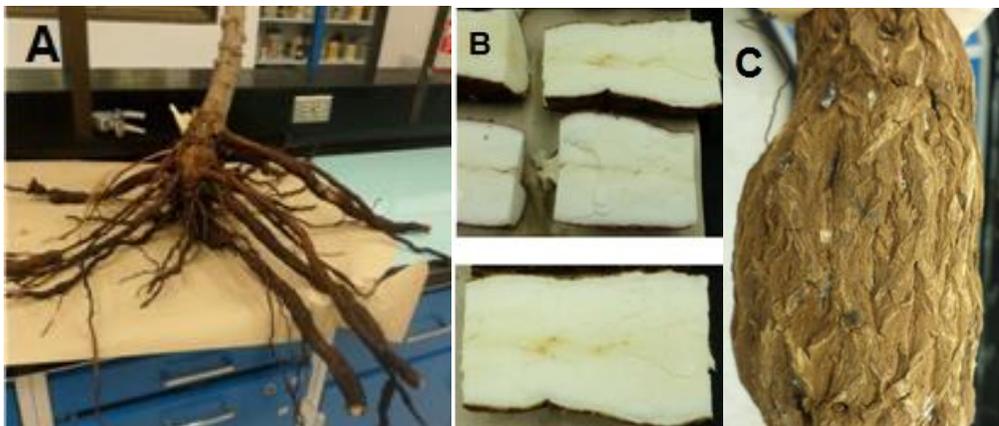
Este estudio se realizó en los laboratorios del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en Palmira, Valle del Cauca, a 3° 50´ N y 76° 35´, a 980 m.s.n.m con una precipitación anual de 1100 mm, HR del 78% y temperatura promedio de 24,5 °C. Las instalaciones como casas de malla, invernaderos, laboratorios, equipos y Software fueron facilitados por la disciplina de Patología de yuca de CIAT.

### 2.2.2 Material vegetal

Plantas de yuca de la variedad Parroquiiana, con síntomas de cuero de sapo fueron colectadas en plantaciones comerciales y en la estación experimental del CIAT en Santander de Quilichao (Cauca), donde la enfermedad de cuero de sapo se presenta en forma endémica. Los síntomas típicos de la enfermedad son: pequeñas fisuras longitudinales, localizadas cerca del sitio donde se originan las raíces y, posteriormente, se prolongan a lo largo de ellas. A medida que las raicillas aumentan de diámetro, las fisuras tienden a cicatrizar, dando paso a lesiones en forma de labio. Cuando las raíces maduran, las lesiones aumentan de tamaño y número, semejando una red. La epidermis se torna corchosa y la raíz se deforma.

En general, el sistema radical de las plantas afectadas no alcanza a tener el mismo desarrollo que tienen las plantas sanas; las raíces permanecen delgadas, leñosas, y su contenido de almidón es muy bajo. A veces, en una misma planta, algunas raíces engrosan normalmente sin presentar síntomas visibles mientras otras se ven severamente afectadas y forman látigos (Pineda y Lozano, 1981; Calvert *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009). Figura (2-1).

**Figura 2-1.** Sintomatología Cuero de Sapo



A. Raíces de yuca delgadas, presencia de látigos y la base del tallo gruesa. B. Parénquima y floema de la raíz de color café con manchas necróticas. C. Epidermis gruesa con aspecto de cuero de sapo, depresiones, fisuras en forma de labios y epidermis gruesa y corchosa. Fotos: autor.

Las plantas positivas para fitoplasma 16SrIII-L, fueron usadas como inóculo para las pruebas de aislamiento. Plantas de yuca (variedad SM909-25), certificadas por el banco de germoplasma de CIAT fueron incluidas como control negativo.

### **2.2.3 Aislamiento *in vitro* de fitoplasma 16SrIII-L**

Metodología modificada a partir de la desarrollada por Contaldo *et al.* (2012).

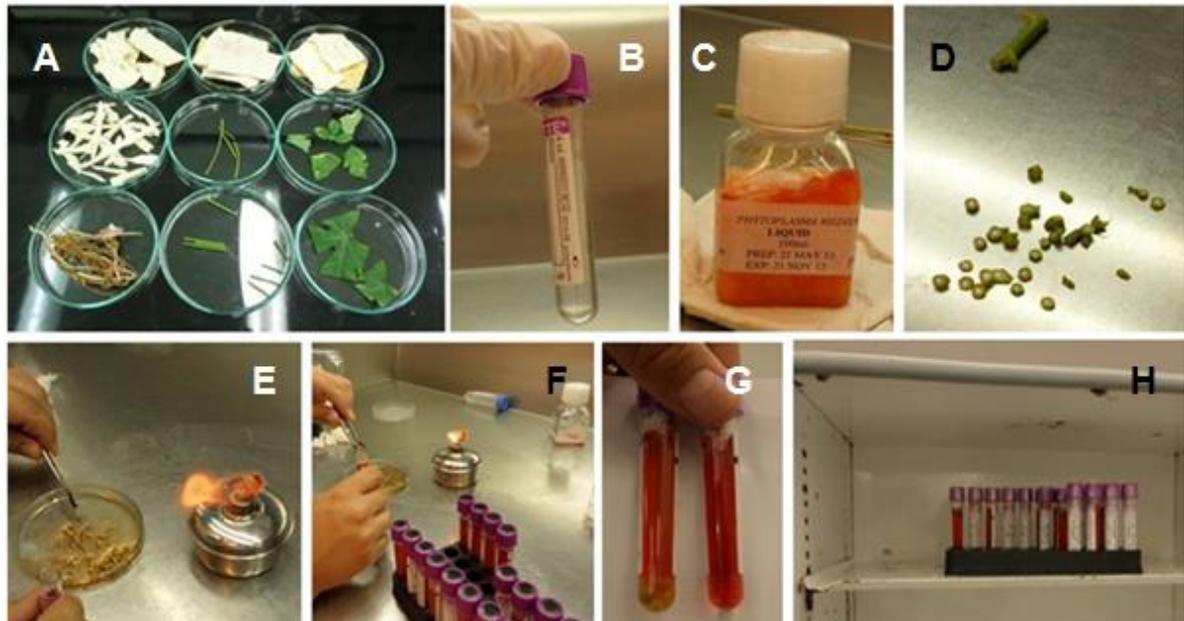
Durante los años 2013 a 2015 se hicieron pruebas de aislamiento del fitoplasma a partir de diferentes tejidos de yuca. Las raíces se lavaron con agua corriente para remover el exceso de suelo. Posteriormente se cortaron en fragmentos de 20cm y se retiró la epidermis. Luego se cortaron longitudinalmente para dejar expuesto el cilindro vascular (floema y xilema) de la raíz.

Finalmente, los tejidos se cortaron en fragmentos de 5 mm con cuchilla estéril. De igual manera se procesaron tejidos como semillas, peciolas, tallos y hojas, los cuales se lavaron con agua destilada estéril.

El medio líquido PivL preservado en nevera a -80 °C se dejó descongelando a temperatura ambiente una o dos horas antes de sembrar el tejido vegetal. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, se agregó a los fragmentos de tejido de yuca infectado con fitoplasma, 0,5 mL de PivL (*Phytoplasma in vitro liquid medium*) con rojo fenol durante dos minutos. Después los tejidos más el líquido se llevaron a un tubo Vacuette (Greiner Bio-One, ref.45001, K) de 4 mL y se mantuvieron en incubación a 30°C ±1°C.

También las plantas *in vitro*, obtenidas a partir de meristemos se utilizaron como control negativo. Un tubo con medio de cultivo sin inocular, sirvió como control absoluto. El proceso se describe en la figura (2-2).

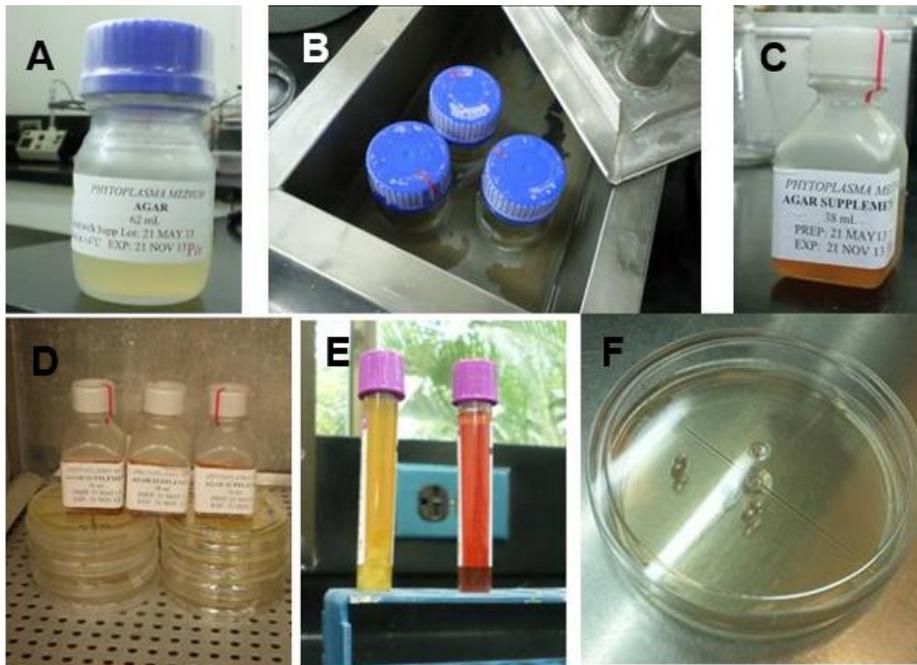
**Figura 2-2.** Aislamiento de fitoplasmas en medio líquido



A. Fragmentos de tejidos utilizados para el aislamiento. B. Tubo Vacuette (Greiner Bio-One, ref.45001, K). C. PivL (*Phytoplasma in vitro liquid medium*). D. Fragmentos de 5 mm de peciolo de yuca. E. Fragmentos de raíz humedecidos con PivL. F. siembra en medio PivL. G. A la izquierda medio con tejido y a la derecha tubo con medio sin tejido. H. Incubación a 30 °C.

Los tubos se evaluaron hasta observar el cambio de color, virando desde rojo anaranjado (pH 7) a amarillo (pH inferior a 6.8), indicativo de posible crecimiento de los fitoplasmas. De cada uno de los tubos que cambiaron de color, se sacaron 150uL del medio de cultivo líquido y se transfirieron a cajas de Petri de 6cm de diámetro, las cuales contenían 4 mL de PivS (*Phytoplasma in vitro solid medium*) y se dispersaron con perlas de vidrio. Además, se sembraron cajas con el medio PivL correspondiente a los controles, figura (2-3).

**Figura 2-3.** Aislamiento de fitoplasmas en medio sólido

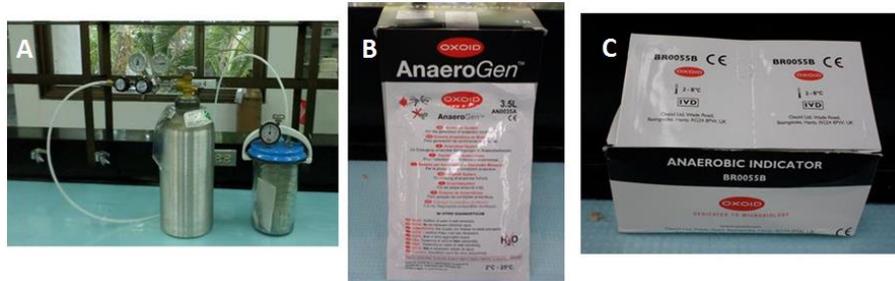


A. Phytoplasma Medio Agar. B. Agar en baño María a 95°C. C. Suplemento Phytoplasma Medio Agar en incubadora a 50°C. D. Cajas de petri con medio sólido. E. Izquierda, medio líquido color amarillo. A la derecha control color rojo. F. Medio PivS con perlas de vidrio para dispersión del PivL.

Posteriormente, las cajas se llevaron a incubación en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% N<sub>2</sub> por 5 a 7 días 25°C ± 1°C, en una jarra de anaerobiosis que contenía un sobre de AnaeroGen™ que absorbe oxígeno y además un indicador de anaerobiosis (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK), como se muestra en la figura (2-4).

El medio sólido PivS tiene dos partes, la primera es el agar, el cual se derrite a 95°C en baño María y el suplemento que debe derretirse a 37°C en incubadora. Posteriormente, los dos componentes se llevan a baño María a 50°C durante cinco minutos, para que alcancen la misma temperatura y puedan ser mezclados y servidos en las cajas de Petri, figura (2-4).

**Figura 2-4.** Condición de anaerobiosis para aislamiento de fitoplasmas



A. Jarra de anaerobiosis suplementada con nitrógeno y gas carbónico. B. Sobre de AnaeroGen™ C. Indicador de anaerobiosis (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK).

Adicionalmente, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, en el año 2015 se hizo el aislamiento de fitoplasmas a partir de tejido de vinca (*Catharanthus roseus*), con síntomas característicos causados por fitoplasmas como amarillamiento de hojas, achaparramiento, proliferación de brotes, malformación de flores entre otros (Sandrine *et al.*, 2001; Davis y Sinclair, 1998). Figura (2-5).

**Figura 2-5.** Síntomas típicos causados por fitoplasmas en vinca



A. Virescencia (pétalos se tornan verdes). B. Filodias. Presencia de órganos vegetativos en lugar de reproductivos (hojas en lugar de flores). C. Distorsión en el color de los pétalos (tonalidades lilas y verdes). D. Hoja pequeña y proliferación de brotes. Fotos: autor.

## 2.2.4 Pruebas Moleculares

Se hicieron pruebas de PCR, PCR anidado, PCR en tiempo real, RFLP y secuenciación para detectar e identificar fitoplasmas.

### 2.2.4.1. Toma de muestras de medio líquido y sólido

De los tubos positivos (cambio de color) y de los controles se pasaron alícuotas de 1000  $\mu$ L a tubos eppendorf y se centrifugaron a 16.000 rpm durante 30 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 20  $\mu$ L de agua. Alícuotas de 2 $\mu$ L se utilizaron para las pruebas de PCR y qPCR. Las colonias crecidas en medio PivS se removieron individualmente con puntas de 10  $\mu$ L, y se depositaron directamente en tubos de PCR y qPCR con la mezcla de reacción. Las cajas de controles nunca dieron presencia de colonias, pero se incluyeron en las pruebas de PCR, picando el medio y llevando al tubo de reacción.

### 2.2.4.2. Detección por PCR

Para las pruebas de PCR directa y anidadas, se preparó una mezcla de 12,5  $\mu$ L de go taq master mix 2X Promega, 0,5  $\mu$ L de cada cebador, 9,5  $\mu$ L de agua y 2  $\mu$ L de cada muestra de medio líquido, para un volumen final de 25  $\mu$ L. Los cebadores y perfiles se describen a continuación.

Se empleó la técnica de PCR anidado, usando para la PCR 1, los cebadores universales P1/Tint (Smart *et al.*, 1996), los cuales amplifican un fragmento de 1600 pares de bases, ubicado en la región 16S rDNA y parte del 23S rDNA y para la segunda PCR, los cebadores R16F2n/ R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1996) que generan un amplicón de 1200 pares de bases, correspondiente a la región parcial del 16S.

El perfil de amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación 50°C durante 2 minutos y extensión a 72 °C por 3 minutos, seguido de una extensión final a la misma temperatura por 10 minutos.

Para la segunda PCR se tomó 1  $\mu\text{L}$  del amplificado y se diluyó en 29  $\mu\text{L}$  de agua, utilizando 2  $\mu\text{L}$  de la dilución para la amplificación con los cebadores universales R16F2N/ R16R2 y las mismas condiciones de la primera PCR.

La PCR anidada específica para fitoplasmas del grupo III, se realizó con 1  $\mu\text{L}$  del amplificado de la PCR 2, y se diluyó en 39  $\mu\text{L}$  de agua. Posteriormente se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de la dilución con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 (Lee *et al.*, 1994), que amplifican un fragmento de 800 pb del gen 16Sr. El perfil de amplificación únicamente cambió en la primera desnaturalización que fue de 2 min a 94°C.

En el caso de los tejidos y aislamientos procedentes de vinca, la segunda PCR anidada, se hizo con cebadores universales M1/M2 (16R738/16R1232) que amplifican un fragmento de aproximadamente 500 pares de bases del gen 16SrDNA (Gibb *et al.*, 1995).

#### **2.2.4.3. PCR en tiempo real**

La PCR en tiempo real se hizo para la detección de fitoplasma 16SrIII, siguiendo la metodología descrita por Álvarez y Pardo (2013). La sonda y cebadores están basados en el gen 16Sr dentro de una región de 1400 pares de bases que codifica para proteínas de la subunidad 16S. Esta región es altamente conservada, presenta polimorfismos entre grupos de fitoplasmas y tiene dos copias en el genoma de cada célula bacteriana (Torres *et al.*, 2005), logrando mayor sensibilidad.

La sonda se encuentra en la posición 469 y los cebadores en 416 (sentido) y 492 (antisentido), logrando amplificar un fragmento de 72 pares de bases. Se trabajó a una concentración de 200 nM para la sonda y los cebadores.

#### **2.2.4.4. Electroforesis**

Se usaron 7  $\mu\text{L}$  del producto de amplificación para cargarlos en un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe (invitrogen) 4  $\mu\text{L}$ /200cc, y se corrieron en electroforesis a 110 V. Al finalizar la corrida se verificó con transiluminador y se hizo registro fotográfico (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **2.2.4.5. Patrones de restricción con enzima *Msel***

Los productos de la amplificación del segundo anidado (cebadores M1-M2) se cortaron con la enzima de restricción *Msel*, para obtener un patrón de bandas RFLP y confirmar la identificación del fitoplasma del grupo 16Sr III. Los productos se separaron en geles de acrilamida 8 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Los patrones electroforéticos de RFLP se compararon con perfiles de fitoplasmas del grupo III cedidos por el Doctor Juan Fernando Mejía de la Universidad de Bologna.

#### **2.2.4.6. Secuenciación de ADN**

Los productos de amplificación de la segunda PCR anidada, se limpiaron utilizando el método de precipitación de ADN con Polietilen glicol y etanol (Ziv y Fuentes, 2007), y se secuenciaron en Iowa State University. Las secuencias obtenidas se compararon por máximo apareamiento y porcentajes más altos de homología con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1990).

#### **2.2.4.7 Microscopia de Luz**

Las cajas de Petri con medio sólido inoculadas con PivL se observaron periódicamente a los 5, 7, 10 o más días de incubación. La observación se hizo directamente al microscopio de luz, ubicando la caja de Petri a diferentes aumentos desde 10X hasta 100X y fotografiando las colonias.

#### **2.2.4.8 Microscopia Electrónica de Transmisión**

Luego de la observación al microscopio de luz y de comprobar la presencia de colonias, se hizo un lavado con agua destilada estéril para luego pasar 1 mL a tubos eppendorf y posteriormente precipitar las células mediante centrifugación a 16.000 rpm durante 30 minutos. El precipitado se fijó en glutaraldehído al 2,5% y se envió a la clínica Santafé (Bogotá) para su procesamiento por el método de inmersión en resina.

La fijación se hizo en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato pH 7.2, se posfija en tetróxido de osmio al 1%, con centrifugaciones a 13.000 revoluciones por 3 minutos en cada paso. Posteriormente se deshidrata en gradiente ascendente de etanol desde 50% hasta 100%, con mezclas de etanol-acetona, para luego embeber e incluir en resina epóxica. La

polimerización se realizó a 70 °C, y los cortes semifinos entre 400 – 600 nm y ultrafinos entre 60 y 150nm. Posteriormente, los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1400 plus.

#### **2.2.4.9. Pruebas de PCR complementarias**

Con el objetivo de confirmar que el microorganismo crecido en el medio sólido (PivS) es un fitoplasma y no microorganismos contaminantes, se hicieron pruebas de PCR con cebadores específicos para la detección *Candidatus* Liberibacter y Rickettsias y cebadores universales para géneros de bacterias así:

Para *Candidatus* Liberibacter la reacción de PCR se hizo con cebadores específicos OI2c – OI1, los cuales amplifican un fragmento del gen 16Sr de 1160 pares de bases como lo describen Jagoueix *et al.* (1994). Como control positivo se usó una muestra de ADN total de cítricos, cedida por Saulo Alves Santos de Oliveira, D. Sc. Investigador de Mandioca e Fruticultura, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). El perfil de amplificación consistió en 35 ciclos de 92°C por 40 segundos (desnaturalización) y 72°C por 90 segundos (alineamiento y extensión) Jagoueix *et al.* (1996).

Para la detección de *Rickettsia* el ADN fue amplificado usando los cebadores CS-78 y CS-323, los cuales amplifican un fragmento de 401 pares de bases del gen citrato sintasa (*glcA*), Labruna *et al.* (2004). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización de tres minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineamiento a 48 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y una extensión final de siete minutos a 72 °C.

El control positivo consistió en una muestra de ADN de *Rickettsia* sp (cepa: *Atlantic rainforest*), cedida por el doctor Juan David Rodas G., Profesor Asociado Sede de Investigación Universitaria, SIU, Laboratorio 233, Centauro de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

La detección de géneros bacteriales se hizo con cebadores universales para amplificación de un fragmento del gen 16Sr de 1600 pares de bases EubB 27 y EubA 1522. El perfil fue

un ciclo de desnaturalización de 96 °C durante 3 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 3 minutos y una extensión final a 72 °C por 7 minutos (Giovannoni, 1991; Suzuki y Giovannoni, 1996).

## 2.3 Resultados y Discusión

### 2.3.1 Aislamiento en medio líquido

El método de aislamiento de fitoplasmas basado en el uso de medios de cultivo PivL y PivS, permitió el crecimiento de *Cassava frogskin phytoplasma* y *Pigeon pea witches´broom phytoplasma*, a partir de tejidos de yuca y vinca respectivamente.

A diferencia de los trabajos de Contaldo *et al.*, 2012, y Poghosyan y Lebsky, 2004, el proceso en esta investigación, se llevó a cabo con el hospedante primario tomado directamente de campo, sin necesidad de una transmisión previa en vinca (*Catharanthus roseus* L), u otras plantas indicadoras y su mantenimiento en cultivo *in vitro*. Esta práctica es recomendada para concentración de fitoplasmas, teniendo en consideración las características de susceptibilidad de tales plantas, especialmente vinca (Berges *et al.*, 2000; Hodgetts *et al.*, 2013).

Los experimentos mostraron resultados positivos cuando se usaron tejidos de floema de raíz y semilla (embrión) de yuca, o también usando tallos de vinca. Los tubos cambiaron de color en períodos comprendidos entre 5 y 15 días, pero no se tuvo éxito con los demás tejidos o los controles consistentes de plantas *in vitro* aparentemente sanas o tubos no inoculados.

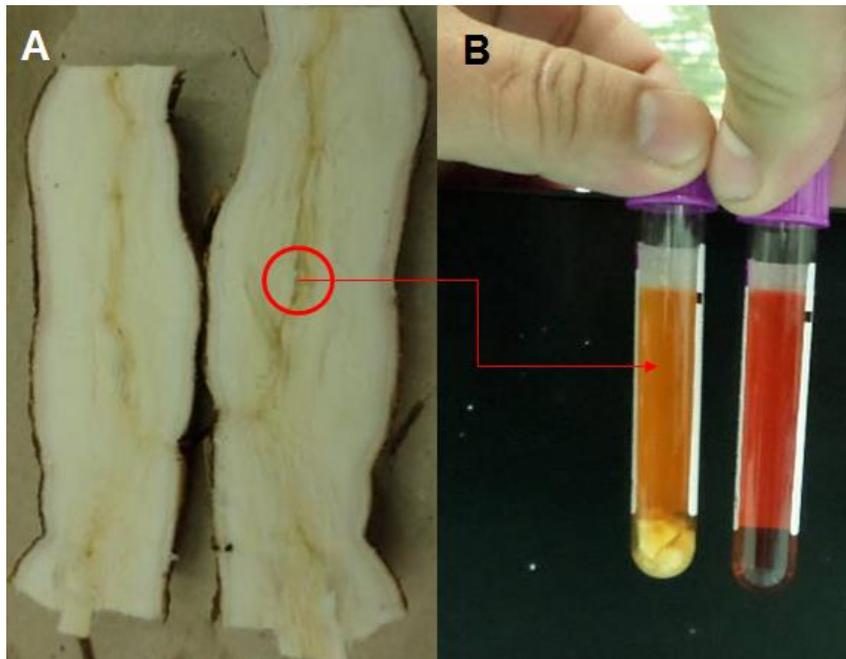
En esta investigación, los tiempos registrados para el cambio de color en el medio PivL, fueron mucho menores a los alcanzados en el trabajo de Contaldo *et al.* (2012), que oscilaron desde 16 a 90 días, y quienes afirman que tales cambios, en lapsos muy cortos están asociados a microorganismos contaminantes. No obstante, los mismos autores argumentan que la diferencia en el tiempo transcurrido para el cambio de color, puede deberse al tipo de fitoplasma que se esté aislando o a su concentración en los tejidos.

Al respecto, este comportamiento puede explicarse por la distribución de los fitoplasmas en la planta, siendo éstos, parásitos obligados que se restringen al floema (Doi *et al.*, 1967; Gundersen *et al.*, 1996; Marcone, 2013), aunque pueden presentarse en células acompañantes y parénquima (Christensen *et al.*, 2004; Webb, *et al.*, 1999) se han documentado muchos casos, donde se establece que estos parásitos se ubican en mayor medida en las raíces, de donde pueden obtener las fuentes de azúcar para su metabolismo (Christensen *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2013). De otra parte, también se han detectado fitoplasmas en semillas y tejidos embrionarios, como es el caso de palma de coco (Cordova *et al.*, 2003; Nipah *et al.*, 2007), semillas de alfalfa, tomate y lima (Botti y Bertaccini, 2006; Khan *et al.*, 2002).

En los experimentos con yuca, el medio líquido cambió de color consistentemente cuando se usó tejido de raíces de plantas con cuero de sapo, pero nunca con raíces sanas, hojas, peciolas o tallos. Este es un indicativo de la asociación del microorganismo con la enfermedad. Figura (2-6).

Trabajos de PCR, QPCR, RFLP y secuenciación, desarrollados en el laboratorio de patología de yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical, corroboran la asociación del fitoplasma del subgrupo 16SrIII, en raíces de plantas de yuca afectadas por cuero de sapo, pero no aquellas procedentes de plantas sanas (Álvarez *et al.*, 2009).

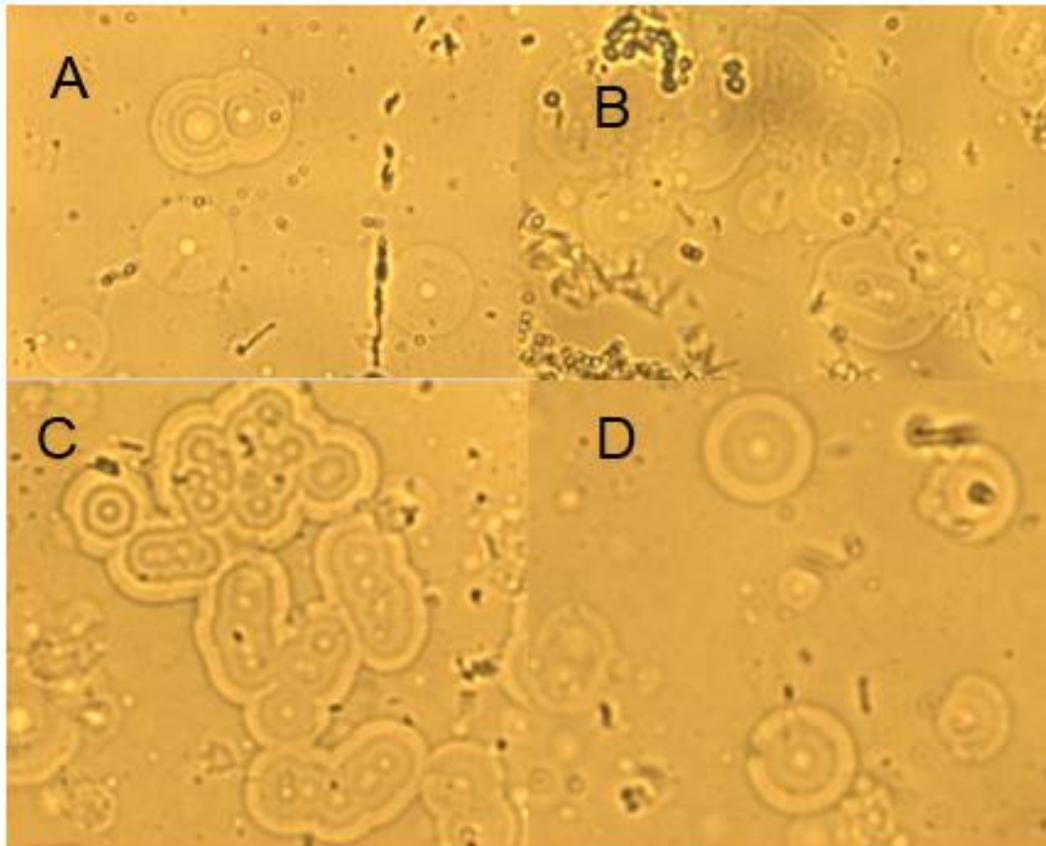
**Figura 2-6.** Cultivo de fitoplasmas a partir de raíces de yuca



A. Síntomas en tejido vascular, nótese la tonalidad marrón donde se concentran los haces del floema. B. Tubo de la izquierda, fragmentos de raíz con síntomas depositados en medio PivL ocho días después de la siembra y a la derecha el control. Fotos: autor.

Se hizo el examen de microscopía de luz del precipitado del medio líquido observando la presencia de colonias con un diámetro no superior a un milímetro, similares a “huevo frito” que son típicas de *Mycoplasmas*, como se han descrito en patologías de animales y humanos (Meseguer *et al.*, 2012), figura (2-7). Las colonias son muy similares en los dos casos, lo que permite considerar que corresponden a una misma clase de organismo. El crecimiento de este tipo de colonias en medio líquido, no ha sido documentado anteriormente en fitoplasmas o *mycoplasmas*.

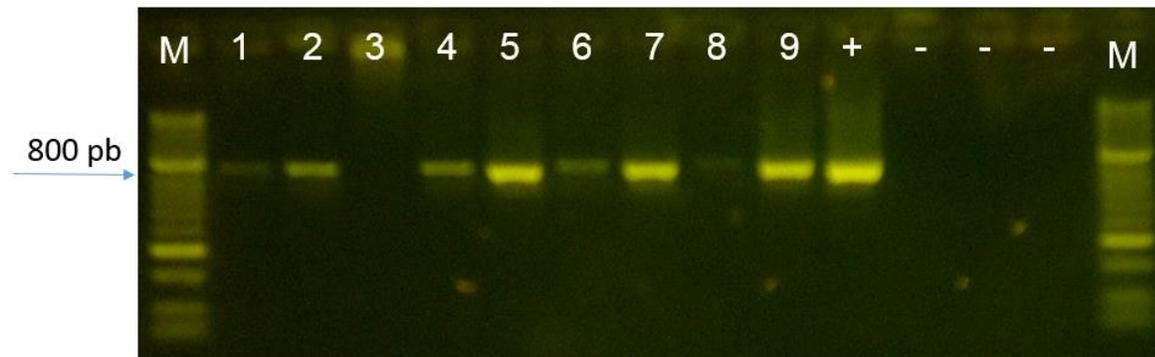
**Figura 2-7.** Colonias de fitoplasmas obtenidas en medio PivL



Fotografías A y B. Colonias de fitoplasmas en medio PivL a partir de tejido de vinca. C y D. Colonias a partir de tejido de yuca. Magnificación a 100X. Fotos: autor.

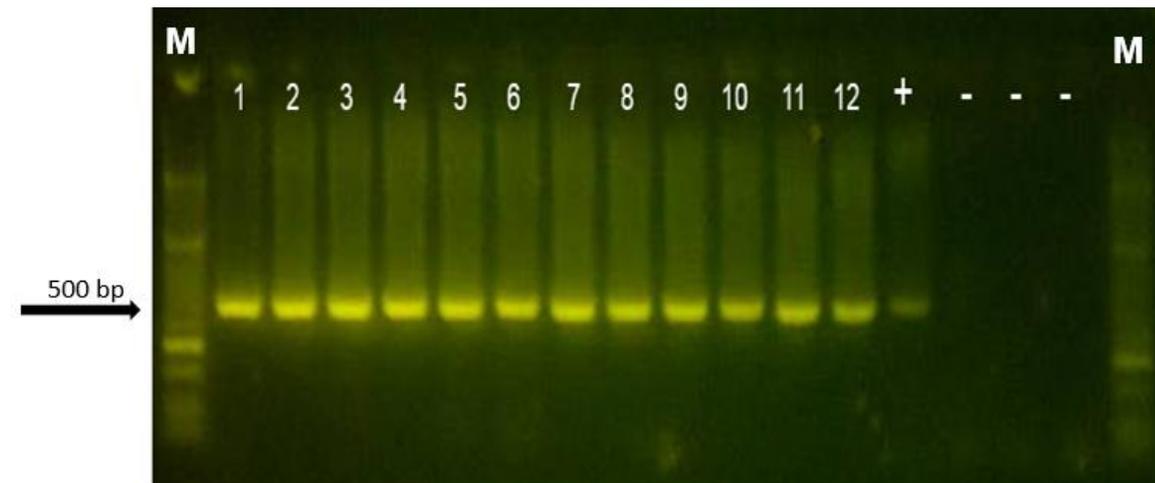
Las pruebas moleculares de PCR anidado de muestras procesadas a partir de medio líquido tanto de yuca como de vinca, también revelaron la presencia de fitoplasmas, al amplificar los fragmentos correspondientes a los cebadores universales y específicos, los cuales son usados en todo el mundo en trabajos de detección de fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Gundersen *et al.*, 1996; Gibb *et al.*, 1995; Lorenz *et al.*, 1995) Figuras (2-8 y 2-9).

**Figura 2-8.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de cultivo de fitoplasmas en medio PivL sembrado con tejido de plantas de yuca con síntomas de cuero de sapo



Fragmento de 800 pares de bases. Carriles: 1 al 9. Muestras del medio líquido, (+): plásmido fitoplasma yuca (control positivo) y (-): controles negativos (tejido sano, medio sin inocular y control de reacción). M: marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

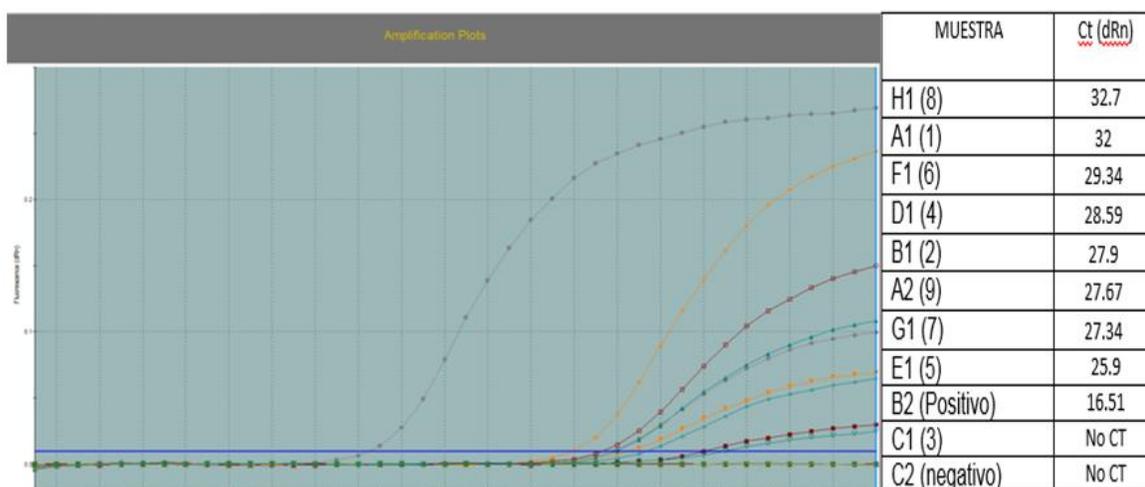
**Figura 2-9.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores M1/M2 de cultivo de fitoplasmas en medio PivL sembrado con tejido de plantas de vinca con síntomas causados por fitoplasmas



Fragmento de 500 pares de bases. Carriles: 1 al 12. Muestras del medio líquido, (+): plásmido fitoplasma yuca (control positivo) y (-): control negativo (tejido sano, medio sin inocular y control de reacción). M: marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

Adicionalmente, la prueba de PCR en tiempo real, con sonda y cebadores específicos para Cassava frogskin phytoplasma, la cual presenta mayor sensibilidad y especificidad, corrobora la presencia de fitoplasmas en el medio líquido. Las curvas de amplificación coinciden con los resultados obtenidos en la PCR convencional para el caso del fitoplasma de yuca. Figura 2-10.

**Figura 2-10.** PCR en tiempo real de muestras de medio PivL sembrado con tejido de raíz de yuca

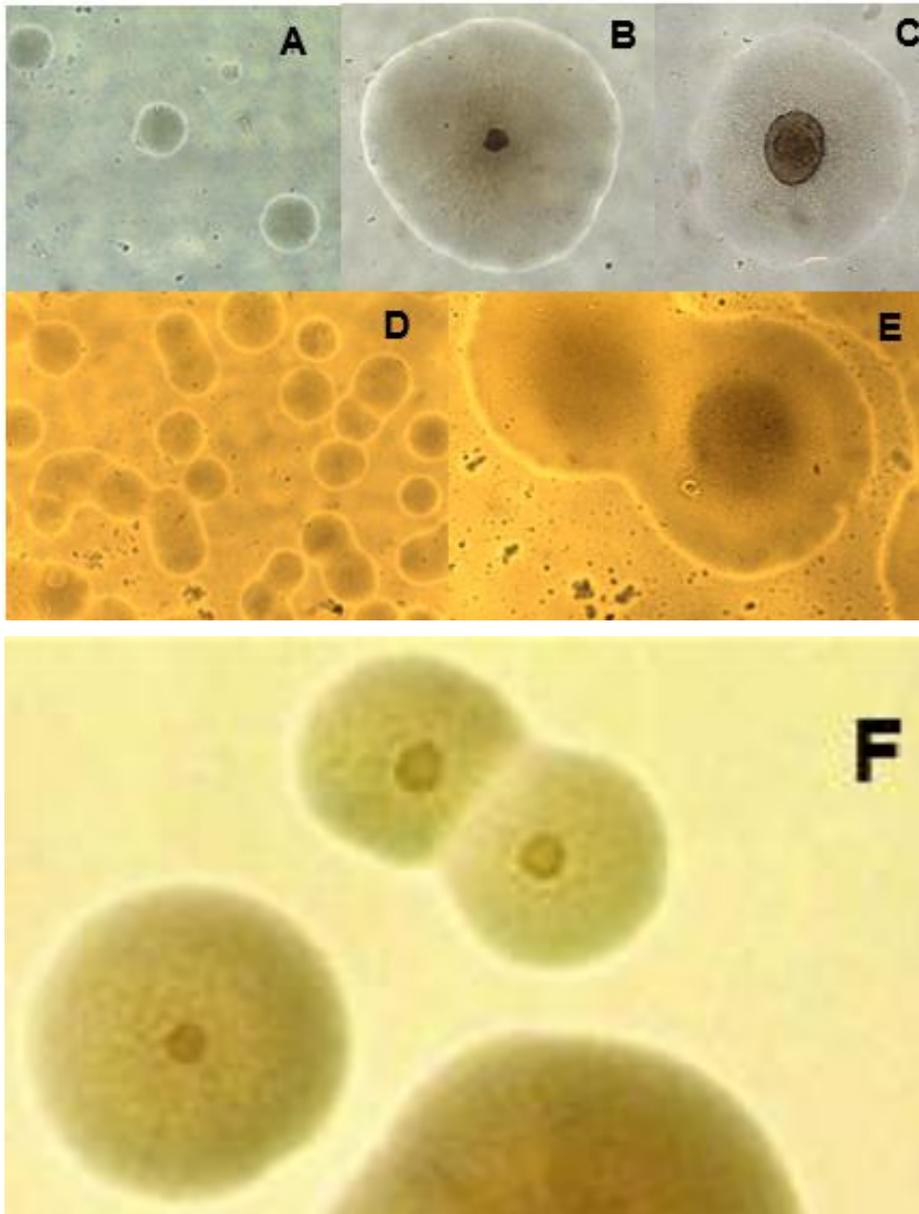


Gráfica de PCR en tiempo real con sonda y cebadores específicos para grupo 16SrIII, indicando que ocho de las nueve las muestras de medio líquido (PivL) con tejido de raíz de yuca fueron positivas a fitoplasma. El control positivo correspondió a un plásmido del fitoplasma Cassava frogskin disease phytoplasma.

### 2.3.2 Aislamiento en medio sólido

El examen microscópico de los platos de Petri con medio PivS y sembrados con medio PivL (cambio de color) procedentes tanto de tejidos de yuca como de vinca, mostraron la presencia de colonias similares a las que forman los Mycoplasmas (Tully, 1993; Tully, 1995; Pitcher *et al.*, 2005) y aquellas registradas en los trabajos de Poghosyan y Lebsky (2004) y Contaldo y colaboradores en 2012, en el caso de fitoplasmas, figura (2-11).

**Figura 2-11.** Colonias de fitoplasmas crecidas en medio PivS a partir de PivL, en una atmósfera de 95% de N<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, fotografías entre 40 a 100 X



A, B y C. colonias obtenidas a partir de tejido de yuca; D y E. colonias obtenidas a partir de tejido de vinca. A. colonias a dos días de incubación. B. colonia individual a 5 días de incubación. C. colonia individual a 12 días de incubación. D. colonias a 3 días de incubación. E. Colonias a 8 días de incubación. Fotos: autor y F. *Mycoplasma gallisepticum* strain R, (GenBank Accession #: AE015450, October 17th, 2002).

Las colonias son translúcidas, redondeadas y de difícil observación a simple vista. Éstas aparecen a partir del segundo día de incubación y después de una semana o más, proliferan en gran cantidad. Las colonias obtenidas a partir de tejido de yuca y vinca son similares en morfología y tamaño, siendo éste, otro indicativo de que el tipo de organismo crecido en el medio es de la misma clase. Algunas colonias presentan la morfología típica de huevo frito, pero en su mayoría son colonias redondas, lisas, convexas y hacia el extremo de la colonia forman un doble borde de color más claro.

La compleja evolución reductiva de los Mollicutes, que los ha conducido a la pérdida de genes para síntesis de aminoácidos y pared celular, entre otros, obliga para su aislamiento, el uso de medios de cultivo complejos, los cuales deben contener esteroides, ácidos grasos, nucleótidos, aminoácidos y otros compuestos que satisfagan sus requerimientos nutricionales y presión osmótica (Tully, 1995; Jensen *et al.*, 1996; Meseguer *et al.*, 2012).

En forma análoga, los medios de cultivo descritos en trabajos de aislamiento de fitoplasmas, contienen los mismos y otros elementos (Fudl Allah *et al.*, (1972; 1973); Ghosh *et al.* (1975); Skripal y Malinovskaya (1984); Skripal *et al.* (1984) y Poghosyan y Lebsky (2004); Bertaccini *et al.*, (2010). Sin embargo, son muy escasos los registros de crecimiento de fitoplasmas en medios artificiales libres de células.

Actualmente se cuenta con la secuencia total de cuatro *Candidatus phytoplasmas*, (*Ca.P. asteris*' strains OY-M y AY-WB, '*Ca. P. australiense*,' y '*Ca. P. mali*') que indican que el tamaño de su genoma está por debajo de 900 Kb (Kube *et al.*, 2012). Esto hace que el aislamiento de fitoplasmas, sea aún más difícil, puesto que, sumado a la ausencia de muchos genes implicados en la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, ciclo del ácido tricarbónico y fosforilación oxidativa, está la carencia de genes para el ciclo de la pentosa fosfato y subunidades de ATP sintasa, indispensables para la vida (Oshima *et al.*, 2004). Esto explica por qué hay más casos exitosos en aislamiento de *Mycoplasmas* que de fitoplasmas.

Lo anteriormente expuesto, los hace parásitos obligados y dependientes de un aporte exógeno, ya sea proveniente de las células del hospedante o bien de la capacidad de un

medio enriquecido que simule un ambiente intracelular y sustente todas sus deficiencias genéticas y metabólicas.

De otra parte, en el caso más reciente, Contaldo y colaboradores en 2012, a pesar de no dar a conocer la totalidad de los componentes del medio, si detallan como parte de sus componentes, suero de cerdo (5 – 25%), el cual puede suministrar los esteroides necesarios para síntesis de membrana celular, como se ha discutido en los aislamientos de *Mycoplasmas* (Rodwell, 1969; Razin y Tully, 1970; Muñoz y Sotomayor., 1990). Así mismo, el extracto de levadura suministra aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento para síntesis de proteínas y división celular (Tully, 1995; Meseguer *et al.*, 2012).

También, en el protocolo de aislamiento de fitoplasmas, la incubación del medio sólido en una atmosfera saturada de nitrógeno y gas carbónico fue un condicionamiento que resultó esencial en el presente trabajo para la obtención de las colonias puras, puesto que cuando no se utilizó, se presentaron muchos problemas de contaminación por otro tipo de bacterias. La explicación radica en la condición de crecimiento anaeróbico de los fitoplasmas. En la presente investigación además se incluyó un consumidor de oxígeno y un indicador de anaerobiosis para verificar esta condición.

Los medios de cultivo PivL y PivS servirán a futuro como un complemento en el diagnóstico de las infecciones de plantas asociadas a fitoplasmas y pueden ser esenciales para la caracterización biológica y molecular de estos microorganismos, incluidos también los estudios de pruebas de patogenicidad y resistencia genética.

#### **2.3.2.1. Pruebas de PCR anidada**

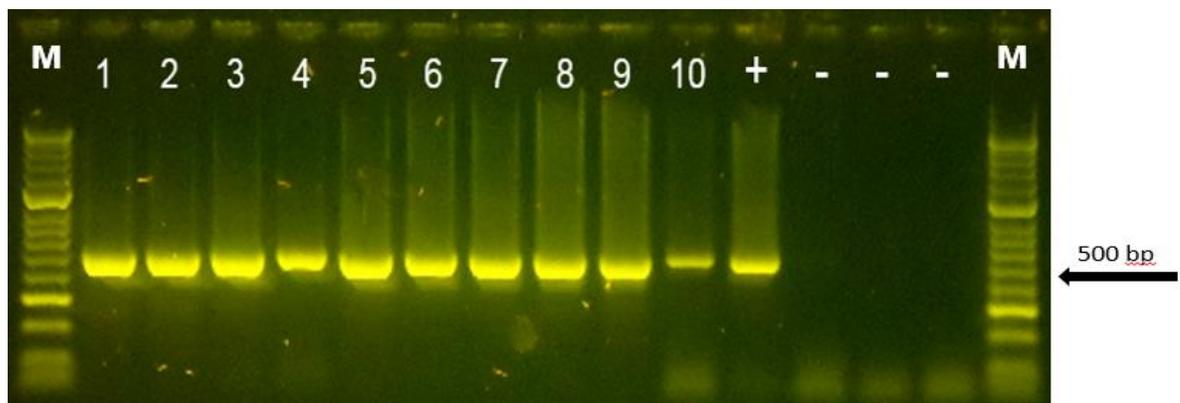
Al igual que en el medio líquido, las evaluaciones moleculares de las colonias individuales crecidas en el medio sólido resultaron positivas después de realizar las pruebas de PCR con R16F2n/R2 seguida de PCR anidada con cebadores universales (M1- M2) en el caso de Vinca y específicos para grupo III, los cuales se usaron solo para el caso del fitoplasma asociado a yuca. En ninguno de los casos, los controles negativos amplificaron, como se muestra en las figuras 2-12 y 2-13.

**Figura 2-12.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de colonias individuales de fitoplasmas crecidos en medio PivS a partir de tejido de yuca con síntomas de cuero de sapo



Fragmento de 800 pb. Carriles 1-18: Colonias individuales. (+): Control positivo (plásmido fitoplasma yuca). (-): Controles negativos (medio sin colonias y control de reacción) y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

**Figura 2-13.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores universales M1/M2 de colonias individuales de fitoplasmas crecidos en medio PivS a partir de tejido de vinca con síntomas de fitoplasmas

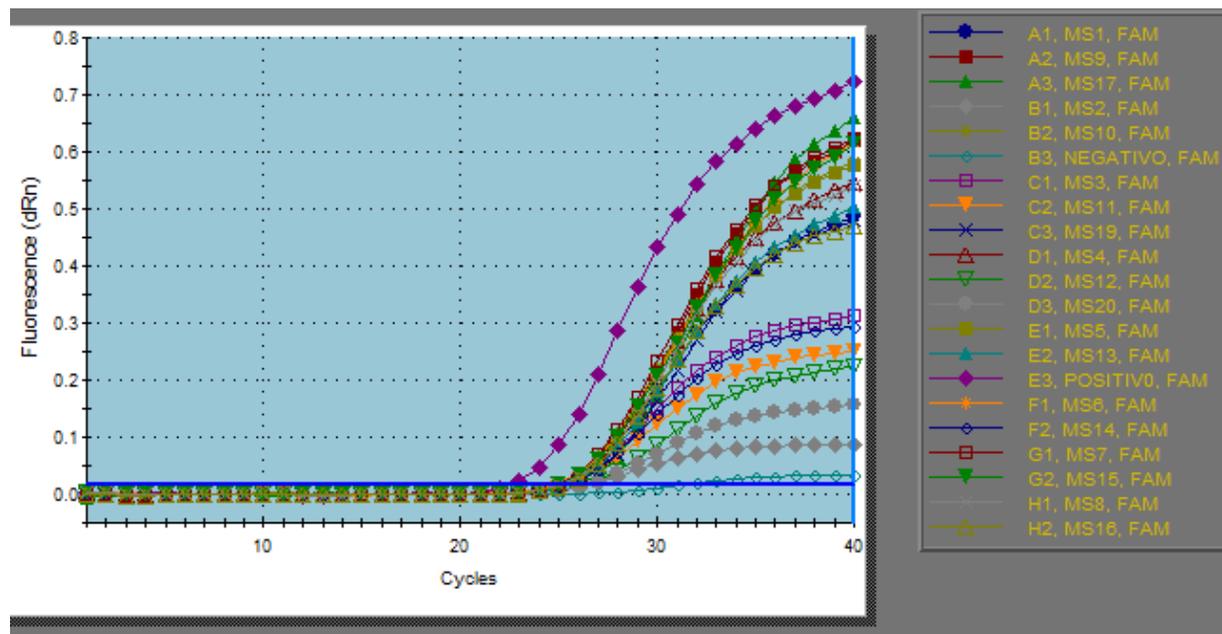


Fragmento de 500 pb. Carriles 1-10: colonias individuales. (+): Control positivo (plásmido fitoplasma yuca), (-): Controles negativos (medio sin colonias y control de reacción) y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

### 2.3.2.2. PCR en tiempo real

La presencia de fitoplasmas además se confirmó con la prueba de PCR en tiempo real, con cebadores específicos para fitoplasmas del grupo 16Sr III, que permitió verificar el crecimiento de Cassava frogskin disease phytoplasma en el medio, figura 2-14.

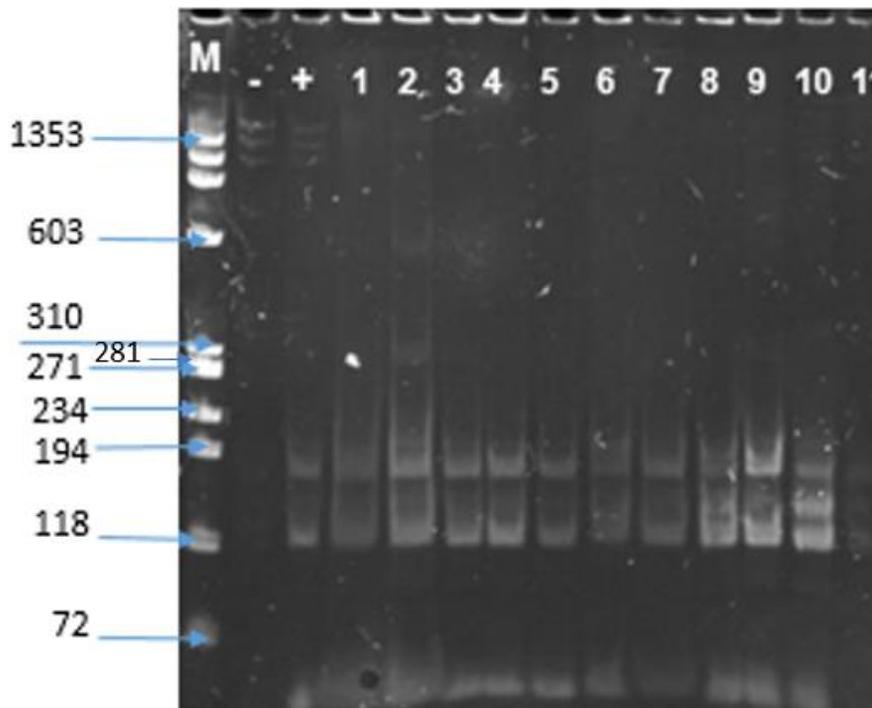
**Figura 2-14.** PCR en tiempo real con cebadores específicos para el grupo 16SrIII de colonias individuales crecidas en medio sólido PivS a partir de tejido de yuca afectada por cuero de sapo



### 2.3.2.3 RFLP

Adicionalmente, se demostró que las colonias correspondían a fitoplasmas a partir de la restricción con la enzima MSEI, la cual mostró un patrón igual al de grupo 16SrIII, como se indica en la figura 2-15.

**Figura 2-15.** Perfil electroforético RFLP en gel de poliacrilamida de productos de PCR con cebadores M1/M2 de colonias individuales de fitoplasmas



Se usó la enzima *MseI* para digerir un fragmento de 500-pares de bases. El patrón RFLP coincide con el registrado para otros fitoplasmas de grupo 16SrIII. (-): control negativo, (+): control positivo (plásmido de fitoplasma de yuca), carriles 1 – 10: muestras de colonias individuales crecidas en PivS. M: marcador de peso molecular  $\Phi$ X174.

#### 2.3.2.4. Microscopía Electrónica

La técnica de microscopía electrónica empleada permitió confirmar la presencia de células procariontes con forma y tamaño similares a los registrados para fitoplasmas en diferentes investigaciones (Chapman, *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 2001; Pribylova *et al.*, 2001; Mussetti *et al.*, 2002; Ávila, 2006), a pesar que estos trabajos se han realizado directamente a partir de tejido vegetal infectado y no de cultivo artificial, como en este estudio. Sin embargo, la morfología predominante fue pleomórfica, circular y oval, que es típica de fitoplasmas, sin diferencias notables entre las dos especies provenientes de yuca y vinca respectivamente.

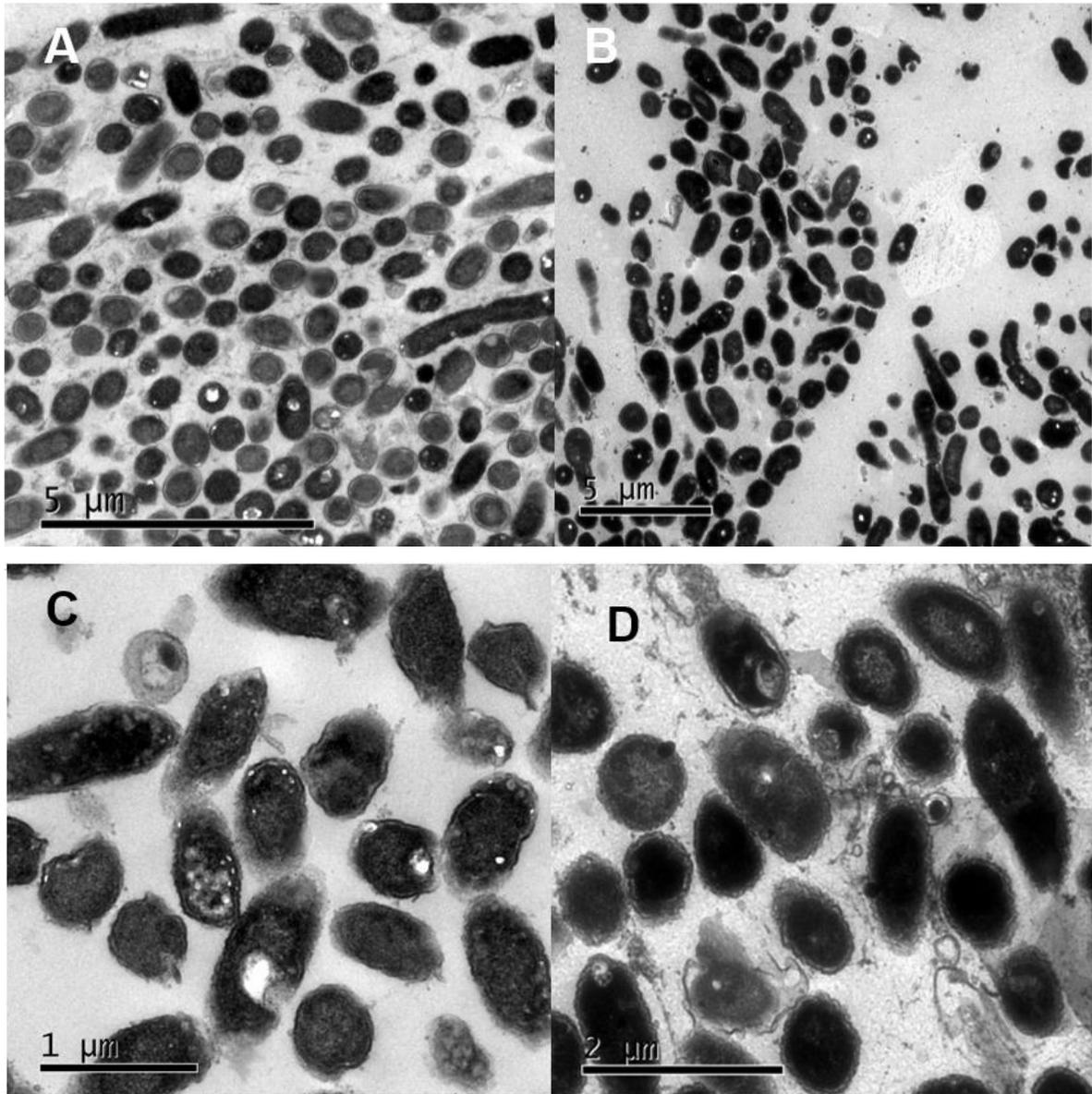
En cuanto a su tamaño, se pudo apreciar células con aproximadamente 500 nm de diámetro en aquellas circulares, y, hasta 2  $\mu$  en las pleomórficas. En estudios de microscopía electrónica se han registrado dimensiones celulares que oscilan desde 120 nm a 500 nm en diámetro y 1,2  $\mu$  o más de largo (Waters y Hunt, 1980; Lee *et al.*, 2000; Mussetti y Favali, 2004). Y Chapman y colaboradores (2001), afirman que los cambios morfológicos de las células fitoplasmáticas dependen en gran medida de la especie involucrada, la edad y otros factores. En La presente investigación un elemento adicional lo constituye el hecho que los microorganismos están creciendo en un medio enriquecido, donde toman directamente sus nutrientes y posiblemente esto tenga influencia sobre su tamaño y desarrollo.

Las micrografías logradas permitieron además observar características internas muy detalladas acerca de la anatomía celular de fitoplasmas, como su membrana trilaminar, el cromosoma circular, su división celular entre otras.

En la figura 2-16, se presentan dichos detalles específicos de la morfología de las células fotografiadas al microscopio electrónico a partir de cultivos en medio PivS con aproximadamente una semana de incubación.

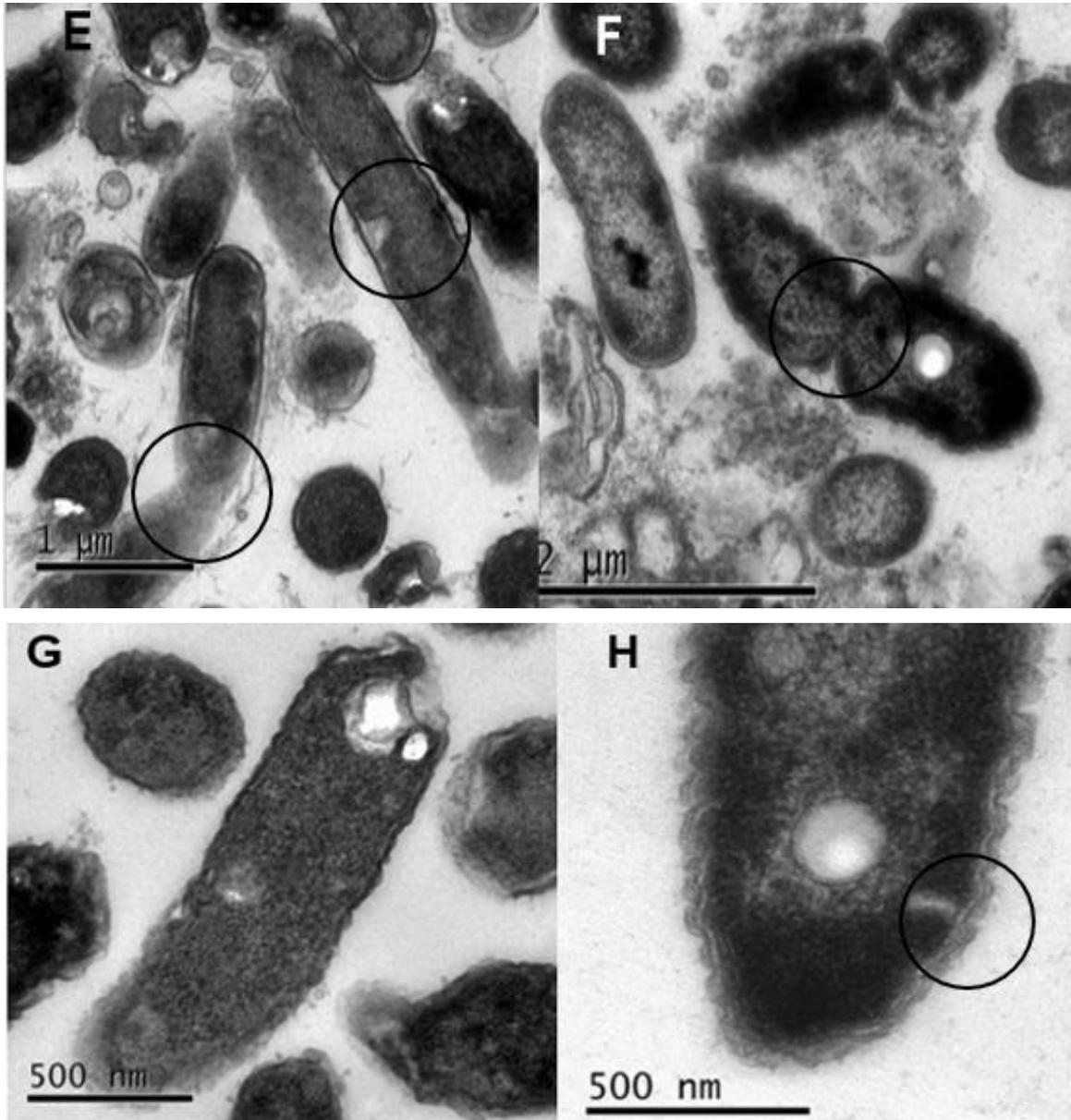
Las imágenes a la izquierda corresponden a cultivo a partir de tejido de vinca en tanto las de la derecha, son procedentes de yuca. Nótese la gran similitud entre los dos organismos.

**Figura 2-16.** Fotos de fitoplasmas tomadas en microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina a partir de cultivos en medio PivS (Parte I)



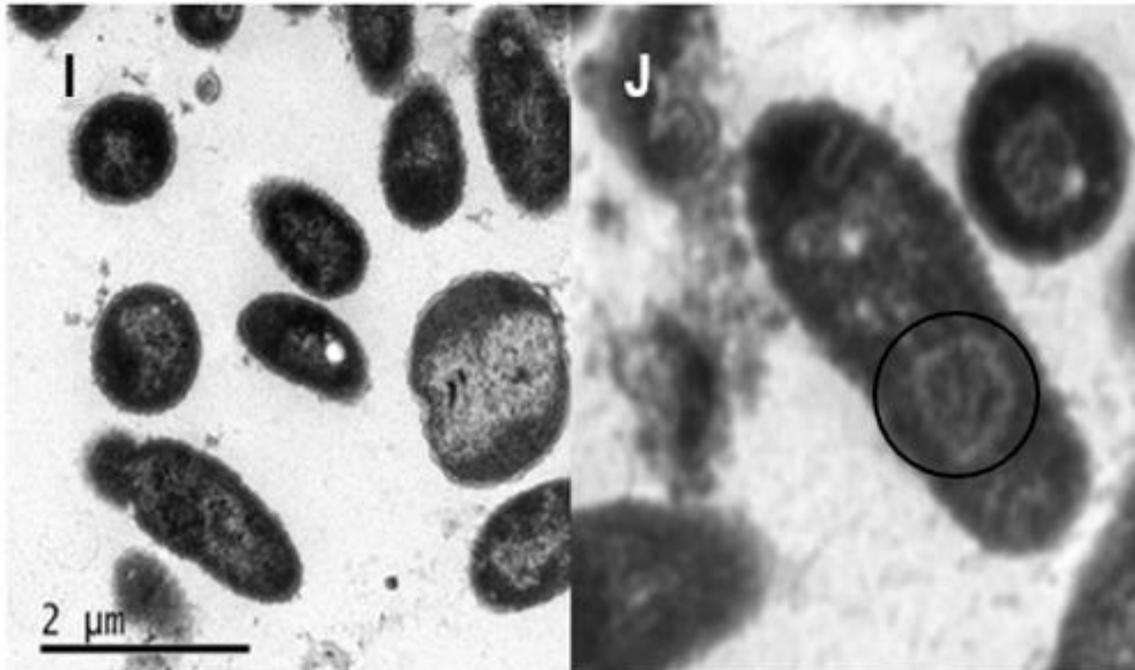
A y B. Proliferación de células con diferentes formas y tamaños similares a las registradas para fitoplasmas. C y D. Células pleomórficas sin pared celular y membrana celular irregular.

Figura 2-17. Fotos de fitoplasmas tomadas en microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina a partir de cultivos en medio PivS (Parte II)



E y F. Células en aparente estado de división. G y H. Membrana celular trilaminar y morfología pleomórfica típica de fitoplasmas.

Figura 2-18. Fotos de fitoplasmas tomadas en microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina a partir de cultivos en medio PivS. (Parte III)



I, J. Cromosomas circulares típicos de procariontes. Fotos: Yolanda Porra (Fundación Clínica Santafe, Bogotá).

### 2.3.3 Secuenciación de ADN

Los análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados con cebadores universales M1/M2 y específicos R16F2n - R2 del gen 16Sr ARN, mostraron homología del 99 o 100% con fitoplasmas reportados en el banco de genes y los fitoplasmas en estudio procedentes de yuca y vinca.

En el caso de los aislamientos de yuca, se obtuvieron secuencias de 500 y 800 pares de bases a partir de medio líquido y colonias individuales en medio sólido, que correspondieron a Cassava frogskin disease phytoplasma, después de ser analizados con las secuencias de referencia en el GenBank, mediante (Máximo apareamiento y porcentajes más altos de homología) la herramienta BLAST.

Cuatro de las secuencias de colonias individuales se registraron en el banco de genes bajo la siguiente codificación: Seq1: KT780862, Seq2: KT780863, Seq3: KT780864 Y Seq4: KT780865.

Así mismo, la búsqueda Blast de la base de datos de Gen Bank de las secuencias obtenidas a partir de plantas, medio líquido y sólido de vinca (*Catharanthus roseus*), fueron de 500 pares de bases y coincidieron con Pigeon pea witches´broom phytoplasma (grupo 16SrIX).

Este es el primer registro de secuencias del gen 16S obtenidas a partir de fitoplasmas cultivados en medio artificial. Los resultados genéticos soportan de manera definitiva la presencia de éstos microorganismos tanto en PivL como PivS, y la posibilidad de crecerlos en un ambiente extracelular.

### **2.3.4 Pruebas moleculares complementarias**

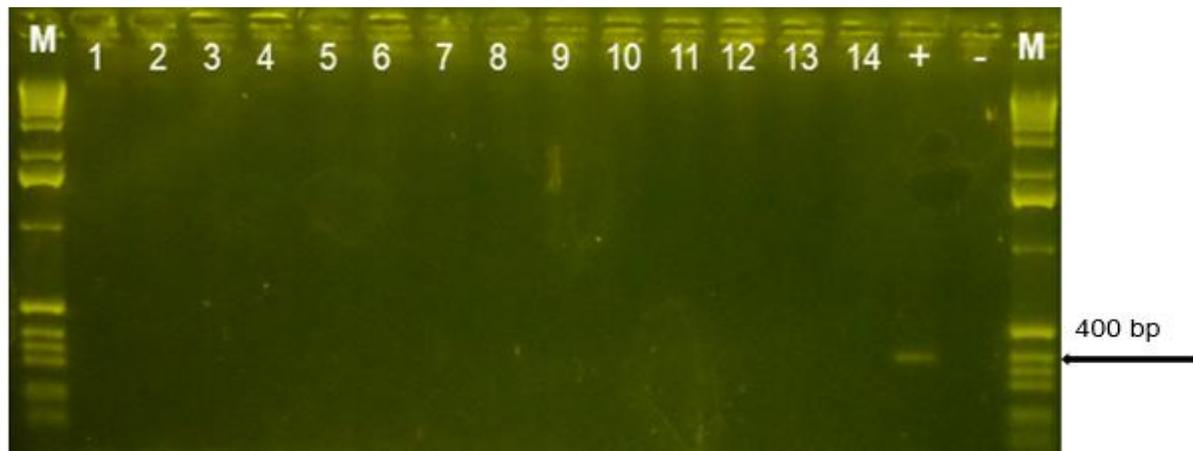
Las pruebas de PCR con cebadores universales registrados para dos géneros de las  $\alpha$  proteobacterias, correspondientes a *Ca. Liberibacter* (Leonard *et al.*, 2012) y *Rickettsia* (Labruna *et al.*, 2004) fueron negativas en todos los casos, haciendo uso de las colonias individuales crecidas en el medio de cultivo PivS. *Candidatus Liberibacter* se encuentra limitada al floema y *Rickettsia* al xilema, estos parásitos tienen una gran similitud morfológica con las células fotografiadas en este estudio y fue el motivo de la realización de estas pruebas. Los resultados muestran que ninguno de estos microorganismos está presente en las colonias obtenidas a partir del tejido de yuca, figuras (2-19 y 2-20).

**Figura 2-19.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos (OI1 - OI2c) para *Candidatus Liberibacter*



Fragmento del gen 16Sr de un tamaño de 1160 pb. Carriles 1 – 13 colonias crecidas en medio PivS, (+): Control positivo (ADN total de cítricos afectado por HLB), (-): Control negativo. M: marcador molecular de 1 Kb.

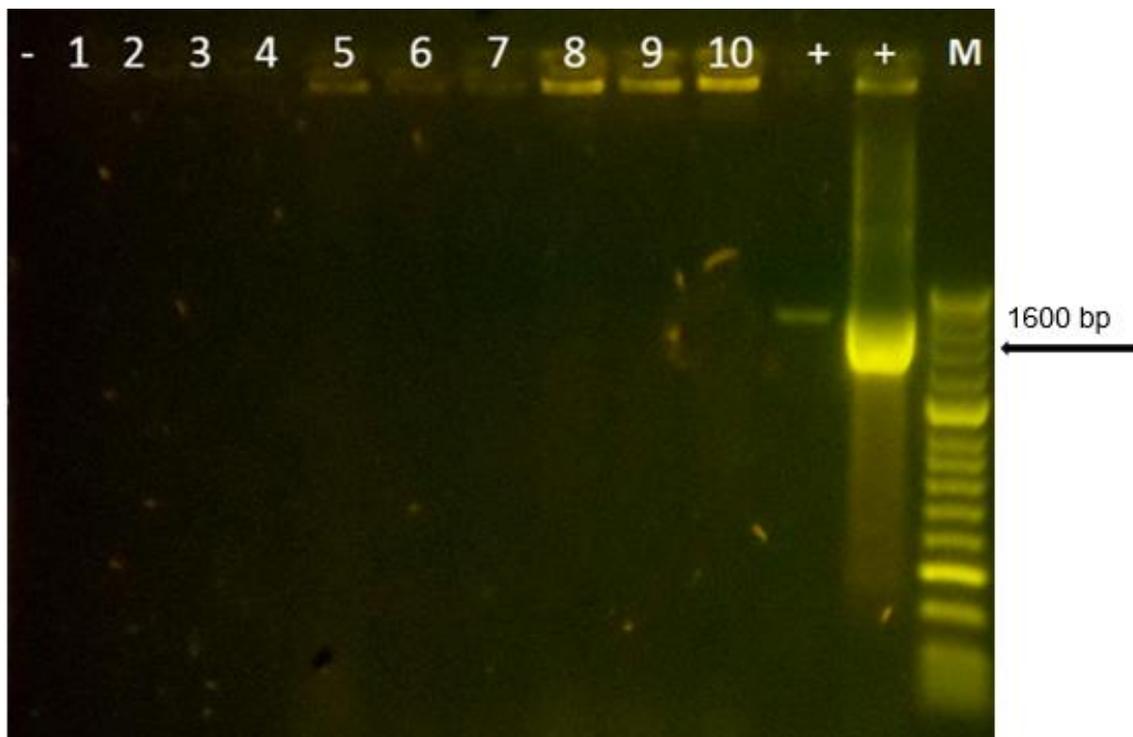
**Figura 2-20.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos (CS 78 y CS 323) para *Rickettsia*



Fragmento de 400 pb del gen citrato sintasa *gltA*. Carriles 1 – 14 colonias crecidas en medio PivS. (+): Control positivo (ADN de *Rickettsia sp* atlantic rainforest), (-): Control negativo. M: marcador de peso molecular de 1 Kb.

De igual manera, las pruebas de PCR con cebadores universales para otros géneros bacteriales (Giovannoni, 1991; Suzuki y Giovannoni, 1996), no permitieron la amplificación del fragmento del gen 16 Sr, indicando que en las colonias no se presenta contaminación por otro tipo de bacteria, figura 2-21. No obstante, en ausencia de nitrógeno y condiciones que no garanticen anaerobiosis se presentaron problemas de contaminación con bacterias, las cuales fueron identificadas como enterobacterias a través de secuenciación (datos no publicados).

**Figura 2-21.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores universales (EubB 27 y EubA 1522) para Bacterias



Fragmento de 1600 pb del gen 16Sr. Carril uno (-): control negativo, muestras 1 a 10: corresponden a colonias crecidas en medio sólido PivS, (+) (+) controles positivos (2 muestra de ADN de *Burkholderia gladioli*) y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

## 2.4 Conclusiones y Recomendaciones

La evidencia generada en el desarrollo de esta investigación por diferentes técnicas como: microscopia de luz y electrónica, estudios moleculares de PCR, qPCR, RFLP y estudios de secuenciación, teniendo en consideración la morfología de las colonias, tamaño, forma y características celulares, la amplificación de un fragmento del gen 16Sr, perfil de restricción enzimática igual al de fitoplasmas del grupo III, homología genética del 99 – 100 % con Cassava frogskin disease phytoplasma, en el caso de los aislamientos de yuca y Pigeon pea witches´broom phytoplasma (grupo 16SrIX) para los aislamientos de vinca. Revelaron claramente la posibilidad de crecimiento de fitoplasmas en el medio de cultivo artificial líquido y sólido (Phytoplasma medium PivL y PivS) fuera del ambiente celular del hospedante.

El perfeccionamiento de la técnica de aislamiento de fitoplasmas en medios de cultivo artificiales, permitirá a futuro implementarlos como métodos de diagnóstico y facilitará el estudio y caracterización de los fitoplasmas.

El aislamiento de fitoplasmas abre la posibilidad de realizar pruebas de patogenicidad que hasta el momento solo se han podido llevar a cabo a través de transmisión por insectos o por injerto. De igual forma, la evaluación de la reacción de genotipos de diferentes especies vegetales será factible a través de la inoculación del fitoplasma en forma artificial.

Es necesario iniciar estudios de aislamiento de fitoplasmas asociados a otras patologías de interés agrícola, que permitan su caracterización y esclarecimiento etiológico.

## Bibliografía

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 215: 403 – 410.
- Álvarez, E., Mejía, J. F., Loke, J. B., Hernández, L., and Llano, G. A. 2003. Detecting the phytoplasma-frogskin disease association in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia. (Abstr.) *Phytopathology*, 93:S4 (Also presented as a poster at the APS annual meeting, held in Charlotte, 9 - 13 aug. 2003. USA.
- Álvarez, E., Mejía, J.F, Loke, J.and Llano, G. 2006. Detection and characterization of a phytoplasma associated with cassava frogskin disease. *Fitopatología Colombiana*, 24, No 2.
- Álvarez, E., Mejía, J., Llano, G., Loke, J., Calari, A., Duduk, B. and Bertaccini, A. 2009. Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease*, 93: 1139 - 1145.
- Álvarez, E., Mejía, J. and Pardo, J.M. 2010. Development of a Real-time PCR assay, to detect and quantify a 16SrIII-L Phytoplasma associated with cassava frogskin disease (CFSD). *Phytopathology*, 100:S5.
- Álvarez, E. y Pardo, J. 2013. Diseño de sonda TaqMan® y cebadores específicos para la detección de fitoplasmas asociados a la marchitez letal en Palma de Aceite (*Elaeis guineensis*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Informe Técnico, archivo Patología de Yuca.
- Ávila, K. 2006. Estudio morfométrico de fitoplasmas de *Catharanthus roseus* por medio de técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido lateral. Trabajo de grado para optar el título de Biólogo. Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias. Bogotá (Colombia). 94p.

- Berges, R., Rott, M. and Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 90: 1145–1152.
- Bertaccini, A., Contaldo, N., Calari, A., Paltrinieri, S., Windsor, H. and Windsor, D. 2010. Preliminary results of axenic growth of phytoplasmas from micropropagated infected periwinkle shoots. *18th Congress IOM*, Chianciano Terme, Italy, Abstract P-147, p. 153.
- Botti, S. and Bertaccini, A. 2006. Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. In 16th International Congress of the International Organization of Mycoplasmaology. Cambridge, UK. 9-14 July, 2006.
- Buitrago, A. 1990. La yuca en la alimentación animal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 450p.
- Carvajal, M., Olaya, C., Lozano, I., Cuervo, M., Castaño, M. y Cuellar, W. 2014. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research*. 186: 76–86.
- Calvert, L. 1994. The safe movement of cassava germoplasm. In: First Meeting of the International Network for Cassava Genetic Resource: Report of the First meeting of the international Network for Cassava Genetic Resources, CIAT, IITA and IBPGR en el CIAT, Cali, Colombia.
- Calvert, L. y Cuervo, M. 2002. Enfermedades virales de la yuca en América del Sur. En: La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. B. Ospina y H. Ceballos (ed.). 262-268 p.
- Calvert, L. A., Cuervo, M., Lozano, J., Villareal, N., and Arroyave, J. 2008. Identification of three strains a virus associated with cassava plants affected by frogskin disease. *Journal of Phytopathology*, 156, 647 – 653 p.

- Chapman, G., Buerkle, E., Barrows, E., Davis, R. and Dally, E. 2001. A light and transmission electron microscope study of a black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), affected by witches' broom and classification of the associated phytoplasma. *Journal of Phytopathology*. 149: 589-597.
- Christensen, N., Nicolaisen, M., Hansen, M. and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17 (11): 1175–1184.
- Ceballos, H. 2012. Cassava in Colombia and the World: New prospects for millennial crop. 1 – 11 p. In: Cassava in the third millennium; modern production, processing, use, and marketing systems. Ospina, B. and Ceballos, H. (eds). CIAT (The International Center for Tropical Agriculture), CLAYUCA (The Latin American and Caribbean Consortium to Support Cassava Research and Development), CTA (The Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation).
- Conci, L. 2009. Mollicutes fitopatógenos. En: Cuarto curso internacional sobre caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Córdoba, Argentina.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H. and Windsor, G. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Università di Bologna. Firenze University Press. Phytopathologia Mediterranea*. 51, (3): 607 -617 p.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. and Oropeza, C. 2003. *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol Plant Pathology*. 4: 99–108.
- Cuervo, M., Villareal, N., Lozano, J., Arroyave, J. and Calvert, L. A. 2004. Identificación del grupo reoviridae afectando yuca y su asociación con la enfermedad de cuero de sapo. En Memorias del XXV congreso de Ascolfi, Agosto 11-13 de 2004, CIAT Palmira, 27 P.

- Davis, R. and Sinclair, W. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*. 88: 1372 – 1376.
- De Souza, A., Da Silva, F., Bedendo, I., and Carvalho, C. 2014. A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. *Plant Disease*. 98 (6): 771-779.
- Dickinson, M., Tuffen, M. and Hodgetts, J. 2013. The Phytoplasmas: An Introduction. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_2, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches 'broom, aster yellows or paulownia witches 'broom. *Annual Phytopathology Society Japan*. 33: 259 – 266.
- FAO/FIDA (Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola/Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectiva. Roma, Italia. 59p.
- Fudl-Allah, A., Calavan, E. and Igwegbe, E. 1972. Culture of a mycoplasma like organism associated with stubborn disease of citrus. *Phytopathology*. 62: 729 -731.
- Fudl-Allah, A. and Calavan, E. 1973. Effect of temperatura and pH on growth in vitro of a mycoplasma like organism associated with stubborn disease of citrus. *Phytopathology*. 63: 256 – 259.
- Galetto, L. y Marzachi, C. 2010. Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Phyllis, G., Weintraub and Jones, P. eds. CAB International.

- Gibb, K., Padovan, A., Mogen, B. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology*, 85: 169-174.
- Giovannoni, S. 1991. The polymerase chain reaction. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. New York, p 17.
- Ghosh, S., Raychaudhuri, S., Chenulu, V. and Varam, A. 1975. Isolation, cultivation and characterization of mycoplasma like organisms from plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 41 (4): 362 – 366.
- Gundersen, D., Lee, I., Schaff, D., Harrison, N., Chang, C., Davis, R. and Kingsbury, D. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16s rRNA groups I (aster yellows) and III (X-disease). *International Journal Systematic Bacteriology*. 46: 64-75.
- Hampton, R., Stevens, J. and Allen, T. 1969. Mechanically transmissible mycoplasma from naturally infected peas. *Plant Disease Report*. 53: 449 – 503.
- Hernández, A., Calderón, H., Zarate, R. y Lozano, J. 1975. Cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Cranz). *Noticias fitopatológicas*. 4: 117 – 118.
- Hernández, A., Calderón, H., Zarate, R. y Lozano, J. 1975. Cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Cranz). *Noticias fitopatológicas*. 4: 117 – 118.
- Hodgetts, J., Crossley, D. and Dickinson, M. 2013. Techniques for the Maintenance and Propagation of Phytoplasmas in Glasshouse Collections of *Catharanthus roseus*. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_2, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.

- Jagoueix, S., Bove, J. and Garnier, M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 397– 86.
- Jagoueix, S., Bove, J. and Garnier, M. 1996. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*. 10: 43–50.
- Jahasinghe, V. y Lozano, J. 1983. La enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista ASIAVA, (Colombia)*, 4. 10-12.
- Jensen, J., Hansen, H., and Lind, K. 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *Journal Clin Microbiol*. 34: 286 – 291.
- Khan, A., Botti, S., Paltrinieri, S., Al-Subhi, M. and Bertaccini, A. 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated sedes? In: 14th International Organization of Mycoplasma Conference. Vienna, Austria, July 7 – 12. 2002.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R. and Seemüller, E. 2012. Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 185942, 25 pages doi:10.1100/2012/185942.
- Labruna, M., Whitworth, T., Horta, M., Bouyer, D., McBride, J., Pinter, A. *et al.* 2004. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol*. 42:90-8.
- Lee, I. 1986. Prospects for in vitro culture of plant pathogenic mycoplasma like organisms. *Annual Reviews of Phytopathology*. 24: 339 – 354.
- Lee, I., Hammond, R. and Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.

- Lee, I., Gundersen, D., Hammond, R. and Davis, R. 1994. Use of mycoplasma like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559 – 566.
- Lee, I., Bertaccini, A., Vibio, M. and Gundersen, E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*. 85:728–735.
- Lee, I., Davis, R. and Gundersen, D. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.
- Leonard, M., Fagen, J., Davis-Richardson, A., Davis, M. and Triplett, E. 2012. Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. *Stand Genomic Sci* 7, 271–283.
- Lorenz, K., Schneider, U., Ahrens, U. and Seemuller, E. 1995. Detection of the Apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*. 85:771–776.
- Lozano, J. C., Jahasinghe, V. y Pineda, B. 1983. Enfermedades virales de la yuca en América. *Boletín informativo de la yuca*. CIAT. v. 7, n. 2. P.13.
- Lozano, J. and Nolt, B. 1989. Pest and pathogens of cassava. In: Kahn, R. (ed). *Plant protection and quarantine*. 2. Selected pest and pathogens of quarantine significance. CRC Press. Boca Raton. Florida. V2. 174 – 175 p.
- Marcone, C. 2013. Movement of Phytoplasmas and the Development of Disease in the Plant. Weintraub, P. and Jones, P (eds). *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. CAB International 2013.
- McCoy, R. E. 1979. Mycoplasmas and yellows diseases. In: *The mycoplasmas* (R.F. Whitcomb and J.G. Tully, eds.). 3: 229-264. Academic Press. New York.

- Meseguer, M., Boga, B., Andreu, L. y Grau, G. 2012. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 30 (8): 500 – 504.
- Morales, F., Lozano, I., Martínez, A. Olaya, C., Castaño, M., Villareal, N., Cuervo, M., Calvert, L. y Arroyave, J. 2010. Diagnóstico de enfermedades virales en cultivos tropicales: Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), Palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: Seminario Internacional Para Terceros Países “Caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas”. Córdoba, Argentina.
- Muñoz, G. and Sotomayor, P. 1990. Conditions for growing *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma verecundum* in a serum-free medium. Applied and environmental microbiology. Vol. 56, No. 7. p. 2259-2261. 0099-2240/90/072259-03\$02.00/0 Copyright C) 1990, American Society for Microbiology.
- Musetti, R., Loi, N., Carraro, L. and Ermacora, P. 2002. Application of immunoelectron microscopy techniques in the diagnosis of phytoplasma diseases. Microscopy Research and Technique. 56: 462- 464.
- Mussetti, R. y Favali, A. 2004. Microscopy techniques applied to the study of phytoplasma diseases: traditional and innovative methods. Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education.
- Nipah, J., Jones, P. and Dickinson, M. 2007. The Cape St Paul Wilt disease is transmitted to the embryos of infected West African tall coconut palms. Plant Pathology. 56:777–784.
- Oliveira, S., Abreu, E., Araújo, T., Oliveira, E., Andrade, E. Pardo, J., Álvarez, E. 2014. First Report of a 16SrIII-L Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. Plant Disease, 98 (1): 153.

- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H. *et al.* 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant pathogenic phytoplasma. Brief communications, *Nature Genetics*. 36:27 - 29.
- Pineda, B. y Lozano, J. C. 1981. Investigaciones sobre la enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, CIAT. 16 p. (Seminarios Internos).
- Pineda, B., Jayasinghe, U. y Lozano, J. C. 1983. La enfermedad "Cuero de Sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA*. 4, 10-12.
- Pitcher, D., Windsor, D., Windsor, H., Brabury, J. *et al.* 2005. *Mycoplasma amphoriforme* sp. Nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. *International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology*. 55: 2589-2594.
- Poghosyan, A. y Lebsky, V. 2004. Aislamiento y estudio ultraestructural de tres cepas de fitoplasmas causantes de enfermedades tipo "Stolbur" en Solanaceae. *Fitopatología Colombiana*. 28 (1): 21-30.
- Pribylova, J., Spak, J., Franová, J. and Petrzik, K. 2001. Association of aster yellows subgroup 16SrI-B phytoplasmas with a disease of *Rehmannia glutinosa* var *Purpurea*. *Plant Pathology*. 50: 776-781.
- Razin, S., and J. G. Tully. 1970. Cholesterol requirement of mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 102:306-310.
- Rodwell, A. W. 1969. The supply of cholesterol and fatty acids for the growth of mycoplasmas. *J. Gen. Microbiol.* 58:29-37.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 215 p.
- Saracco, P., Bosco, D., Veratti, F. and Marzachi, C. 2006. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant

- Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67, 212–219.
- Sandrine, J., Tarendeau, F., Goulter, K., Danet, J., Bové, J. and Garnier, M. 2001. *Catharanthus roseus* regulated diferentially by Mollicute infections. *The American Phytopathological Society*. 14: 225-233.
- Siddique, A., Agrawal, G., Alam, N. and Reddy, M. 2001. Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with little leaf disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) in Bangladesh. *Journal of Phytopathology*. 149: 237- 244.
- Smart, C., Schneider, B., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K., Seemuller, E. and Kirkpatrick, B. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environment Microbiology*, 62: 2988-2993.
- Skripal, I. y Malinovskaya, L. 1984. Medium SMIMB-72 para aislamiento y cultivo de micoplasmas fitopatógenos. *Microbiol. Zh.* 46 (2): 71-75. (ruso).
- Skripal, I., Malinovskaya, L. y Onishchenko, A. 1984. Método de aislameinto de micoplasmas agentes causales de amarillamientos de plantas. *Microbiol. Zh.* 46 (1): 93-96. (ruso).
- Suzuki, M. and Giovannoni, S. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microb.* 62, 625-630.
- Torres, E., Bertolini, B., Cambra, M., Montón, C. y Martín, M. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*. 19, 334–340
- Tully, J. 1993. Current status of the mollicute flora of humans. *Clinical Infectious Disease*. 17 (Suppl.1), S2-S9.

- Tully, J. 1995. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol (1): 119 – 131. Edited by S. Razin and J. Tully. San Diego, Academic Press.
- Waters, H. and Hunt, P. 1980. The in vivo three dimensional form of a plant mycoplasma like organisms by the analysis of serial ultrathin sections. Journal of General Microbiology. 116: 111-131.
- Webb, D., Bonfiglioli, R., Carraro, L., Osler, R. and Symons, R. 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. Phytopathology. 89 (10): 894–901.
- Ziv, A and Fuentes, C. 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from elemental samples. Universidad Nacional de Colombia. Fems Microbiol Lett, 272 (2): 269 - 275.

### **3.Pruebas de Patogenicidad con el fitoplasma 16SrIII-L en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)**

#### **Resumen**

La yuca es el cuarto producto básico más importante en el mundo, fuente alimenticia vital en América Latina y especie de gran impacto en Colombia, por el empleo directo que genera. El cultivo es afectado por problemas fitosanitarios, entre los cuales, el “cuero de sapo” es el principal, puesto que disminuye la producción de raíces hasta 90%. Estudios etiológicos en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), indican la asociación de virus y fitoplasmas a la patología. El presente trabajo tuvo como objetivo realizar tres pruebas de patogenicidad con fitoplasmas 16SrIII –L detectados y aislados a partir de yuca afectada por el disturbio. Para ello, plantas de yuca de la variedad (SM 909-25) de dos meses de edad, procedentes de cultivo in vitro y certificadas por el banco de germoplasma de CIAT, fueron inoculadas por injerto con estacas infectadas con fitoplasma y por inyección de fitoplasmas aislados en medio de cultivo artificial (Phytoplasma liquid medium, PivL). La tercera prueba se hizo con fitoplasmas crecidos en medio de cultivo sólido (Phytoplasma solid medium, PivS), con el cual se inocularon 64 genotipos de yuca. Después de inoculadas, las plantas fueron sembradas en suelo y mantenidas en casa de malla a prueba de insectos hasta su cosecha. Cuatro de 10 plantas injertadas, cinco de 180 inyectadas con medio líquido y cuatro (Bra 184, Col 896, Col 1 y CM 2952) de los 64 genotipos, presentaron síntomas típicos de la enfermedad, pero no sus controles. Pruebas de PCR, qPCR y secuenciación de ADN, indicaron la presencia del fitoplasma, pero no de virus en estas plantas. El reaislamiento del fitoplasma a partir de tejido de raíces enfermas, indican claramente su etiología.

**Palabras clave:** síntomas, aislamiento, pruebas biológicas, postulados de Koch.

## Abstract

Cassava is the fourth largest staple food in the world, vital food source in Latin America and species of great impact in Colombia, by direct employment generated. The crop is affected by several phytosanitary issues, including the "Frogskin" is the main, since root production decreases to 90%. Etiological studies at the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) indicate the association of virus and phytoplasmas to pathology. In this study, performed three pathogenicity tests with phytoplasma 16SrIIIL detected and isolated from cassava affected by the disease. Cassava in vitro plants of the variety (SM 909-25) of two months old were inoculated by grafting with phytoplasma-infected cuttings. Also by injection phytoplasmas isolated in artificial culture medium (liquid medium phytoplasma, PivL). The third test with phytoplasma grown on solid medium (Phytoplasma solid medium, PIV) was made, inoculating 64 cassava genotypes. After inoculation, the plants were sown in soil and kept in insect-proof greenhouse to harvest. Four of ten grafted plants, five of 180 injected with liquid medium and four (Bra 184, 896 Col, Col 1 and CM 2952) of 64 genotypes, showed typical symptoms of the disease, but not its controls. PCR, qPCR and DNA sequencing indicated the presence of phytoplasma but not virus in these plants. Reisolation of phytoplasma tissue from diseased roots, clearly indicate its etiology.

**Key words:** symptoms, isolation, biological proofs, Koch's postulates.

## 3.1 Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne, que mide entre 2 y 3 m y produce raíces gruesas que almacenan almidón. Esta especie se cultiva ampliamente en países tropicales y subtropicales de América Latina, África y Asia (Howeler, 2014). En 2013, se consideró como el séptimo cultivo alimenticio más importante en el mundo por el área sembrada, la cual se incrementó en 44%, desde 13.6 millones de hectáreas en 1980 a 19.6 millones en 2011. Y su producción creció en más del 100%, en el mismo lapso (FAOSTAT, 2013).

Además, es una importante y económica fuente alimenticia y de calorías, particularmente para la población de bajos ingresos del trópico. Los científicos enfocan sus esfuerzos en

el desarrollo de variedades de alta productividad y diseño de tecnologías de bajo consumo de insumos, que permitan mejorar la rentabilidad (Sanchez y Alonso, 2012). Además, es un cultivo industrial con potencial para generar ingresos permanentes para pequeños y medianos agricultores, y aporta al desarrollo social de las regiones donde se cultiva (FAOSTAT, 2013).

El cultivo puede presentar un nivel de daño económico alto, asociado a los ataques de plagas y enfermedades que reducen drásticamente el rendimiento (Ceballos y Ospina, 2002; Perozo et al., 2007; Figueroa, 2012). La situación se agrava debido al método de propagación por semilla vegetativa (siembra de estacas), que, si se encuentra infectada, incrementa la incidencia y severidad de problemas fitosanitarios de una campaña a la siguiente, alcanzando niveles epidémicos (Lozano et al., 1981; Maffla et al., 1984; Figueroa, 2012).

El “cuero de sapo” es la patología de mayor importancia del cultivo, por los efectos perjudiciales sobre la producción, debido al daño generado sobre las raíces, que en ocasiones alcanza porcentajes cercanos al 100% cuando la incidencia y severidad son altas (Pineda y Lozano, 1981; Pineda et al., 1983; Calvert 1994; Lozano y Nolt, 1989; Calvert y Cuervo, 2002; Álvarez et al., 2003; 2009; Carvajal et al., 2014). Desde los años 80, la enfermedad se presentó en la mayoría de las regiones productoras de yuca en Colombia, hasta llegar a departamentos como: Atlántico, Bolívar, Córdoba, Sucre, Magdalena, Arauca, Amazonas, Casanare, Meta, Vaupés, Quindío, Tolima, Huila, Cauca y Valle del Cauca, y se ha extendido por América Latina (Pineda et al., 1983; Calvert, 1994).

Para el año 2001 ya se había registrado en Brasil, Costa Rica, Panamá, Perú y Venezuela (Calvert y Cuervo, 2002; Cuervo et al., 2004; Álvarez et al., 2006). Y reportes recientes confirman su incidencia en Brasil (Oliveira et al., 2014; De Souza et al., 2014) y Paraguay (Cardozo et al., 2016). Además, se han registrado síntomas de la enfermedad en cultivos de yuca en China y Tailandia (Comunicación personal, Álvarez, 2016)

Diferentes autores han descrito el síndrome de la enfermedad, el cual abarca una gran variedad de síntomas, que van desde mosaicos y moteados en las hojas, hasta el

desarrollo de lesiones hundidas en la epidermis de la raíz, que al coalescer en forma longitudinal y transversalmente forman una red que se asemeja a la piel de un sapo y se torna opaca. Otras anomalías características son la presencia de raíces muy delgadas a manera de látigos, distorsiones y malformaciones de la raíz, y el engrosamiento exagerado de la base del tallo. La severidad con que se presentan depende del genotipo afectado, la edad de la planta y la concentración del inóculo del patógeno (Chaparro y Trujillo, 2001; Calvert et al., 2004; Álvarez et al., 2009; Pardo, 2013).

No obstante que la enfermedad de cuero de sapo en Colombia se conoce hace más de 40 años, el agente causante aún no se ha dilucidado de forma definitiva. En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), los resultados de investigaciones indican que varios virus (Hernández et al., 1975; Pineda y Lozano, 1981, Lozano et al., 1983; Jahasinghe y Lozano., 1983; Nolt et al., 1992; Calvert et al., 2001; Cuervo et al., 2004; Morales et al., 2010; Carvajal et al., 2014) y un fitoplasma (Álvarez et al., 2003; Álvarez et al., 2006; Álvarez et al., 2009; Álvarez et al., 2010), son los principales agentes infecciosos asociados al disturbio. Otros investigadores en Brasil, también han reportado la asociación de un Reovirus y el Fitoplasma 16SrIII en yuca afectada por cuero de sapo (Oliveira et al., 2014; De Souza et al., 2014).

En el estudio fitopatológico, son pocos los casos donde se ha determinado que virus y fitoplasmas pueden encontrarse de manera simultánea afectando una misma especie vegetal, como por ejemplo, lo que ocurre en maíz: Maize Bushy Stunt (fitoplasma), Corn Stunt Spiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*) y varios virus, de los cuales es importante destacar Maize rayado fino Marafivirus (Bedendo et al., 2000; Lee et al., 2000; Gomes et al., 2004; Chicas et al., 2007; Varón y Sarria, 2007). Así mismo, en el cultivo de la caña de azúcar, el síndrome de la hoja amarilla está asociado a un Luteovirus, un fitoplasma 16SrIII en África (Arocha y Jones, 2008), y un fitoplasma del grupo 16SrXII en India (Gaur et al., 2008), los cuales ocurren naturalmente y causan efectos deletéreos sinérgicos sobre la planta afectada.

Este tipo de situaciones complican el estudio de la naturaleza etiológica de la patología en cuestión, ya que se trata de microorganismos sistémicos y que además no son fáciles de aislar biológica o artificialmente. Aun así, la posibilidad de esclarecer el efecto de cada

uno en el desarrollo de la enfermedad, pasa por la necesidad de realizar las pruebas de patogenicidad.

En este sentido, buscando aportar al conocimiento de la enfermedad de cuero de sapo en yuca y aprovechando los resultados obtenidos por Contaldo et al. (2012), quienes lograron crecer fitoplasmas de diferentes grupos en un medio de cultivo artificial (Phytoplasma in vitro media), y los alcanzados por Betancourth et al. (2014), que trabajando con el mismo medio, aislaron el fitoplasma asociado a cuero de sapo de yuca, se estableció la posibilidad de realizar pruebas de patogenicidad con este microorganismo y determinar si los postulados de Koch se cumplen para este disturbio.

De otra parte, aprovechando la distribución y concentración irregular de fitoplasmas en el floema de la planta (Gundersen y Lee, 1996; Saracco et al., 2006; Galetto y Marzachi, 2010), es posible usar yemas provenientes de plantas enfermas, en las cuales, mediante pruebas moleculares, pueda detectarse el fitoplasma pero no virus, para ser usado como fuente de inóculo y adelantar pruebas de patogenicidad con injertos, como un método biológico alternativo.

Bajo este marco referencial, la presente investigación estuvo orientada a determinar el efecto del fitoplasma 16SrIII-L sobre plantas de yuca, confirmando el papel del microorganismo en el desarrollo de la enfermedad cuero de sapo.

## **3.2 Materiales y métodos**

Se desarrollaron tres pruebas de patogenicidad, una por injertación y dos por inoculación de fitoplasmas crecidos en medio de cultivo artificial.

### **3.2.1 Localización**

Este estudio se realizó durante los años 2013 al 2016 en los laboratorios, invernaderos y casas de malla del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en Palmira, Valle del Cauca, a 3° 50' N y 76° 35', a 980 m.s.n.m con una precipitación anual de 1100 mm, HR del 78% y temperatura promedio de 24,5 °C.

### 3.2.2 Fuente de inóculo (inoculación por injerto)

En la estación experimental de CIAT en Santander de Quilichao (Cauca), ubicada a 3° 06" N y 76° 31" O, y 990 msnm, con precipitación anual de 900 mm y temperatura de 24°C, en un cultivo de yuca de la variedad "Parroquiana", de aproximadamente 7 meses de edad, se seleccionaron plantas enfermas con cuero de sapo, en un grado de severidad cuatro, según escala desarrollada en Patología de yuca (Alvarez et al., 2009). A partir de éstas, se tomaron estacas que fueron transportadas a CIAT Palmira. Las varas se cortaron en trozos con una yema y posteriormente se sembraron en bandejas de germinación con arena de río previamente esterilizada (autoclavada a 115 °C durante 1 hora) y se mantuvieron con riego diario hasta su enraizamiento, luego se trasladaron en materos de 4 kg de capacidad con suelo esterilizado con vapor de agua, figura (3-1).

**Figura 3-1.** Fuente de inóculo



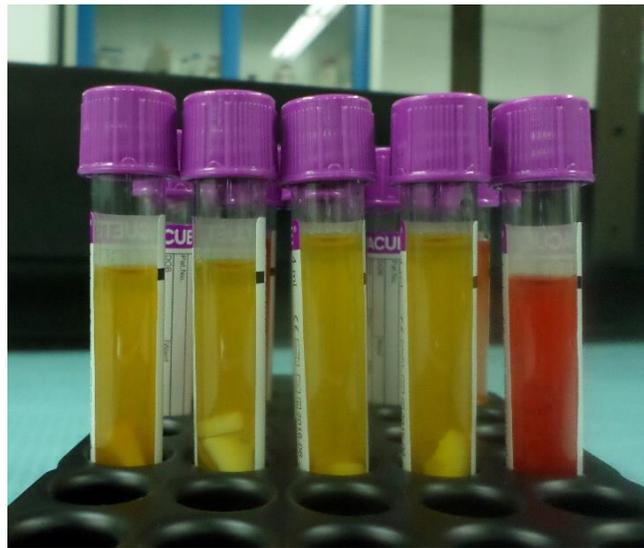
A. plántula procedente de una yema infectada por fitoplasma 16SrIII-L. B. Plantas usadas como inóculo para pruebas de injertación.

Las plantas así obtenidas se sometieron al esquema de detección de fitoplasmas, cuando tenían dos pares de hojas desarrolladas y se descartaron las que no fueron positivas. Luego se sometieron a detección de virus, con el objetivo de eliminar las positivas para estos patógenos y finalmente dejar aquellas donde la detección fue positiva solo para fitoplasmas como se describe más adelante.

### 3.2.3 Fuente de inóculo (fitoplasma crecido en medio PivL y PivS)

El inóculo fue obtenido a partir del aislamiento de fitoplasmas de tejido de raíz de yuca variedad Parroquiiana, afectada por cuero de sapo, figura (3-2). Siguiendo la metodología desarrollada por Contaldo et al. (2012) y con las adaptaciones hechas durante el desarrollo del trabajo (Betancourth et al., 2014) y que se describió en detalle en el capítulo uno de este documento. El inóculo fue sometido a pruebas de PCR anidado para determinar la presencia del fitoplasma como se indica más adelante. El crecimiento del microorganismo se evidenció en el cambio de color del medio de cultivo, puesto que tiene un indicador de pH (rojo fenol) que vira de rojo a amarillo, por efecto de la acidificación del medio por actividad de la bacteria.

**Figura 3-2.** Inóculo de fitoplasmas 16SrIII-L crecido en medio de cultivo PivL a partir de raíces de plantas sintomáticas



A la izquierda cuatro tubos con crecimiento de fitoplasmas y un quinto sin cambio de color con tejido procedente de plantas in vitro de la variedad SM 909-25 (control)

El inóculo del medio sólido se obtuvo a partir de colonias de fitoplasmas crecidas en medio de cultivo PivS, las cuales fueron lavadas con medio de cultivo PivL y transferidas a tubos Vacuette, figura (3-3). Como en los casos anteriores, se determinó la presencia de

fitoplasmas en el inóculo mediante pruebas de PCR anidado. Obtenido, removiendo colonias a partir de un lavado con medio PivL.

**Figura 3-3.** Inóculo de fitoplasmas 16SrIII-L crecido en medio de cultivo PivS a partir de raíces de plantas sintomáticas



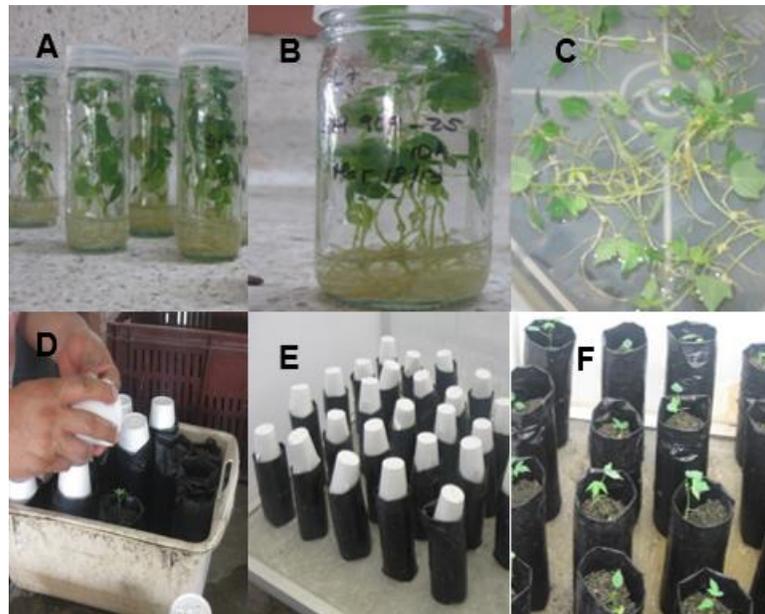
Remoción de colonias mediante lavado con medio de cultivo PivL

### 3.2.4 Material vegetal para pruebas de inoculación

Para las dos primeras pruebas de inoculación, se usaron plantas de yuca in vitro de la variedad SM 909-25 certificadas (sin presencia del fitoplasma 16SrIII-L) y de virus. Este genotipo fue seleccionado por su característica susceptibilidad a la enfermedad de cuero de sapo, la cual fue registrada en trabajos previos en patología de yuca (Álvarez et al., 2009). El endurecimiento de las plantas se realizó en un sustrato que contenía una mezcla de arena y suelo en una proporción 1:1. Figura (3-4).

Cuando las plantas cumplieron un mes de endurecimiento se realizaron pruebas moleculares de PCR en Tiempo Real según la metodología descrita por Álvarez y Pardo (2013) para certificar que se encontraban libres de Fitoplasma 16SrIII-L y las diferentes pruebas de RT-PCR para virus, como se describe más adelante.

**Figura 3-4.** Material vegetal para pruebas de patogenicidad



A.B. Plantas *in vitro* de genotipo SM 909-25 en medio de enraizamiento antes del trasplante. C. Lavado de raíces de plantas antes de ser transferidas al sustrato de endurecimiento. D. Siembra de plantas en sustrato suelo/arena para endurecimiento. E. Cobertura de plantas con vasos de polipropileno para mantener humedad y evitar deshidratación. F. Plantas endurecidas

Para la tercera prueba de patogenicidad se usaron 64 genotipos de yuca, procedentes de cultivo *in vitro* y certificados por el banco de germoplasma de CIAT como libres de virus y fitoplasmas, figura (3-5).

**Figura 3-5.** Material vegetal para tercera prueba de patogenicidad



Plantas *in vitro* de 64 genotipos de yuca

Los genotipos se listan a continuación: Bol 7, CM 681, BRA 8481, PER 323, BRA 1222, COL 1399, MEX 69, COL 1116, BRA 1152, BRA 155, PER 326, ARG 26, PER 534, BRA 215, ARG 4, ARG 1, ARG 28, PER 1999, IND 57, COL 1347, PER 334, PER 355, VEN 196, CM 5306, BRA 428, BRA 403, COL 1580, BRA 990, BRA 690, ARG 96, BRA 361, MAL 17, CUB 30, COL 1553, BRA 184, VEN 284, COL 1084, CM 1299, CM 2952, COL 896, ARG 86, BRA 420, BRA 712, ARG 41, BRA 969, BRA 714, COL 313, IND 117, BRA 685, TAI 22, BRA 1265, PAR 104, ARG 39, COL 209, BRA 915, COL 1, CM 849, BRA 175, BRA 151, GUA 73, SM 1940, BRA 1357, COL 492, BRA 86.

Haciendo uso de las bases de datos de las evaluaciones realizadas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, referentes a la reacción de los genotipos a la enfermedad de cuero de sapo, se pudo confrontar con los genotipos evaluados en esta investigación. El análisis de la información permitió determinar que solo dos genotipos habían sido evaluados anteriormente, y corresponden a: CUB 30 y PER 534, los cuales no se han reportado como susceptibles a la enfermedad.

### **3.2.5 Pruebas de Patogenicidad**

Para valorar el efecto del fitoplasma en las plantas de yuca, se realizaron tres pruebas de patogenicidad, con diferente fuente de inóculo, como se describe a continuación.

### **3.2.6 Inoculación por injerto**

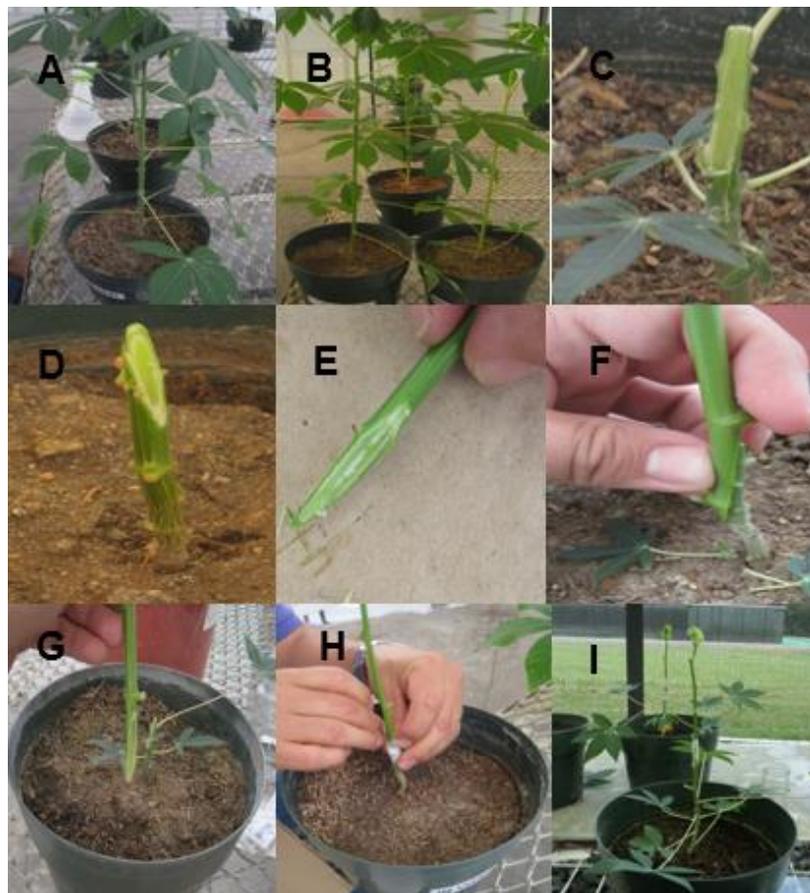
La primera prueba de patogenicidad se realizó mediante inoculación por injerto. Para ello, las plantas de yuca SM909-25 procedentes de cultivo in vitro, libres de virus y fitoplasmas fueron usadas como patrón y las plantas obtenidas de yemas individuales, provenientes de estacas de campo infectadas con fitoplasma, se usaron como copas. Esta disposición se hizo con el objetivo de observar los síntomas en la raíz de la planta inoculada.

El proceso de injertación se hizo seleccionando plantas de un diámetro de tallo similar. Se cortó el tallo del patrón en bisel a una altura entre 15 a 20 cm, cuidando dejar una yema en ese punto. La copa tenía la misma longitud y de forma análoga se procedió hacer el corte dejando una yema, se retiraron las hojas y luego se juntaron con el patrón y se

amarraron con parafilm hasta que hubo cicatrización y brotación de nuevas hojas, figura (3-6).

Dos meses después de injertadas, se tomaron muestras de hojas nuevas del patrón, las cuales se sometieron a detecciones moleculares con PCR en tiempo real, para confirmar la transmisión del fitoplasma. Al momento de la cosecha se procedió de igual manera con las plantas sintomáticas, tomando muestras de raíces.

**Figura 3-6.** Proceso de inoculación por injertación



A. Plantas de yuca SM 909-25 listas para injertar con un grosor de 0.7 cm. B. Plantas del genotipo local "Parroquiana" utilizadas como fuente de inóculo, con detección positiva al fitoplasma 16SrIII-L C. D. Corte en bisel de planta de SM 909-25 utilizada como patrón. E. Corte en bisel de la planta fuente de inóculo F. G. H. Injerto de copa (Inóculo) Parroquiana/SM 909-25 (Patrón). I. Injerto con nuevos brotes.

Transcurrido el tiempo de prendimiento del injerto, las plantas fueron sembradas en suelo dentro de una casa de malla y mantenidas en esta condición hasta la cosecha.

Durante su ciclo de vida recibieron dos fertilizaciones, una al momento de la siembra con 80 g de fosfato diamónico y otra después de dos meses con 120 g de fertilizante completo 15-15-15. Además, se realizaron aplicaciones semanales de acaricidas e insecticidas para evitar daños por ácaros y posibles transmisiones de patógenos por potenciales vectores. Igual número de plantas de la misma variedad sin inoculación por injerto fueron sembradas como control negativo de la prueba y recibieron los mismos tratamientos.

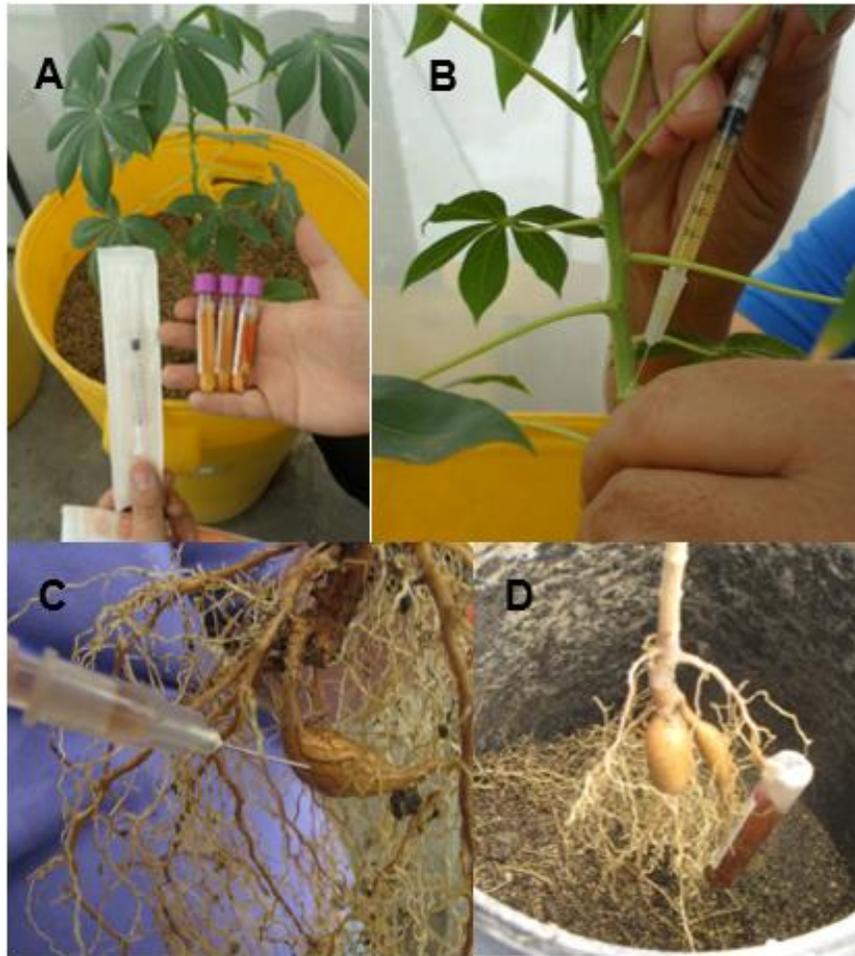
### **3.2.7 Inoculación con medio PivL y PivS**

Para el desarrollo de la segunda prueba de patogenicidad se emplearon tres métodos de inoculación: el primero inyectando 1 mL del inóculo crecido en medio PivL en el tallo, específicamente en el punto de inserción del peciolo en el tallo; el inóculo se distribuyó en diferentes puntos y a diferentes alturas.

La segunda forma fue inyectando 1 mL directamente a la primera raíz de almacenamiento, realizando varias punciones y la tercera introduciendo varias raicillas directamente en el tubo con inóculo. Figura (3-7). Se inocularon 60 plantas por cada método.

El control negativo consistió en la inoculación de medio PivL tal como viene de fábrica, y se usaron 20 plantas por cada método. Una vez inoculadas las plantas se sembraron en suelo, bajo condiciones de invernadero con malla a prueba de insectos.

**Figura 3-7.** Métodos de inoculación con fitoplasma 16SrIII-L crecido en medio de cultivo PivL



A. Fuente de inóculo. B. inoculación por inyección en el tallo. B. inoculación por inyección en raíz de almacenamiento. D. Canalización de raíces en el tubo con inóculo.

La tercera prueba de patogenicidad se realizó inyectando 1 mL del medio sólido juagado en PivL, en el tallo de cada planta. Se inocularon 66 plantas correspondientes al mismo número de genotipos figura (3-8). El control negativo consistió en la aplicación de un lavado de medio PivS sin crecimiento de colonias en una planta de cada variedad. Al igual que en los casos anteriores, las plantas fueron sembradas en suelo, bajo condiciones de invernadero con malla anti-insectos hasta su cosecha.

**Figura 3-8.** Inoculación con fitoplasma crecido en medio PivS, tercera prueba de patogenicidad



Inyección en el tallo, en el punto de inserción del peciolo

### 3.2.8 Reaislamiento

Para completar los postulados de Koch, al momento de la cosecha se tomaron muestras de raíces de aquellas plantas sintomáticas, para hacer pruebas de aislamiento de fitoplasmas en el medio de cultivo PivL y PivS y comprobar la presencia del microorganismo mediante pruebas moleculares. De las plantas inoculadas con medio original, usadas como control, también se tomaron muestras para realizar el mismo procedimiento.

### 3.2.9 Pruebas moleculares

Se hicieron pruebas de PCR, PCR anidado, PCR en tiempo real, y secuenciación para detectar fitoplasmas y pruebas de RTPCR y PCR en tiempo real para detección de virus.

Las pruebas moleculares se realizaron antes y después de las inoculaciones, en principio para certificar la presencia de fitoplasmas y ausencia de virus en el inóculo, además la ausencia de los dos tipos de patógenos en las plantas a inocular y al final de la prueba de patogenicidad, para verificar la transmisión del fitoplasma en las plantas inoculadas y la ausencia de virus en las mismas. Este esquema era necesario para verificar el efecto de la infección individual del fitoplasma en las plantas inoculadas.

### **3.2.10 Extracción de ADN total de plantas**

Se usaron muestras de hojas de las plantas de yuca usadas como inóculo y raíces de las plantas inoculadas al momento de la cosecha, siguiendo el método de Prince *et al.* (1993), tomando 0,4 g de tejido en cada caso, el cual se congeló y maceró en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo estériles. Después del lavado final en etanol, el ácido nucleico extraído se suspendió en 30 a 50  $\mu\text{L}$  de solución tampón Tris-EDTA (10 mM Tris- HCl, pH 8.0, y 1 mM EDTA, pH 8.0) y se almacenó a 4°C hasta su uso (Álvarez *et al.*, 2009). La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó mediante espectrofotometría (Thermo Scientific Nanodrop 2000c espectrofotómetro) a una absorbancia de 260 nm.

### **3.2.11 Muestras de medio líquido y sólido (colonias)**

De los tubos positivos (cambio de color) se pasaron alícuotas de 1000  $\mu\text{L}$  a tubos eppendorf y se centrifugaron a 16.000 rpm durante 30 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 20  $\mu\text{L}$  de agua. Alícuotas de 2  $\mu\text{L}$  fueron usadas para las pruebas de PCR y qPCR. De igual manera se procedió para la obtención de muestras de los tubos controles sin inocular e inoculados con tejido de plantas *in vitro*. Para el caso de colonias, estas fueron tomadas directamente del medio en forma individual y llevadas al tubo de reacción de PCR, los controles, correspondientes a cajas sin colonias, también se pincharon con puntas de 10  $\mu\text{L}$  para ser procesadas de igual manera.

### **3.2.12 Extracción de ARN (virus)**

Se siguió el protocolo propuesto por Carvajal *et al.* (2014) utilizando tejido de hojas de plantas infectadas.

Se procesaron de 200 a 400 mg de tejido, usando el método de CTAB con protocolo estándar. El RNA total fue incubado con 1U de DNasa (invitrogen) por 1 h a 37°C seguida por precipitación en Cloruro de Litio (LiCl). La calidad del ARN se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con SYBR safe (invitrogen). La concentración de ARN de alto peso molecular se determinó mediante un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260/280 nm (Thermo Scientific Nanodrop 2000c). El RNA de bajo peso molecular se obtuvo por precipitación de Cloruro de litio y analizado por gel de electroforesis al 4%.

### **3.2.13 Detección por PCR (Fitoplasma)**

Para todas las pruebas de PCR directa y anidadas, se preparó una mezcla de 12,5 µL de go taq master mix 2X Promega, 0,5 µL de cada cebador, 9,5 µL de agua y 2 µL de cada muestra de ADN, o de medio líquido PivL, para un volumen final de 25 µL. Los cebadores y perfiles se describen a continuación.

La PCR 1, se hizo con los cebadores universales P1/Tint (Smart *et al.*, 1996), los cuales amplifican un fragmento de 1600 pares de bases, ubicado en la región 16S rDNA y parte del 23S rDNA y para la segunda PCR, los cebadores R16F2N/ R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1996) que generan un amplicón de 1200 pares de bases, correspondiente a una región parcial del 16S.

El perfil de amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación 50°C durante 2 minutos y extensión a 72 °C por 3 minutos, seguido de una extensión final a la misma temperatura por 10 minutos.

Para la segunda PCR se tomó 1 µL del amplificado y se diluyó en 29 µL de agua, utilizando 2 µL de la dilución para la amplificación con los cebadores universales R16F2N/ R16R2 y las mismas condiciones de la primera PCR.

La PCR anidada específica para fitoplasmas del grupo III, se realizó con 1 µL del amplificado de PCR 2, y se diluyó en 39 µL de agua. Posteriormente se utilizaron 2 µL de la dilución con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 (Lee *et al.*, 1994), que amplifican un

fragmento de 800 pb del gen 16Sr. El perfil de amplificación únicamente cambió en la primera desnaturalización que fue de 2 min a 94°C.

### **3.2.14 Electroforesis**

Se usaron 5 µL del producto de amplificación para cargarlos en un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe (invitrogen) 4µL/200cc, y se corrieron en electroforesis a 110 V. Al finalizar la corrida se verificó con transiluminador y se hizo registro fotográfico (Sambrook *et al.*, 1989). Como referencia del peso molecular se utilizó el marcador Hiper ladder II (bioline) 100 lanes.

### **3.2.15 Secuenciación de ADN**

Los productos de amplificación de la segunda PCR anidada, se limpiaron utilizando el método de precipitación de ADN con Polietilen glicol y etanol (Ziv y Fuentes, 2007), y se secuenciaron en Iowa State University. Las secuencias obtenidas se compararon por máximo apareamiento y porcentajes más altos de homología con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1990).

### **3.2.16 RT-PCR**

Se utilizó la técnica de RT-PCR de acuerdo al protocolo descrito por Carvajal *et al.* (2014). Entre 2 y 4 µg de RNA y 200 a 400 ng de random primers fueron desnaturalizados a 65°C por 5 min, seguido por un minuto en hielo. La primera cadena de cDNA se sintetizó a 37 °C por 1,5 horas después de adicionar buffer 5x first Strand, DTT 0,1 M, dNTPs 10mM y 200 U de MMLV transcriptasa reversa (invitrogen) a un volumen final de 15µL.

Una vez obtenido el cDNA se realizaron pruebas de PCR con cebadores específicos para los virus referenciados en el Tabla 1.

**Tabla 3-1.** Cebadores específicos para detección de virus asociados a cuero de sapo en yuca

<b>Virus</b>	<b>Cebador</b>	<b>Autor</b>
Cassava frogskin associated virus (Reoviridae)	F110 – R1067	Calvert <i>et al.</i> 2008
Cassava New Alphaflexivirus (CsNAV) Potexvirus	F4-R5	Carvajal <i>et al.</i> (2014)
Cassava Polero like virus (CsPLV) Luteovirus	F2-R3	Carvajal <i>et al.</i> (2014)
Cassava Torrado like virus (CsTLV) Torradovirus Segmentos RNA1 y RNA2.	PF8 – PR7 PF4-PR3	Carvajal <i>et al.</i> (2014)

Los perfiles de amplificación fueron los mismos descritos por Carvajal *et al.* (2014).

### **3.2.17 PCR en tiempo real (Fitoplasma y Reovirus).**

La PCR en tiempo real se hizo para la detección de virus, con la metodología de Pardo (2013) y fitoplasmas, siguiendo la metodología descrita por Álvarez y Pardo (2013).

En el caso de fitoplasma, la sonda y cebadores están en el gen 16Sr dentro de una región de 1400 pares de bases que codifica para proteínas de la subunidad 16S. Esta región es altamente conservada, presenta polimorfismos entre grupos de fitoplasmas y tiene dos copias en el genoma de cada célula bacteriana (Torres *et al.*, 2005), logrando mayor sensibilidad. La sonda se encuentra en la posición 469 y los cebadores en 416 (sentido) y 492 (antisentido), logrando amplificar un fragmento de 72 pares de bases. Se trabajó a una concentración de 200 nM para sonda y cebadores.

La sonda y cebadores para detección del Reovirus asociado con la enfermedad del cuero de sapo, identifican el segmento ARN 4 en el cual está ubicado el gen de la polimerasa.

## **3.3 Resultados y Discusión**

### **3.3.1 Fuente de inóculo (inoculación por injerto)**

Se obtuvieron 80 plantas de yuca a partir de yemas individuales que procedían de plantas afectadas por cuero de sapo, en las cuales, las pruebas moleculares de qPCR indicaron

que 45 de ellas, correspondientes al 56%, resultaron infectadas con fitoplasmas. Así mismo, pruebas de qPCR indicaron que 27 de las 45 plantas presentaron reovirus, y las pruebas de RTPCR mostraron que nueve estaban infectadas con torradovirus y dos con potexvirus (Tabla 2). En conjunto se encontraron 24 plantas con reovirus y fitoplasma, 2 con reovirus, fitoplasma y torradovirus, 7 con fitoplasma y torradovirus y 2 con potexvirus y fitoplasma. Después de detectar los diferentes patógenos, se descartaron las plantas con infecciones mixtas de virus y fitoplasmas y al final se dejaron 10 plantas con aparente infección individual de fitoplasma.

**Tabla 3-2.** Detección molecular de fitoplasmas del grupo 16SrIII y cuatro diferentes virus en 80 plantas de yuca, procedentes de yemas individuales

FITOPLASMAS		REOVIRUS	TORRADO-VIRUS	POTEX-VIRUS	LUTEO – VIRUS
PCR Anidado	qPCR	RTPCR Qpcr	RTPCR	RTPCR	RTPCR
30	45	26	9	2	0

Algunas interacciones de virus y fitoplasmas afectando diferentes especies de plantas han sido documentadas, por ejemplo, en maíz (Bedendo *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2004; Chicas *et al.*, 2007; Varón y Sarria, 2007), en caña de azúcar (Arocha y Jones, 2008; Gaur *et al.*, 2008), ocasionando daños severos por su efecto sinérgico. En yuca específicamente, también se han detectado virus y fitoplasmas (De Souza *et al.*, 2014) en Brasil y (Pardo, 2013) en Colombia, el cual registró un fenómeno de hipovirulencia entre un Reovirus y el fitoplasma 16SrIII-L asociados a cuero de sapo.

Por su parte, Carvajal *et al.* (2014), estudiando infecciones virales individuales y en mezcla en el cultivo de yuca, mencionan que son comunes las detecciones de más de un tipo de virus en una misma planta y que pueden estar asociados a diferentes tipos de síntomas foliares y en raíces.

En este sentido, resulta de especial interés para futuros trabajos, explorar los efectos de las interacciones entre los diferentes virus y el fitoplasma en yuca, las cuales pueden ser sinérgicas o antagónicas y su entendimiento puede aportar para generar estrategias de control en la enfermedad de cuero de sapo.

Por otra parte, las secuencias analizadas de los amplicones de aproximadamente 800 pares de bases, obtenidos en las pruebas de PCR anidado (R16 (III) F2/R16 (III) R1) indicaron un 99% de homología con las previamente reportadas para Cassava frogskin disease phytoplasma en Gen Bank y se registraron aquellas procedentes de las plantas seleccionadas como fuente de inóculo para pruebas de transmisión, con la siguiente codificación KF418785, KF418786, KF581157, KF418787, KF418788, KF418789, KF581153, KF581156 y KF581154, asignada por el National Center for Biotechnology Information:

La metodología permitió obtener plantas con infección individual de fitoplasmas, teniendo como principio la distribución errática del patógeno en los tejidos cribosos de la planta como lo han registrado otros autores (Berges *et al.*, 2000; Gundersen y Lee, 1996; Saracco *et al.*, 2006; Galetto y Marzachi, 2010).

De otra parte, se pudo corroborar la mayor sensibilidad del método de PCR en tiempo real en comparación con la PCR convencional para detección de fitoplasmas, tal como lo manifestó Pardo (2013). Otros autores han mencionado además la dificultad de detectar fitoplasmas a través del método convencional, no solo por la ubicación del microorganismo en la planta, sino por su concentración en la muestra de ADN obtenida a partir de ella (Firrao *et al.*, 2007).

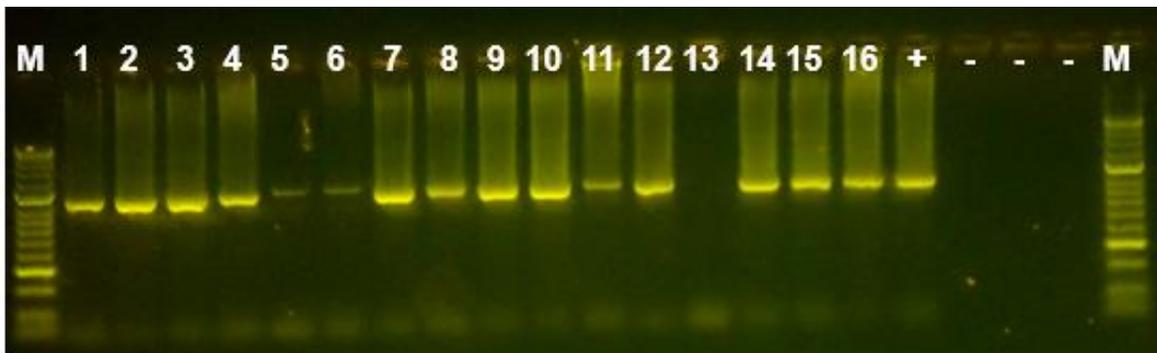
En el caso particular del fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca, éste se ha detectado con mayor frecuencia en raíces que en las hojas (Álvarez *et al.*, 2009; Pardo, 2013), lo que puede explicar que su detección en las plantas procedentes de una yema, haya sido del 56%, aunque todas las estacas procedían de las mismas plantas enfermas. Otros autores también han afirmado que, en algunas patologías, la presencia de fitoplasmas está en mayor concentración en raíces que en el resto de la planta (Christensen *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2013).

### **3.3.2 Fuente de inóculo (Fitoplasma crecido en medio PivL y PivS)**

Los resultados fueron consistentes y similares a los presentados en el capítulo 1. El aislamiento del fitoplasma a partir de las raíces de plantas enfermas se evidenció con el

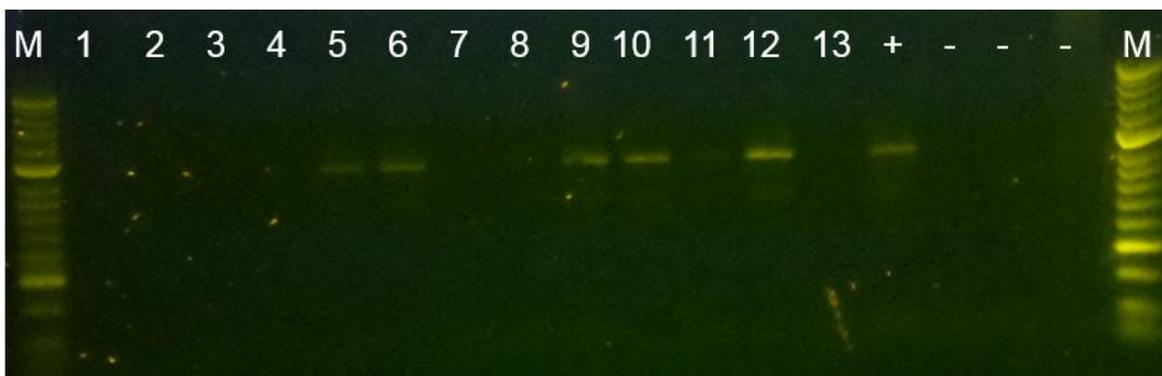
cambio de color de rojo a amarillo del medio PivL, la presencia de colonias en medio PivS y la comprobación de la presencia del microorganismo, a través de las pruebas de PCR con cebadores específicos para grupo III, figuras (3-9 y 3-10).

**Figura 3-9.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de cultivo de fitoplasmas 16 SrIII-L en medio PivL (Fuente de inóculo)



Fragmento de 800 pb. Carriles 1-16: Centrifugado de medio líquido PivL sembrado con tejido de raíces de plantas de yuca con síntomas de cuero de sapo, (+): Control positivo (plásmido fitoplasma yuca), (-): Control negativo y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

**Figura 3-10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % de productos de amplificación por PCR con cebadores específicos del grupo III (R16 III F2 – R16 III R1) de cultivo de fitoplasmas 16SrIII-L en medio PivS (Fuente de inóculo)



Fragmento esperado de 800 bp. Carriles 1 a 13: muestras de colonias obtenidas en medio PivS, (+): control positivo, plásmido de cassava frogskin disease phytoplasma, (-): control negativo y (M): marcador de peso molecular 50 bp.

### 3.3.3 Pruebas de Patogenicidad

#### 3.3.3.1 Inoculación por injerto

Se hicieron 10 injertos con las estacas de las plantas infectadas con fitoplasmas sobre plantas sanas de la variedad SM909-25, los cuales tuvieron 80% de prendimiento, puesto que, en dos plantas, la copa murió después de un mes de realizado el injerto. Al cabo de dos meses, tres plantas resultaron positivas a fitoplasmas del grupo 16SrIII-L, al ser examinadas por qPCR, como se muestra en la Tabla 3. En este caso se pudo comprobar que hubo transmisión del microorganismo desde el tejido infectado (copa) hacia el tejido sano (patrón). Los testigos fueron negativos.

Sobre este particular, Jaraush *et al.* (1999), afirman que el éxito de la transmisión de fitoplasmas por injerto depende de la calidad de unión que se logre con el injerto, el tiempo de contacto de los tejidos injertados y de la concentración de fitoplasmas presente en el inóculo.

**Tabla 3-3.** Resultados de transmisión de fitoplasma por injerto de plantas enfermas del genotipo local “Parroquiana” a plantas sanas del genotipo SM 909-25. Detección de fitoplasmas a los dos meses y cosecha

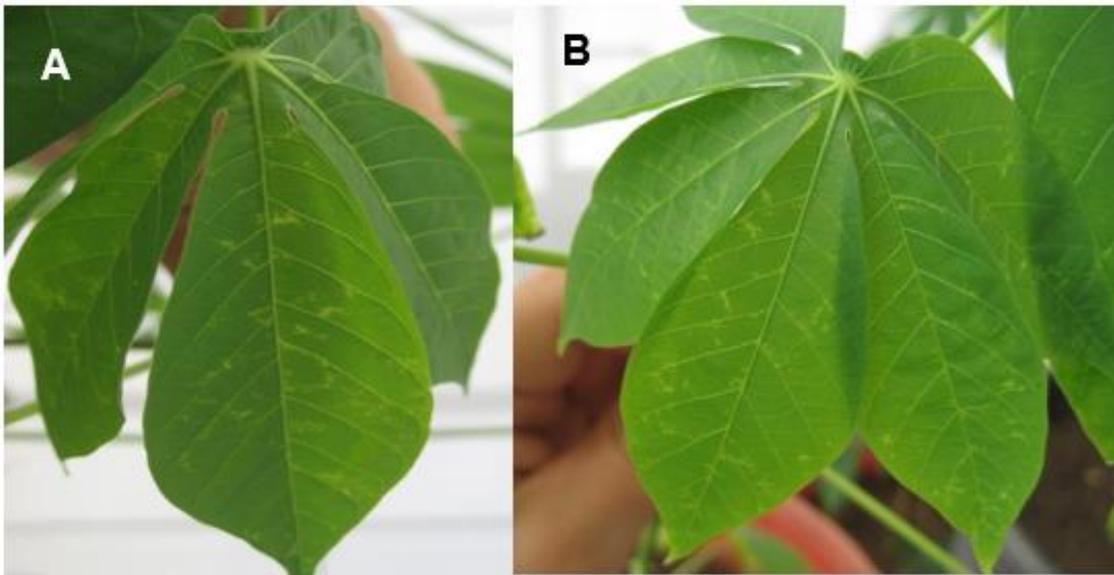
INJERTOS	qPCR (2 meses)	Síntomas follaje	Cosecha PCR (R16 III F2/R16 III R1)	Síntomas raíces
1	+	*	+	*
2	+	*	+	*
3	+	NS	+	*
4	-	NS	+	*
5	-	NS	-	NS
6	-	NS	-	NS
7	-	NS	-	NS
8	-	NS	-	NS
9	-	NS	-	NS
10	-	NS	-	NS

(+): Positivo, (-): negativo, (\*): presencia de síntomas. (NS): sin síntomas.

A los dos meses también, en condiciones de invernadero, dos de las plantas de yuca inoculadas por injerto, y positivas por qPCR a fitoplasmas, presentaban un moteado

clorótico leve, que mostraba un patrón irregular y en forma anillada o semicircular, como se muestra en la figura (11). Las manchas desaparecieron después de algunas semanas. Este tipo de síntoma ya ha sido descrito por Álvarez *et al.* (2009) asociado a plantas enfermas con cuero de sapo, pero los autores manifiestan que no se encuentra con frecuencia, sobre todo en condiciones de campo.

**Figura 3-11.** Síntomas foliares en plantas de yuca de la variedad SM909-25 inoculadas por injerto



A y B. nótese un moteado clorótico anillado en la lámina foliar. Fotos (autor).

El injerto como método de transmisión de fitoplasmas y como una forma de comprobación de la virulencia de estos microorganismos sobre sus hospedantes ha sido usado con éxito en diferentes patosistemas. Por ejemplo, Jarausch *et al.* (1999), examinaron la reacción de genotipos de durazno a los fitoplasmas de proliferación del manzano (Apple proliferation AP) y amarillamiento de frutos Europeos de pepita (European stone fruit yellows ESFY); Wongkaew y Fletcher (2004), transmitieron el fitoplasma causante de hoja blanca en caña de azúcar (Sugar cane white leaf SCWL) a caña y vinca, y, Kison y Seemüller (2001), evaluaron la virulencia de varias cepas del fitoplasma del amarillamiento de frutos de pepita (ESFY) y la susceptibilidad de genotipos de árboles frutales caducifolios.

La manifestación de la sintomatología foliar en patologías causadas por fitoplasmas, se ha explicado desde diferentes aspectos fisiológicos como la reducción de la concentración de pigmentos fotosintéticos como la clorofila y los carotenoides (Bertamini y Nedunchezian, 2001) y de proteínas solubles totales (Musetti et al., 2000, 2005; Bertamini y Nedunchezian, 2001), así como la alteración en el balance hormonal (Maust et al., 2003; Jagoueix- Eveillard et al., 2001), transporte de amino ácidos (Lepka et al., 1999) y la presencia de homólogos de los genes folato y endopeptidasa en el genoma del fitoplasma (Davis et al., 2003), los cuales potencialmente afectan la planta hospedante. Los síntomas foliares son muy comunes en enfermedades asociadas a fitoplasmas y la causa puede además radicar en una modificación en la síntesis de carbohidratos, su transporte y la alteración de la fotosíntesis (Bertamini y Nedunchezian, 2001).

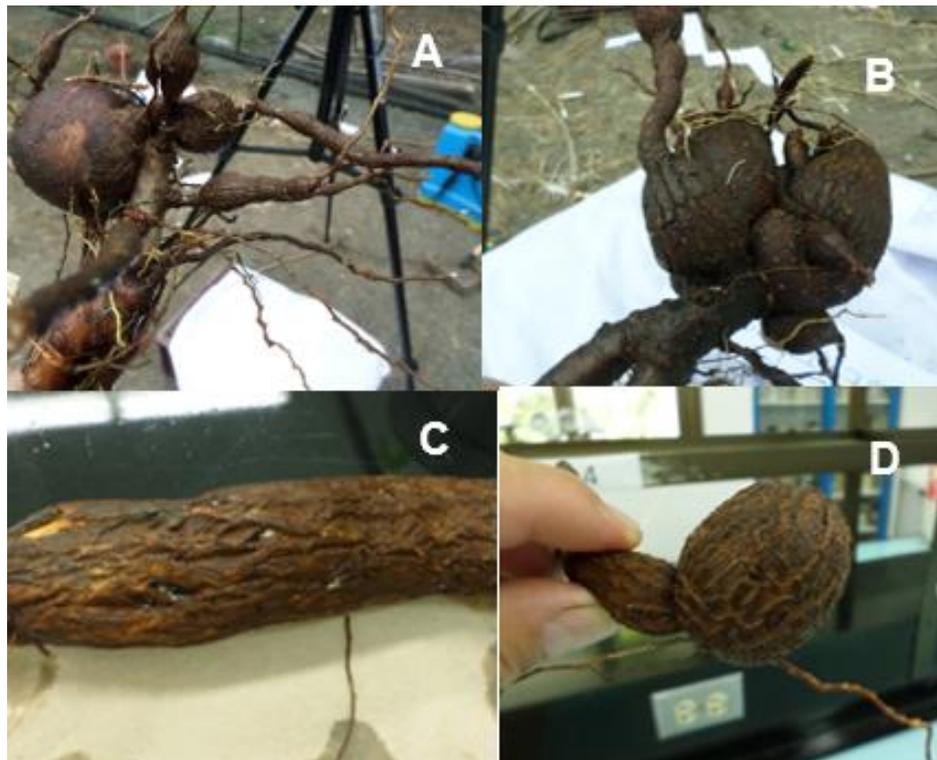
No obstante, la argumentación expuesta, la situación de las plantas de yuca afectadas por cuero de sapo es diferente, pues, salvo los síntomas mencionados anteriormente, no se presentaron disturbios importantes en la parte aérea y por el contrario su apariencia fue saludable y no se distinguieron de plantas no infectadas. Esta particularidad ha contribuido considerablemente a la dispersión de la enfermedad, puesto que permite la selección de estacas de plantas enfermas para ser usadas como semilla del siguiente ciclo de cultivo; sin percatarse de los efectos epidemiológicos graves que conlleva esta decisión (Pineda et al., 1983; Calvert, 1994).

El aspecto asintomático de las plantas cambió al momento de la cosecha, cuando se evaluaron visualmente las raíces y se encontraron cuatro de diez, afectadas por la enfermedad de cuero de sapo, como se ilustra en la figura 3-12. Las plantas enfermas correspondieron a aquellas que resultaron positivas para fitoplasmas en la qPCR y una adicional que no se detectó en esta prueba, pero sí en raíces con PCR específica para grupo III.

Los síntomas desarrollados en las plantas inoculadas por injerto coinciden con los descritos por otros autores para la enfermedad de cuero de sapo (Lozano et al., 1983; Pineda y Lozano, 1981; Pineda et al., 1983; Álvarez et al., 2009; Pardo, 2013) y fueron los mismos observados en campo en las plantas usadas como fuente de inóculo. Los más sobresalientes consistieron en lesiones en forma de fisuras profundas en las raíces, las

cuales cicatrizaron formando los típicos labios y vistas en conjunto se asemejan a una red. Malformaciones y deficiencias en el llenado de las raíces fueron evidentes, especialmente constricciones que formaron tubérculos redondos, pequeños y algunos en forma de látigos, todos con epidermis gruesas, ásperas y muy adheridas.

**Figura 3-12.** Síntomas de enfermedad cuero de sapo en raíces de yuca variedad SM909-25 inoculadas por injerto



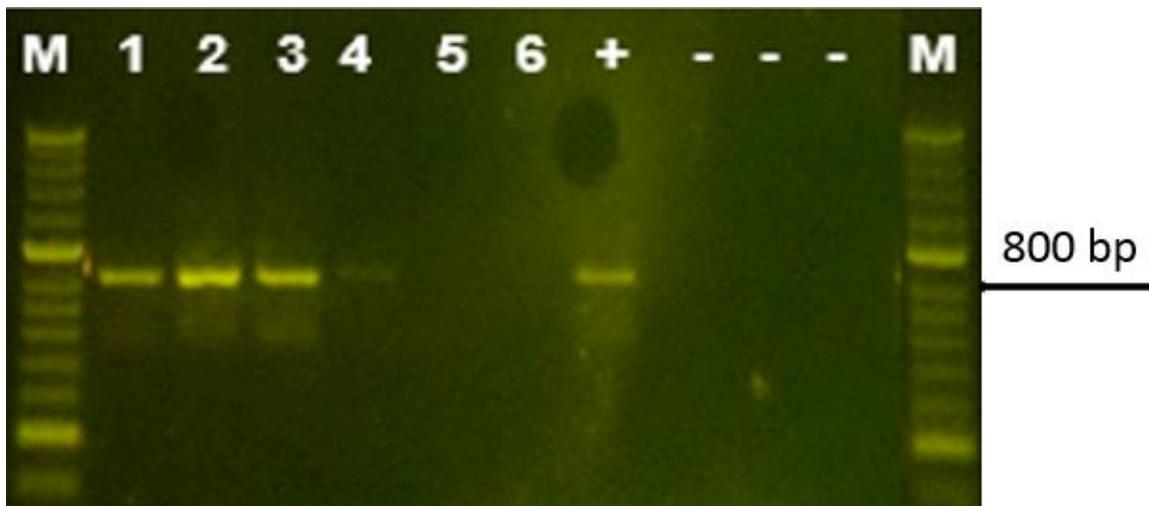
A y B. panorama general de la raíz enferma con malformaciones en su desarrollo, presencia de látigos, tubérculos pequeños y deficiente llenado., C. presencia de fisuras en forma de labios y D. coalescencia de lesiones en la epidermis que dan aspecto de red. Fotos: autor.

La sintomatología causada por fitoplasmas en plantas, sugiere interferencia con los mecanismos de señalización y metabolismo de hormonas. Estudios fisiológicos dan cuenta de la pérdida de los niveles de almidón en los órganos de reserva como raíces y acumulación en las hojas. Además, experimentos de marcado radiactivo muestran las

deficiencias en el transporte de fotosintetizados desde la parte aérea a las raíces y desde tejidos maduros a hojas jóvenes (Dickinson et al., 2013).

Luego de realizar las pruebas moleculares de PCR anidado de muestras de raíces sintomáticas de las plantas de yuca inoculadas por injerto, se determinó nuevamente la presencia de fitoplasmas, al amplificar el fragmento de 800 pares de bases, correspondiente a los cebadores específicos para grupo III, figura (3-13) y sus secuencias al 99% de homología con las ya reportadas en el banco de genes para Cassava frogskin disease phytoplasma. Estos resultados comprueban la asociación permanente del microorganismo con tejidos sintomáticos, la transmisión del patógeno desde una planta enferma a una sana y la capacidad del fitoplasma para causar síntomas de cuero de sapo en infección individual. A su vez las pruebas de RTPCR no mostraron presencia de ninguno de los virus en las cuatro plantas enfermas.

**Figura 3-13.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de ADN de raíces de yuca inoculadas por injerto

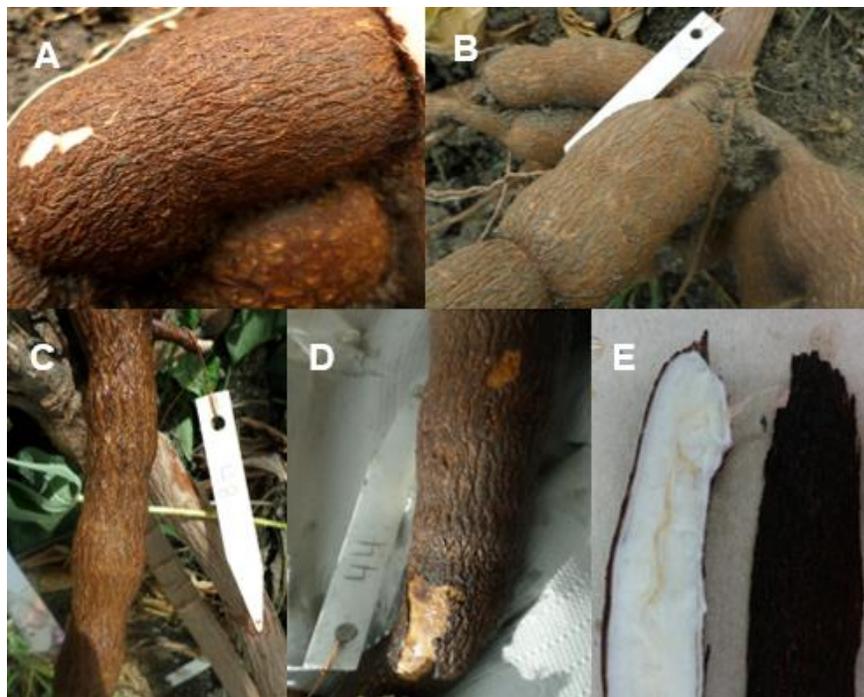


Fragmento de 800 pb. Carriles 1-4: muestras de ADN de raíces con síntomas de cuero de sapo, carriles 5 y 6: ADN de raíces de plantas sanas no inoculadas, (+): Control positivo (plásmido fitoplasma yuca), (-): Control negativo y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

### 3.3.3.2 Inoculación con medio PivL

En la cosecha del experimento de pruebas de patogenicidad con fitoplasmas crecidos en medio PivL, se logró verificar que el 2,8%, correspondiente a cinco plantas de 180 inoculadas, presentaron síntomas característicos de la enfermedad de cuero de sapo en sus raíces (figura 3-14). Las plantas sintomáticas fueron inoculadas: dos por inyección en el tallo, dos por inyección en la raíz y una por introducción de las raíces en el tubo con inóculo. Esta es la primera vez que se logra la recuperación de síntomas de una patología vegetal a partir de la inoculación artificial con fitoplasmas cultivados en medio libre de células, lo cual comprueba la capacidad del microorganismo de afectar las plantas de yuca y su papel en el desarrollo de la enfermedad, como lo habían planteado otros investigadores (Álvarez et al., 2003; Álvarez et al., 2006; Álvarez et al., 2009; Álvarez et al., 2010). Ninguno de los controles presentó síntomas de la enfermedad.

**Figura 3-14.** Síntomas de enfermedad cuero de sapo en raíces de yuca variedad SM909-25 inoculadas con fitoplasmas 16SrIII-L crecidos en medio PivL

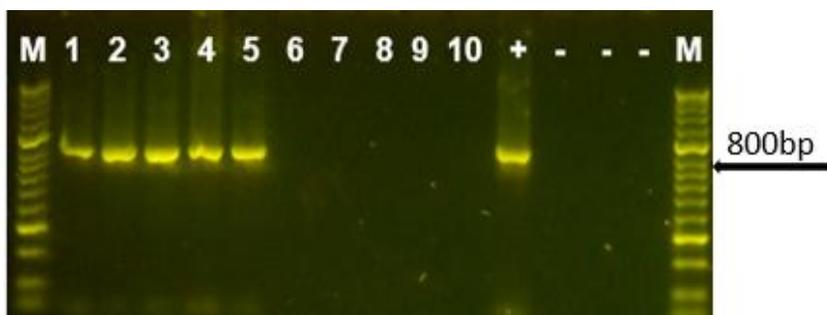


A, B, C y D. síntomas externos en raíces con cuero de sapo, presencia de lesiones profundas y engrosamiento de la epidermis con la típica forma de labios, E. Síntomas internos en la raíz, nótese claramente el necrosamiento del cilindro vascular. Fotos: autor.

Los resultados de la investigación, rompen el paradigma de la imposibilidad de cultivar fitoplasmas fuera del ambiente intracelular del hospedante, sustentando durante medio siglo por diferentes autores (Hampton et al., 1969; McCoy, 1979; Lee, 1986; Lee et al., 2000; Conci, 2009; Kube et al., 2012; Davis et al., 2015) y corrobora los pocos casos exitosos descritos y documentados en la literatura científica mundial (Fudl Allah et al., (1972; 1973); Ghosh et al, (1975); Skripal y Malinovskaya (1984) y Skripal et al. (1984), Poghosyan y Lebsky (2004), quienes afirmaron la posibilidad de crecerlos artificialmente, y especialmente coinciden con los resultados publicados por Contaldo et al., 2012, que fueron tomados como base para el desarrollo del presente estudio.

A pesar del bajo porcentaje de incidencia obtenido, la virulencia del fitoplasma 16SrIII-L se pudo verificar biológicamente con la transmisión del microorganismo a plantas de yuca sanas, y certificadas como libres de patógenos. Adicionalmente el desarrollo de los mismos síntomas de las plantas de campo que sirvieron como fuente de inóculo para el aislamiento inicial. Los resultados fueron confirmados por las pruebas moleculares hechas a las plantas sintomáticas, las cuales revelaron la amplificación de un fragmento de 800 pares de bases, con cebadores específicos para fitoplasmas del grupo III y la ausencia de los virus reportados por Carvajal et al. (2014), asociados a la patología de cuero de sapo, además la ausencia del fitoplasma en las plantas usadas como controles. Figura (3-15).

**Figura 3-15.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de ADN de plantas de yuca inoculadas con fitoplasmas en PivL en pruebas de patogenicidad

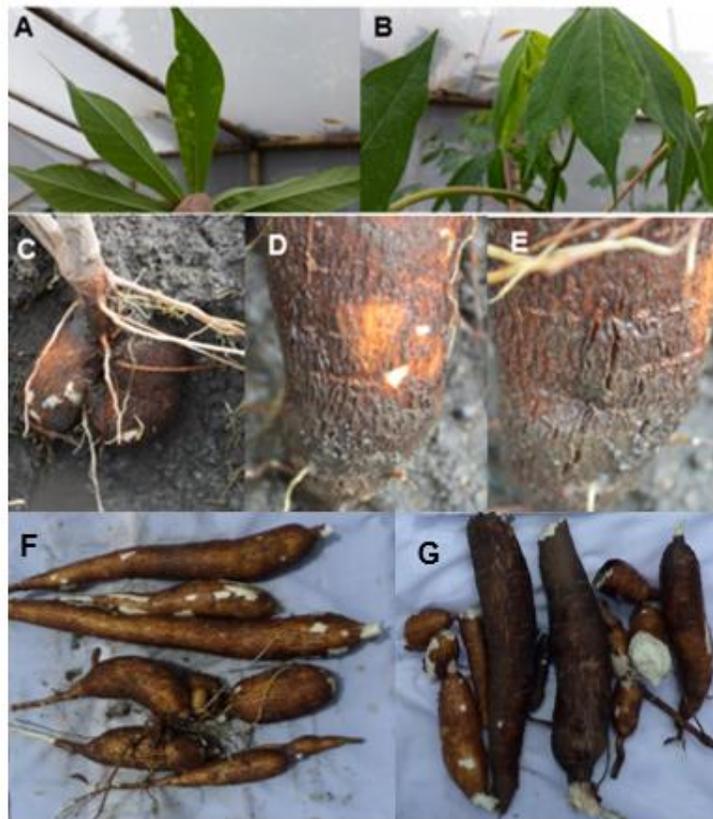


Fragmento de 800 pb. Carriles 1-5: muestras de ADN de raíces de plantas inoculadas con fitoplasmas, carriles 6 - 10: ADN de raíces de plantas sanas no inoculadas, (+): Control positivo (plásmido fitoplasma yuca), (-): Control negativo y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

### 3.3.3.3. Inoculación con medio PivS

En la cosecha del experimento de pruebas de patogenicidad con fitoplasmas crecidos en medio PivS, se recuperaron síntomas en cuatro genotipos: CM 2952, Col 1, Col 896 y Bra 184, que corresponden al 6,3 % del total evaluado, como en las anteriores pruebas, los síntomas fueron característicos de la enfermedad de cuero de sapo (figura 3-16). Se corroboró que es posible evaluar la patogenicidad del microorganismo a partir de la inoculación artificial con fitoplasmas cultivados en medio libre de células. Además, se determinó que la naturaleza de la patología de cuero de sapo es de tipo fitoplasmática.

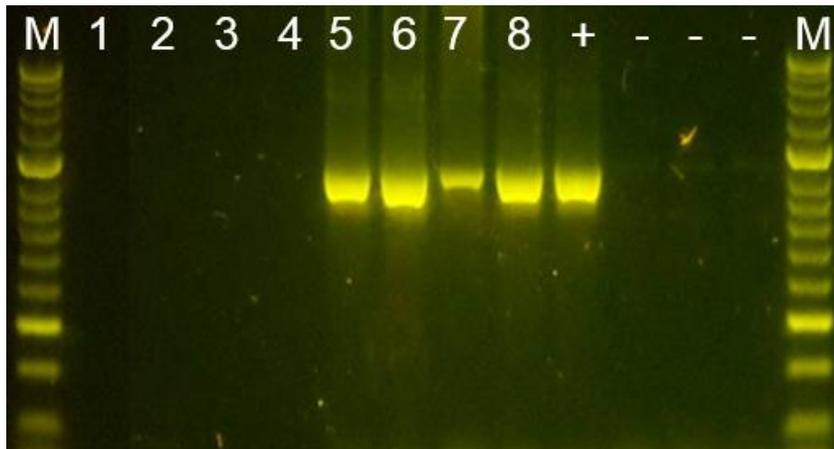
**Figura 3-16.** Síntomas de enfermedad cuero de sapo en raíces de genotipos (CM 2952, Col 1, Col 896 y Bra 184) de yuca, inoculados con fitoplasmas 16SrIII-L crecidos en medio PivS



A y B. Manchas cloróticas anilladas hacia un lado de la lámina foliar. C. D. y E. Fisuras profundas en forma de labios, epidermis muy gruesa y malformación de tubérculos. F y G. Controles negativos correspondientes a raíces sanas de Col 2952 y Col 1.

Las pruebas moleculares con tejido sintomático de raíz de los genotipos Col 2952, Col 1, Col 896 y Bra 184, indicaron la presencia del fitoplasma, mediante la amplificación de un fragmento de 800 pares de bases, con cebadores específicos para fitoplasmas del grupo III. Adicionalmente, las pruebas de RTPCR para los cinco virus fueron negativas en las plantas evaluadas al igual que es sus controles, figura (3-17).

**Figura 3-17.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de ADN de plantas de yuca (Col 2952, Col 1, Col 896 y Bra 184)



Fragmento de 800 pb. Carriles 1-4: muestras de ADN de raíces de plantas inoculadas con PivS sin colonias de fitoplasmas, carriles 5 - 8: ADN de raíces de plantas inoculadas con fitoplasmas crecidos en PivS, (+): Control positivo (plásmido fitoplasma yuca), (-): Control negativo y M: marcador de peso molecular (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

Para entender en parte la sintomatología asociada al cuero de sapo y la patogenicidad del fitoplasma que la está causando, es necesario tener en cuenta que estos microorganismos se mueven dentro de la planta a través del floema desde los tejidos fuente hacia los de almacenamiento o sumideros y que son capaces de pasar a través de los tubos cribosos del floema (Christensen et al., 2004). En el caso de cuero de sapo la mayor concentración de fitoplasmas se da en raíces afectadas, y se ha demostrado a través de las detecciones moleculares, las cuales se presentan en mayor porcentaje en estos tejidos que en hojas (Álvarez et al., 2009; Pardo, 2013).

De este modo, la capacidad patogénica de los fitoplasmas se ha demostrado en diferentes estudios y se ha explicado metabólicamente, por las alteraciones en sus plantas

hospedantes, las cuales dependen de las interacciones de la planta y el microorganismo, por ejemplo, Kartte y Seemuller, (1991) encontraron altas concentraciones del fitoplasma Apple proliferation en raíces de los genotipos de manzana *Malus doméstica* y *M. silvestris* que presentaban como síntoma característico escoba de bruja, los tubos cribosos de estas plantas estaban poco afectados y las plantas no presentaron marchitamientos; por el contrario los genotipos *M. tschonoskii*, *M. sargentii* y *M. kansuensis* presentaron bajas concentraciones del patógeno y como síntoma característico un amarillamiento, los tubos cribosos necrosados y marchitamiento de los árboles, indicando una patogenicidad diferencial dependiendo de la concentración, cepa del patógeno y el tipo de especie vegetal atacada.

Alteraciones en el proceso fotosintético, como acumulación de carbohidratos en hojas maduras y bajo contenido de almidón en tejidos de almacenamiento como raíces se describen con frecuencia en infecciones por fitoplasmas. Sin embargo, estos pueden ser daños secundarios y probablemente estar relacionados con la inhibición en el transporte en el floema. Los niveles más altos de carbohidratos en las hojas fuente producen inhibición de la retroalimentación de la fotosíntesis, causando clorosis y afectación en el transporte de fotosintetizados (Lepka et al., 1999; Bertamini et al., 2002 a y b; Maust et al., 2003).

En el mismo sentido Sinclair y Griffiths (2000), demuestran que la susceptibilidad del hospedante no es el único factor determinante en la concentración del patógeno, sino que también depende de la virulencia de la cepa involucrada, siendo mayor en cepas severas que las de cepas suaves, que a su vez se ve reflejado en los síntomas producidos. Lepka et al. (1999) y Maust et al. (2003) reportaron que las concentraciones de carbohidratos en el floema, raíces y hojas de plantas infectadas con fitoplasmas es diferente al de plantas sanas, lo cual se evidencia claramente en las raíces de yuca afectadas por cuero de sapo, que no tienen un llenado adecuado y por el contrario son delgadas, en forma de látigos y de menor tamaño.

Con relación a la sintomatología de raíces de yuca afectadas por cuero de sapo, Álvarez et al. (2014) confirmaron que las plantas enfermas muestran bajo rendimiento, contenido de almidón y materia seca en comparación con las sanas, los cuales se correlacionaron

con altas concentraciones de ácido málico en raíces sintomáticas que a su vez presentaron mayores porcentajes de azúcares totales y reducidos, particularmente fructosa.

Otro caso de interés, es la reducción en la translocación en el floema debido a la multiplicación exagerada de fitoplasmas en los elementos cribosos, lo cual hace que se congestionen. Sin embargo, una baja translocación también se evidencia con bajos títulos de fitoplasmas, sugiriendo que estos parásitos pueden influenciar indirectamente el metabolismo y las funciones del floema (Bertaccini y Duduk, 2009).

De todas formas, muy poco se conoce acerca de la virulencia de los fitoplasmas. Su información genética indica que estos no poseen ninguno de los genes de virulencia encontrados en otros procariontes, como los hrp de bacterias (Oshima et al., 2004; Hogenhout y Music, 2010). A causa de que ellos carecen de la mayoría de vías metabólicas comunes, se especula que deben asimilar una gran cantidad de moléculas desde los hospedantes, causando efectos detrimentales en ellos (Bai et al., 2006; Tran-Nguyen et al., 2008; Kube et al., 2008; Hogenhout y Music, 2010).

Uno de los factores genéticos más sobresalientes es el hecho de encontrar genes glicolíticos duplicados en el genoma de los fitoplasmas, lo que trae consigo un mayor consumo de carbohidratos y por ende síntomas más severos (Oshima et al., 2004; Oshima et al., 2007) y esta es una de las razones más lógicas, que corresponden al estado de deterioro de las raíces en yuca afectada por cuero de sapo, las cuales son una fuente mayor de carbohidratos y un hábitat inmejorable para estas bacterias.

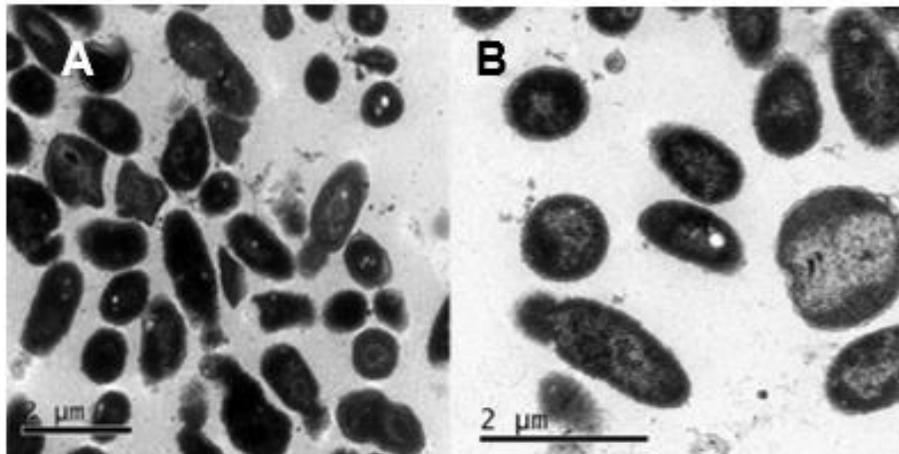
### **3.3.4 Reaislamiento**

El paso final de los Postulados de Koch se definió, cuando a partir del floema de las raíces sintomáticas obtenidas de las plantas de yuca infectadas con fitoplasmas, luego de realizar las pruebas de patogenicidad, se logró el reaislamiento del mismo organismo; tanto en medio líquido (PivL) como en medio sólido (PivS), con formación de colonias y células iguales a las registradas en el aislamiento inicial (figura, 3-12).

Además, las pruebas moleculares permitieron la amplificación de un fragmento de 800 pares de bases con cebadores específicos para fitoplasmas del grupo III y sus secuencias

con 99 a 100% de homología con las registradas en el banco de genes para Cassava frogskin phytoplasma. El reaislamiento del fitoplasma fue el experimento final que permitió confirmar de manera contundente y definitiva, el papel del fitoplasma en el desarrollo de la patología del cuero de sapo en yuca.

**Figura 3-18.** Fotografías de fitoplasmas tomadas bajo microscopio electrónico de transmisión con la técnica de inmersión en resina



A y B. células de fitoplasmas crecidas en medio de cultivo PivS a partir de raíces con cuero de sapo. Fotos: Yolanda Porras (Fundación Clínica Santafé).

### 3.4 Conclusiones y Recomendaciones

La presente investigación permitió el esclarecimiento etiológico de una patología en yuca, conocida como cuero de sapo, demostrando categóricamente su naturaleza fitoplasmática. La experimentación se llevó a cabo con el total cumplimiento de los postulados de Koch, desde el aislamiento del fitoplasma (16SrIII-L) consistentemente asociado y detectado molecularmente en plantas sintomáticas, pasando por su inoculación de tipo artificial en plantas sanas con el organismo aislado, continuando con la evaluación y recuperación de los síntomas y finalmente el reaislamiento del mismo fitoplasma a partir de tejido infectado de plantas inoculadas.

Las pruebas moleculares han permitido la comprobación de la presencia del microorganismo y facilitan el desarrollo de las pruebas de patogenicidad en este tipo de enfermedades donde un patógeno sistémico de difícil aislamiento es la causa.

Es importante resaltar que al analizar los resultados de la presente investigación, se hace necesario considerar las complejas variables inherentes al trabajo con fitoplasmas, donde surgen una serie de interrogantes como: el inóculo usado corresponde a la misma cepa del microorganismo?, la concentración presente en el inóculo fue la misma en todos los tubos?, la cantidad de inóculo usado fue ideal?, la capacidad de virulencia del microorganismo es la misma después de su aislamiento en el medio de cultivo?, todos estos son aspectos importantes que deberán tenerse en cuenta para el perfeccionamiento de las pruebas de patogenicidad en próximos estudios.

Sin duda alguna, este trabajo es un aporte significativo a la fitopatología que abre las puertas y posibilidades para que otros investigadores en todo el mundo inicien labores similares tendientes a resolver la etiología de patologías en donde se sospeche que un fitoplasma es el causante del disturbio.

## Bibliografía

- Álvarez, E., Mejía, J. F., Loke, J. B., Hernández, L., and Llano, G. A. 2003. Detecting the phytoplasma-frogskin disease association in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia. (Abstr.) *Phytopathology*, 93:S4 (Also presented as a poster at the APS annual meeting, held in Charlotte, 9 - 13 aug. 2003. USA.
- Álvarez, E., Mejía, J.F, Loke, J. and Llano, G. 2006. Detection and characterization of a phytoplasma associated with cassava frogskin disease. *Fitopatología Colombiana*, 24, No 2.
- Álvarez, E., Mejía, J., Llano, G., Loke, J., Calari, A., Duduk, B. and Bertaccini, A. 2009. Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease*, 93: 1139 - 1145.
- Álvarez, E., Mejía, J.F. and Pardo, J.M. 2010. Development of a Real-time PCR assay, to detect and quantify a 16SrIII-L Phytoplasma associated with cassava frogskin disease (CFSD). *Phytopathology*, 100:S5.
- Álvarez, E. y Pardo, J. 2013. Diseño de sonda TaqMan® y cebadores específicos para la detección de fitoplasmas asociados a la marchitez letal en Palma de Aceite (*Elaeis guineensis*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Informe Técnico, archivo Patología de Yuca.
- Álvarez, E., Pardo, J., Dufour, D. and Moreno, J. 2014. The metabolism of carbohydrates in roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) infected with frogskin disease. APS-CPS Joint Meeting Abstracts of Presentations, Minnesota, *Phytopathology* 104 (Suppl. 3):S3.7.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. 215: 403 – 410.

- Arocha, Y. and Jones, P. 2008. Phytoplasmas affecting sugarcane and papaya in Cuba. In: Harrison, N., Rao, G.P. and Marcone, C. (eds) Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas. Studium Press LLC. Texas, pp. 249–273.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S., Radek, A., Shevchenko, D., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. and Hogenhout, S. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*. 188, 3682–3696.
- Bedendo, I.P., Davis, R.E. and Dally, E.L. 2000. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. *International Journal of Pest Management*. 46, 73–76.
- Bertaccini, A. and Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 355–378.
- Bertamini, M. and Nedunchezian, N. 2001. Effect of phytoplasma, stolbur-subgroup (Bois noir-BN) of photosynthetic pigments, saccharides, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*. 39, 119–122.
- Bertamini, M., Grando, M., Muthuchelian, K. and Nedunchezian, N. 2002a. Effect of phytoplasmal infection on photosystem II efficiency and thylakoid membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61, 349–356.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F. and Grando, S. 2002b. Phytoplasma (Stolbur subgroup (Bois Noir-BN)) infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61, 357–366.
- Betancourth, C., Pardo, J., Truke, M., Muñoz, J. and Álvarez, E. 2014. *In vitro* isolation of a phytoplasma associated with frogskin disease of cassava (*Manihot esculenta*

Crantz). Abstracts presented at the APS Northeastern Division meeting in Portsmouth, New Hampshire, October 29–31, 2014. *Phytopathology* 105(Suppl. 1):S1.6.

Berges, R., Rott, M. and Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 90, 1145-1152.

Calvert, L. 1994. The safe movement of cassava germoplasm. In: First Meeting of the international Network For Cassava Genetic Resource: Report of the First meeting of the international Network for Cassava Genetic Resources, Organizado por CIAT, IITA e IBPGR en el CIAT, Cali, Colombia.

Calvert, L., Cuervo, M. y Pineda, B. 2001. Cuero de Sapo, una enfermedad que ataca la yuca. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Plegable informativo.

Calvert, L. y Cuervo, M. 2002. Enfermedades virales de la yuca en América del Sur. En: La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. B. Ospina y H. Ceballos (ed.). 262-268 p.

Calvert, L. A., Cuervo, M., Lozano, J., Villareal, N., and Arroyave, J. 2004. Identification of a reolike virus infecting *Manihot esculenta* and associated with cassava frog-skin disease. Sixth Int. Sci. Meet. Cassava Biotechnol. Network. PS4:68.

Cardozo, L., Pardo, J., Zacher, M., Torres, A. and Álvarez, E. First Report of a 16SrIII Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava (*Manihot esculenta*) in Paraguay. American Phytopathological Society. July 2016, Volume 100, Number 7, Page 1492. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1102-PDN>.

Carvajal, M., Olaya, C., Lozano, I., Cuervo, M., Castaño, M. y Cuellar, W. 2014. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research*. 186, 76–86.

- Ceballos, H. y Ospina, B. 2002. La Yuca en el Tercer Milenio. Sistemas Modernos de producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), CLAYUCA (Consortio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca), CTA (Centro Técnico para Cooperación Rural y Agricultura), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, FENAVI (Federación Nacional de Avicultores de Colombia). Cali, Colombia.
- Chaparro, E., and Trujillo, G. 2001. First report of frogskin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. *Plant Disease*. 85:1285.
- Chicas, M., Caviedes, M., Hammond, R., Madriz, K., Albertazzi, F., Villalobos, H., and Ramírez, M. 2007. Partial characterization of Maize rayado fino virus isolates from Ecuador: Phylogenetic analysis supports a Central American origin of the virus. *Virus Research* 126: 268-276.
- Christensen, N., Nicolaisen, M., Hansen, M. and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17 (11): 1175–1184.
- Conci, L. 2009. Mollicutes fitopatógenos. En: Cuarto curso internacional sobre caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Córdoba, Argentina.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H. and Windsor, G. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. Università di Bologna. Firenze University Press. *Phytopathologia Mediterranea*. 51, (3): 607 -617 p.
- Cuervo, M., Villareal, N., Lozano, J., Arroyave, J. and Calvert, L. 2004. Identificación del grupo reoviridae afectando yuca y su asociación con la enfermedad de cuero de sapo. En Memorias del XXV congreso de Ascolfi, Agosto 11-13 de 2004, CIAT Palmira, 27 P.

- Davis, R., Jomantiene, R., Zhao, Y. and Dally, E. 2003. Folate biosynthesis pseudogenes,  $\psi$  fol P and  $\psi$  fol K, and an O-Sialoglycoprotein endopeptidase gene homolog in the phytoplasma genome. *DNA and Cell Biology*. 22, 697–706.
- Davis, R., Dally, E., Zhao, Y., Lee, I. Wei, W., Wolf, T., Beanland, L., LeDoux, D., Johnson, D., Fiola, J., Peterson, H., Dami, I. and Chien, M. 2015. Unraveling the Etiology of North American Grapevine Yellows (NAGY): Novel NAGY Phytoplasma Sequences Related to 'Candidatus Phytoplasma pruni'. *Plant Disease*. 99 (8): 1087-1097.
- De Souza, A., Da Silva, F., Bedendo, I., and Carvalho, C. 2014. A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. *Plant Disease*. 98 (6): 771-779.
- Dickinson, M., Tuffen, M. and Hodgetts, J. 2013. The Phytoplasmas: An Introduction. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_2, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.
- FAOSTAT (The Statistics Division of the FAO). 2013. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org). Consultado en marzo de 2016.
- Figueroa, E. 2012. El CIAT le apunta a las semillas sintéticas de yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Consultado febrero de 2016. <http://www.ciatnews.cgiar.org/es/2012/05/15/el-ciat-le-apunta-a-las-semillas-sinteticas-de-yuca/>.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. and Marzachi, C. 2007. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers Bioscience*. 12, 1352–1375.
- Fudl-Allah, A., Calavan, E. and Igwegbe, E. 1972. Culture of a mycoplasma like organism associated with stubborn disease of citrus. *Phytopathology*. 62: 729 -731.

- Fudl-Allah, A. and Calavan, E. 1973. Effect of temperatura and pH on growth in vitro of a mycoplasma like organism associated with stubborn disease of citrus. *Phytopathology*. 63: 256 – 259.
- Galetto, L. y Marzachi, C. 2010. Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Phyllis, G., Weintraub and Jones, P. eds. CAB International.
- Gaur, R.K., Raizada, R. and Rao, G.P. 2008. Sugarcane yellow leaf phytoplasma associated for the first time with sugarcane yellow leaf syndrome in India. *Plant Pathology*. 57, 772.
- Gomes, A., Jardim, S., Teixeira-Guimaraes, C., de Souza, E. and de Oliveira, E. 2004. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 39, 61–65.
- Ghosh, S., Raychaudhuri, S., Chenulu, V. and Varam, A. 1975. Isolation, cultivation and characterization of mycoplasma like organisms from plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 41 (4): 362 – 366.
- Gundersen, D. and Lee, I. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. Medit.* 35: 144-151.
- Gundersen D., Lee I., Schaff, D., Harrison, N., Chang, C., Davis, R. and Kingsbury, D. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16s rRNA groups I (aster yellows) and III (X-disease). *International Journal Systematic Bacteriology*, 46: 64-75.
- Hampton, R., Stevens, J. and Allen, T. 1969. Mechanically transmissible mycoplasma from naturally infected peas. *Plant Disease Report*. 53: 449 – 503.
- Hernández, A., Calderón, H., Zarate, R. y Lozano, J. 1975. Cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Cranz). *Noticias fitopatológicas*. 4: 117 – 118.

- Howeler, R. 2014. Sustainable soil and crop management of cassava in Asia. For the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) and the Nippon Foundation in Tokyo, Japan. (CIAT Publication No. 389). ISBN 978-958-694-125-9. 280 p.
- Hogenhout, S. and Music, Š. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics—what have we learnt? In: Weintraub PG, Jones, P (eds) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. CABI Publishing, Oxfordshire, pp 19–36.
- Jagoueix-Eveillard, S., Tarendau, F., Guolter, K., Danet, J., Bové, J. and Garnier, M. 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. Molecular Plant-Microbe Interactions. 14, 225–233.
- Jahasinghe, V. y Lozano, J. 1983. La enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista ASIAVA. (Colombia). v. 4, p. 10-12.
- Jarausch, W., Lansac, M., Bliot, C. and Dosba, F. 1999. Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. Plant Pathology. 48, 283–287.
- Kartte, S., and Seemüller, E. 1991. Susceptibility of grafted *Malus taxa* and hybrids to apple proliferation disease. J. Phytopathol. 131:137-148.
- Kison, H. and Seemüller, E. 2001. Differences in Strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. Journal of Phytopathology. 149, 533-541.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdo, A., Reinhardt, R. and Seemüller, E. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. BMC Genomics. 9, 306.

- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R. and Seemüller, E. 2012. Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 185942, 25 pages doi:10.1100/2012/185942.
- Lee, I. 1986. Prospects for in vitro culture of plant pathogenic mycoplasma like organisms. *Annual Reviews of Phytopathology*. 24: 339 – 354.
- Lee, I., Hammond, R. and Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- Lee, I., Gundersen, D., Hammond, R. and Davis, R. 1994. Use of mycoplasma like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559 – 566.
- Lee, I.M., Davis, R.E. and Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. 54, 221–255.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E. and Seemüller, E. 1999. Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological Molecular Plant Pathology*. 55, 59–68.
- Lozano, J. C.; Belloti, A. C.; Reyes, J. A.; Howeler, R.; Leihner, D.; Doll, J. 1981. Problemas en el cultivo de la yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Serie 07 SC-2da. Edición. Cali, Col. 205 p.
- Lozano, J. C., Jahasinghe, V. y Pineda, B. 1983. Enfermedades virales de la yuca en América. *Boletín informativo de la yuca*. CIAT. v. 7, n. 2. P.13.
- Lozano, J. and Nolt, B. 1989. Pest and pathogens of cassava. In: Kahn, R. (ed). *Plant protection and quarantine*. 2. Selected pest and pathogens of quarantine significance. CRC Press. Boca Raton. Florida. V2. 174 – 175 p.

- Maffla, G., Roa, J. y Roca, W. 1984. Erradicación de la enfermedad cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta*) por medio del cultivo de meristemas: efecto de la termoterapia y del tamaño del explante en la tasa de saneamiento. En: Perea, D. y Angarita, Z. (eds). Memorias del Congreso Nacional de cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 171 – 175.
- Maust, B., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J. and Oropeza, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*. 93, 976–981.
- McCoy, R. E. 1979. Mycoplasmas and yellows diseases. In: The mycoplasmas (R.F. Whitcomb and J.G. Tully, eds.). 3: 229-264. Academic Press. New York.
- Morales, F., Lozano, I., Martínez, A. Olaya, C., Castaño, M., Villareal, N., Cuervo, M., Calvert, L. y Arroyave, J. 2010. Diagnóstico de enfermedades virales en cultivos tropicales: Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), Palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: Seminario Internacional Para Terceros Países “Caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas”. Córdoba, Argentina.
- Musetti, R., Favali, M. and Pressacco, L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*. 102, 133–147.
- Musetti, R., Sanità Di Toppi, L., Martini, M., Ferrini, F., Loschi, A., Favali, M. and Osler, R. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology*. 112, 53–61.
- Nolt, B., Pineda, B. y Velasco, A. 1992. Surveys of cassava plantations in Colombia for virus and virus – like diseases. *Plant Pathology*, 41 (3): 348-354.
- Oliveira, S., Abreu, E., Araújo, T., Oliveira, E., Andrade, E. Pardo, J., Álvarez, E. 2014. First Report of a 16SrIII-L Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. *Plant Disease*, 98 (1): 153.

- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*. 36, 27–29.
- Oshima K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A. Hayashi, Y., Kawagida, S. and Namba, S. 2007. Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’. *Molecular Plant Pathology*. 8, 481–489.
- Pardo, J. 2013. Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en protección de Cultivos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira (Colombia). 114p.
- Perozo, J., Fuenmayor, F. y Morales, P. 2007. Manejo de insectos-plaga en el cultivo de la yuca. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIA Divulga 10. 58 p.
- Pineda, B. y Lozano, J. C. 1981. Investigaciones sobre la enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, CIAT. 16 p. (Seminarios Internos).
- Pineda, B., Jayasinghe, U. y Lozano, J. C. 1983. La enfermedad “Cuero de Sapo” en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA* 4:10-12.
- Prince, J., Davis, R., Wolf, T., Lee, I., Mogen, B., Dally, E., Bertaccini, A., Credi, R. and Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X - disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83:1130-1137.
- Poghosyan, A. y Lebsky, V. 2004. Aislamiento y estudio ultraestructural de tres cepas de fitoplasmas causantes de enfermedades tipo “Stolbur” en Solanaceae. *Fitopatología Colombiana*. 28 (1): 21-30.

- Sánchez, T. and Alonso, L. 2012. Conserving and trading fresh cassava roots. 479-495p. In: Cassava in the third millennium; modern production, processing, use, and marketing systems. Ospina, B. and Ceballos, H. (eds). CIAT (The International Center for Tropical Agriculture), CLAYUCA (The Latin American and Caribbean Consortium to Support Cassava Research and Development), CTA (The Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation).
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 215 p.
- Saracco, P., Bosco, D., Veratti, F. and Marzachi, C. 2006. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67, 212–219.
- Sinclair, W. and Griffiths, H. 2000. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. *Plant Disease*. 84, 282–288.
- Skripal, I. y Malinovskaya, L. 1984. Medium SMIMB-72 para aislamiento y cultivo de micoplasmas fitopatógenos. *Microbiol. Zh.* 46 (2): 71-75. (ruso).
- Skripal, I., Malinovskaya, L. y Onishchenko, A. 1984. Método de aislamiento de micoplasmas agentes causales de amarillamientos de plantas. *Microbiol. Zh.* 46 (1): 93-96. (ruso).
- Smart, C., Schneider, B., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K., Seemuller, E. and Kirkpatrick, B. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environment Microbiology*, 62: 2988-2993.

- Torres, E., Bertolini, B., Cambra, M., Montón, C. y Martín, M. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*. 19, 334–340
- Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R. and Gibb, K. 2008. Comparative genome analysis of ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and ‘*Ca.* Phytoplasma asteris’ strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*. 190, 3979–3991.
- Varón, F y Sarria, G. 2007. Enfermedades del maíz y su manejo. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA y Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, Fenalce. ISBN: 978-958-97902-3-6.
- Wongkaew, P. and Fletcher, J. 2004. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. *Plant Cell Rep*. 23:426–434. DOI 10.1007/s00299-004-0847-2
- Ziv, A. and Fuentes, C. 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. Universidad Nacional de Colombia. *Fems Microbiol Lett*, 272 (2): 269 - 275.

## **4. Transmisión de fitoplasma 16srIII-L por *Scaphytopius marginineatus* (Stal) Cicadellidae en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)**

### **Resumen**

En Colombia la enfermedad de cuero de sapo en yuca ha sido un problema limitante durante décadas, estudios del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, indicaron molecularmente que *Scaphytopius marginineatus* porta un fitoplasma del grupo 16SrIII, el cual está asociado con esta patología. Esta investigación tuvo por objetivo la cría del insecto para determinar su capacidad de transmisión del microorganismo. Para ello, se establecieron colonias en plantas de yuca (variedad SM909-25) y frijol (variedad ICA Pijao). Plantas de yuca infectadas por fitoplasmas fueron expuestas a grupos de 50 individuos de *S. marginineatus*, durante 2, 4, 6 y 8 días para determinar el período de adquisición. También, con aquellos que lograron superar un período adicional de 2 semanas (período de incubación), se realizaron pruebas de inoculación en plantas sanas, las cuales se expusieron durante 5 a 7 días, como período de inoculación. Para verificar la transmisión, se hicieron estudios de PCR anidada, PRC en tiempo real y secuenciación. Se pudo comprobar la adquisición del fitoplasma por el insecto, detectándolo molecularmente en su cuerpo después de seis u ocho días de alimentación. La transmisión a plantas sanas fue del 10%, después de tres semanas de inoculadas. Las secuencias obtenidas fueron reportadas al banco de genes.

**Palabras clave:** Transmisión, Vector, Cicadellidae, Fitoplasma.

## Abstract

As much as 30% of cassava production in Colombia is affected by cassava frogskin disease (CFSD). The disease is associated with a 16SrIII-L phytoplasma that is transmitted between plants through vegetative propagation or by sap-sucking insect vectors. We collected 250 insect samples in Palmira and Santander de Quilichao; analyzed them for the presence of phytoplasmas during 2009 and 2012–2014; and detected a 16SrIII-L phytoplasma. Greenhouse experiments with symptomatic plants showed that potential insect vectors for cassava were hemipterans, particularly the Cicadellidae and Cixiidae families, and include the cicadellid leafhopper *Scaphytopius marginelineatus*. Colonies of this leafhopper were mass-reared on cassava ('SM 909-25') and bean ('ICA Pijao') plants. To determine the acquisition period, 50 individual insects were selected and exposed to phytoplasma-infected cassava plants for 2, 4, 6, and 8 days. The insects then underwent an additional 2 weeks' incubation period, after which, surviving insects were put on healthy cassava plants over a 5-to-7-day inoculation period. Molecular studies of insects and plant tissues, based on PCR amplification and DNA sequencing, confirmed both the acquisition (6 days after of insect feeding) and transmission of a phytoplasma in plants (3 weeks). Sequences KP75989, KP759898, KP759899, KP759900, KP759901, and KP759902 were reported GenBank.

**Key words:** Transmission, Vector, Cicadellidae, Phytoplasma.

### 4.1 Introducción

Los agricultores en el trópico frecuentemente cultivan yuca de manera tradicional y en sistema de subsistencia. El cultivo se considera rústico y poco afectado por factores bióticos. Sin embargo, los rendimientos en campos experimentales pueden superar las 70 toneladas por hectárea, mientras que la producción comercial en algunas regiones de Colombia alcanza 40 toneladas o menos (Bellotti, *et al.*, 2012). Estas diferencias indican que varios factores de distinta naturaleza pueden limitar la producción, incluyendo plagas y enfermedades que amenazan la sostenibilidad y rentabilidad del cultivo (Álvarez *et al.*, 2012; Figueroa, 2012; Perozo *et al.*, 2007; Ceballos y Ospina, 2002).

Entre los problemas fitosanitarios, uno de gran relevancia es la enfermedad del “cuero de sapo”, la cual se registró por primera vez en el departamento del Cauca hace más de 40 años (Hernández *et al.*, 1975; Pineda *et al.*, 1981 y 1983). Los síntomas de la enfermedad se presentan en las raíces, las cuales se tornan leñosas, de cáscara gruesa, corchosa y quebradiza con hendiduras profundas en forma de labios, que unidas entre sí, semejan una red y en estados avanzados la epidermis del tubérculo adquiere el aspecto de cuero de sapo que le da el nombre a la enfermedad (Calvert *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2009). Las raíces se tornan muy delgadas, mientras la base del tallo más gruesa de lo normal (Chaparro y Trujillo, 2001). Otros síntomas menos característicos como mosaicos, clorosis y distorsiones se observan también en la parte aérea (Álvarez, *et al.*, 2009).

En cuanto a la etiología de la enfermedad, estudios biológicos y moleculares realizados en los laboratorios de patología de yuca en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en los últimos 15 años, indican la asociación de un fitoplasma con raíces de plantas afectadas, pero nunca con raíces sanas, su caracterización permitió ubicarlo taxonómicamente en el grupo 16SrIII (Álvarez *et al.*, 2003; 2006; 2009).

Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular limitadas al floema de las plantas, en las cuales causan cientos de enfermedades de importancia económica por las pérdidas en rendimiento (Seemüller *et al.*, 1998; IRPCM, 2004, Bertaccini y Duduk, 2009; Kube *et al.*, 2012; Kingdom, 2013; Zhao *et al.*, 2014) y son transmitidos específicamente por insectos vectores de los subórdenes Auchenorrhyncha y Sternorrhyncha (Purcell, 1982; Weintraub y Wilson, 2010), que hacen parte del orden Hemiptera, los cuales constituyen un gran y diverso grupo que además generan consecuencias graves en la epidemiología de las enfermedades (Wilson y Weintraub, 2007; Weintraub y Gross, 2013).

En la naturaleza los fitoplasmas guardan una relación persistente y propagativa con sus vectores. Los insectos los adquieren durante la alimentación en plantas infectadas y los transmiten a plantas sanas después de un período de latencia, en el cual se mueven y multiplican dentro del insecto permaneciendo en éste, durante el resto de su vida (Lee *et al.*, 1998; Weintraub y Beanland, 2006).

En el orden Hemiptera tanto estados inmaduros como adultos exhiben conductas alimentarias similares (Goodchild, 1966), a menudo ambos estados transmiten fitoplasmas, se alimentan selectivamente de floema sin dañar los tejidos conductivos ni provocar respuestas de defensa en el hospedante, lo cual hace que sean eficientes vectores (Munyaneza y Upton, 2005; Weintraub y Beanland, 2006; Wilson y Weintraub, 2007; Catalano, 2011).

Dentro del orden Hemiptera, la mayoría de vectores de fitoplasmas pertenecen a la familia Cicadellidae, con aproximadamente 22.000 especies distribuidas en todo el mundo (Hamilton, 1984; McKamey, 2002), denominados salta-hojas, de los cuales se conocen más de 70 especies transmisoras (Nielson, 1979; Nault y Ammar, 1989; Weintraub y Beanland, 2006). El rango de hospedantes de cada fitoplasma está determinado por el número de especies de insectos que son capaces de transmitirlo y por el hábito monófago o polífago del vector (Nault, 1980; Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Weintraub y Beanland, 2006).

El tiempo de alimentación necesario para adquirir los fitoplasmas es denominado período de adquisición. Éste puede extenderse desde unos pocos minutos a algunas horas y mientras más extenso sea, mayor es la probabilidad de adquisición (Purcell, 1982). Y el lapso que transcurre desde la adquisición y la habilidad para inocular el fitoplasma es conocido como período de latencia o incubación. La duración de este período depende de la temperatura y la relación entre el vector y el patógeno, y puede variar desde unos pocos días hasta un par de meses (Murrall *et al.*, 1996; Nagaich *et al.*, 1974). Durante este período los fitoplasmas se mueven y replican en el cuerpo del insecto vector, en ocasiones pasando a la descendencia por transmisión vertical o también conocida como transovarial (Gourret *et al.*, 1973). Por último, el período de inoculación tiene una duración y dinámica similar al período de adquisición (Purcell, 1982).

En la familia Cicadellidae, especies del género *Scaphytopius* se han registrado como vectores o potenciales vectores de fitoplasmas en diferentes patosistemas, como: Huanglongbing (HLB) en cítricos (Marques *et al.*, 2010 y 2012; Toloy *et al.*, 2011; Wulff *et al.*, 2015), amarillamiento en uva (Oliver *et al.*, 2008), la enfermedad X en melocotón (Hill y Sinclair, 2000) y la falsa floración en arándanos (Lee *et al.*, 2014).

En Colombia el género *Scaphytopius* hace parte de la entomofauna del país (Freytag y Sharkey, 2002), se encuentran representantes como *Scaphytopius fuliginosus* (Osborn) transmitiendo el fitoplasma causante del amachamiento de la soya (Granada, 1979) y además, *Scaphytopius marginelineatus* (Stal) reportado por investigadores de CIAT como portador de fitoplasmas asociados a cuero de sapo en yuca, a través de pruebas moleculares de PCR anidado (CIAT, 2003; 2005).

Con base en los antecedentes y argumentación expuestos, el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar la capacidad del Cicadellidae *Scaphytopius marginelineatus* como transmisor del fitoplasma asociado a cuero de sapo en yuca.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Colecta de insectos

Durante los años 2013 y 2014 se realizaron colectas de insectos de la familia Cicadellidae mediante la técnica de jameo (jama entomológica de arrastre), para seleccionar aquellos similares a los descritos para el género *Scaphytopius*, con aproximadamente 100 golpes de red en cada muestreo, cubriendo un área representativa del lote muestreado en cada visita. Esta metodología ha sido probada en otros estudios de vectores, los cuales involucran especies de saltahojas que requieren de la captura de los individuos vivos (Rice *et al.*, 1993; Crosslin *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2010).

Los muestreos se llevaron a cabo en cultivos de yuca y en plantas arvenses creciendo en cercanía a dichos cultivos, en la estación experimental de CIAT (Santander de Quilichao), ubicada a 3° 06" N y 76° 31" O, y 990 msnm, con precipitación anual de 900 mm y temperatura de 24°C en el Departamento del Cauca y en CIAT (Palmira) en el Valle del Cauca, a 3° 30' 19" N y 76° 21' 27" O, a 956 m.s.n.m con una precipitación anual de 1100 mm y Temperatura promedio de 24,5 °C. Las colectas se intensificaron durante los meses de julio, agosto y septiembre, cuando se ha registrado que la población del insecto es mayor (CIAT, 2003 y 2005).

#### 4.2.2 Identificación de insectos

Una primera aproximación a la identificación del insecto se realizó mediante comparación morfológica con individuos del género *Scaphytopius* presentes en la colección del laboratorio de entomología de CIAT. Para confirmar la especie con la cual se desarrolló la cría, una muestra de los insectos colectados (aproximadamente 30 especímenes entre hembras y machos) fueron depositados en etanol al 70% en tubos Falcon, y enviados al Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, en la Estación Experimental Tibaitatá (Cundinamarca), para identificación taxonómica por expertos en Cicadellidae.

La identificación se realizó mediante observación bajo estereoscopio en líquido, disección y aclaramiento de la genitalia de machos y hembras por medio de digestión con KOH al 10% a baño maría (80°C), montaje en medio de Hoyer de las alas anteriores y fotografía digital de los caracteres diagnósticos. La discriminación de los caracteres se realizó a través de las claves propuestas por Webb y Godoy (1993), Dietrich (2005), Zahniser y Dietrich (2008) y Pinzón (2010).

#### 4.2.3 Cría del insecto

Metodología adaptada a partir de la desarrollada por Granada (1979) con *Scaphytopius fuliginosus*. Y siguiendo las recomendaciones de otros autores trabajando con hemípteros vectores de fitoplasmas (Murrall *et al.*, 1996; Toloy *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2012; Kingdom, 2013).

Los primeros intentos de cría de insectos de las especies *Scaphytopius* spp, se realizaron en CIAT (Palmira), colectando insectos en plantas arvenses. Los individuos capturados se llevaron a plantas de yuca (variedad SM909-25) de dos meses de edad, procedentes de cultivo de meristemos y mantenidas en jaulas entomológicas (1m x 1m x 0,7 m) con malla a prueba de insectos. Esta variedad se usa por su alta susceptibilidad a la enfermedad de cuero de sapo.

De la misma manera, se adelantaron procesos de cría en Santander de Quilichao con insectos colectados en lotes de yuca. En este caso los insectos se mantuvieron enjaulados

en plantas de yuca (SM909 -25) de un mes de edad, certificadas por el banco de germoplasma de CIAT.

En los casos de cría exitosa, la descendencia se sostuvo introduciendo plantas de frijol de la variedad ICA Pijao de dos semanas de edad, las cuales se reemplazaban cada una o dos semanas (CIAT, 2005), para favorecer su tasa reproductiva y obtener colonias suficientemente grandes para realizar las pruebas de transmisión.

En ambos casos las jaulas entomológicas fueron mantenidas en condiciones de casa de malla a incidencia de luz natural y protegidos de la acción de la lluvia. Los registros de temperatura, precipitación y humedad relativa de Palmira y Santander de Quilichao en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), donde se realizaron las crías se presentan en la tabla 4-1.

La intención de criarlos inicialmente en yuca tuvo una razón específica, y es que aquellos que no sobrevivían en esta especie, no tienen la oportunidad de ser potenciales vectores del fitoplasma, por aquello de los períodos de adquisición e inoculación. Los insectos se colectaban semanalmente y se sumaban a los ya capturados en las semanas anteriores. Esta dinámica se mantuvo durante cuatro meses hasta que se lograron las primeras progenies.

**Tabla 4-1.** Condiciones climáticas de las Estaciones Experimentales de CIAT en Palmira y Santander de Quilichao, años 2014 y 2015

CIAT	T°. máxima promedio	T°. mínima promedio	T°. promedio	H.R Promedio	Precipitación (mm)/año
Palmira 2014	30.24	19.57	24.22	79.44	973.8
Palmira 2015	31.17	19.92	24.7	77.5	610.4
S. Quilichao 2014	30.2	19.39	24.08	78,14	1867
S. Quilichao 2015	30.95	19.43	25.09	76,17	1242

#### 4.2.4 Pruebas de transmisión

Los ensayos de transmisión se diseñaron con base en metodologías desarrolladas en trabajos con vectores en otras patologías asociadas con fitoplasmas, buscando determinar los parámetros centrales en las interacciones biológicas entre la planta, el insecto y el fitoplasma (Burrows, 1987; Maxiner *et al.*, 2000; Ge y Maxiner, 2003; Weintraub y Gross, 2013; Wulff *et al.*, 2015).

Una vez se estabilizó la colonia (más de 300 adultos) del insecto en plantas de fríjol, grupos de 50 individuos fueron introducidos a nuevas jaulas con plantas de yuca (SM-909-25), pero en esta ocasión infectadas por fitoplasmas, las cuales fueron determinadas como positivas con PCR anidado con cebadores específicos para grupo III, ahí permanecieron durante diferentes períodos de tiempo (2, 4, 6, 8 días) para determinar molecularmente el período de adquisición del patógeno, las pruebas fueron realizadas con adultos y ninfas. Adicionalmente, en la prueba molecular se incluyeron insectos no expuestos a plantas infectadas como control.

Pasado el tiempo de adquisición se introdujeron nuevas plantas de fríjol para facilitar la sobrevivencia del insecto. Aquellos insectos que lograron superar un período adicional de 2 semanas de vida, se usaron para realizar pruebas de inoculación, puesto que es un lapso suficiente para alcanzar la incubación del microorganismo en el cuerpo del insecto (Murrall *et al.*, 1996; Nagaich *et al.*, 1974; Weintraub y Beanland, 2006).

Posteriormente, dichos insectos se trasladaron nuevamente a jaulas con plantas sanas de yuca SM909-25 y se expusieron durante 5 días como Período de inoculación. Después de tres semanas de la inoculación, las plantas se examinaron molecularmente para determinar si hubo transmisión del fitoplasma.

#### 4.2.5 Pruebas moleculares para detección de fitoplasma

Estas pruebas se realizaron antes y después de las pruebas de transmisión, para confirmar procesos de adquisición de fitoplasmas por los insectos en plantas de yuca positivas y transmisión a plantas sanas libres del microorganismo.

Los insectos expuestos a plantas enfermas fueron retirados cada dos días (hasta 8 días) y mantenidos en tubos eppendorf a -20°C, con su respectiva identificación, para posteriores pruebas moleculares.

#### **4.2.5.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de los insectos se realizó siguiendo el método de Weintraub (2010) y para las plantas con el método de Prince (1993). La extracción de ADN se hizo a partir de 0,4 g de tejido vegetal o usando de cuatro a cinco individuos por muestra en el caso de los insectos. El tejido vegetal se maceró en morteros con nitrógeno líquido, y los insectos haciendo uso de tubos eppendorf de 1,5 mL con solución tampón usando pistilos estériles. Después de la precipitación final en etanol, el ácido nucleico extraído se suspendió en 30 a 50 uL de solución tampón (TE) Tris-EDTA (10 mM Tris- HCl, pH 8.0, y 1 mM EDTA, pH 8.0) y almacenado a - 20°C hasta su uso.

La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó mediante espectrofotometría (Thermo Scientific Nanodrop 2000c espectrofotómetro) a una absorbancia de 260 nm.

#### **4.2.5.2 Detección por PCR**

Para las pruebas de PCR directa y anidadas, se preparó una mezcla de 12,5 µL de go taq master mix 2X Promega, 0,5 µL de cada cebador, 9,5 µL de agua y 2 µL de cada muestra de ADN, para un volumen final de 25 µL. Los cebadores y perfiles se describen a continuación.

La PCR 1, se hizo con los cebadores universales P1/Tint (Smart *et al.*, 1996), los cuales amplifican un fragmento de 1600 pares de bases, ubicado en la región 16S rDNA y parte del 23S rDNA y para la segunda PCR, los cebadores R16F2N/ R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1996) que generan un amplicón de 1200 pares de bases, correspondiente a una región parcial del 16S.

El perfil de amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación 50°C durante 2 minutos y extensión a 72 °C por 3 minutos, seguido de una extensión final a la misma temperatura por 10 minutos.

Para la segunda PCR se tomó 1 µL del amplificado y se diluyó en 29 µL de agua, utilizando 2 µL de la dilución para la amplificación con los cebadores universales R16F2N/ R16R2 y las mismas condiciones de la primera PCR.

La PCR anidada específica para fitoplasmas del grupo III, se realizó con 1 µL del amplificado de PCR 2, y se diluyó en 39 µL de agua. Posteriormente se utilizaron 2 µL de la dilución con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 (Lee *et al.*, 1994), que amplifican un fragmento de 800 pb del gen 16Sr. El perfil de amplificación únicamente cambió en la primera desnaturalización que fue de 2 min a 94°C.

#### **4.2.5.3 PCR en tiempo real**

Para confirmar presencia de fitoplasmas en insectos que resultaron positivos en PCR convencional, se realizaron adicionalmente pruebas de PCR en tiempo real. El proceso se realizó siguiendo la metodología descrita por Álvarez y Pardo (2013). La sonda y cebadores están basados en el gen 16Sr dentro de una región de 1400 pares de bases que codifica para proteínas de la subunidad 16S. Esta región es altamente conservada, presenta polimorfismos entre grupos de fitoplasmas y tiene dos copias en el genoma de cada célula bacteriana (Torres *et al.*, 2005), logrando mayor sensibilidad. La sonda se encuentra en la posición 469 y los cebadores en 416 (sentido) y 492 (antisentido), logrando amplificar un fragmento de 72 pares de bases. Se trabajó a una concentración de 200 nM para sonda y cebadores.

#### **4.2.5.4 Electroforesis**

De cada una de las PCR, se tomaron siete uL del producto de amplificación para cargarlos en un gel de agarosa al 1,2 %, teñido con SYBR safe (invitrogen) a razón de 4uL/200cc, y se corrieron en electroforesis a 100 V. Al finalizar la corrida se verificó con transiluminador y se hizo registro fotográfico (Sambrook *et al.*, 1989). Como referencia del peso molecular se usó el marcador Hiper ladder II (bioline) 100 lanes.

#### 4.2.5.5. Secuenciación de ADN

Los productos de amplificación de la segunda PCR anidada, se limpiaron utilizando el método de precipitación de ADN con Polietilen glicol y etanol (Ziv y Fuentes, 2007), y se secuenciaron en Iowa State University. Las secuencias obtenidas se compararon por máximo apareamiento y porcentajes más altos de homología con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1990).

### 4.3 Resultados y discusión

#### 4.3.1 Identificación de insectos

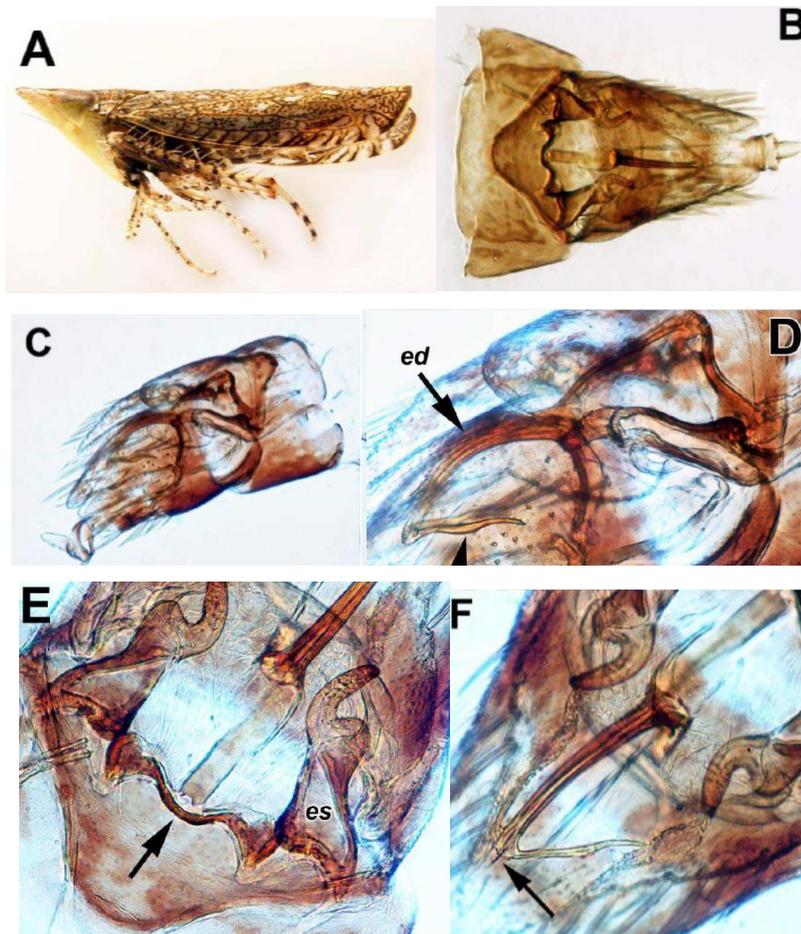
Los insectos criados bajo las condiciones anteriormente mencionadas corresponden a *Scaphytopius (Convelinus) marginelineatus* (Stal, 1859). Teniendo en consideración su morfología y órganos genitales como criterios taxonómicos de identificación. La descripción detallada de la especie se precisa en la sinopsis del género *Scaphytopius* realizada por Pinzón (2010) y los cuales coinciden con los especímenes de esta investigación Figuras (4-1 y 4-2).

Los registros de colección de diferentes investigadores indican que insectos del género *Scaphytopius* pueden encontrarse en yuca, *Manihot esculenta*, frijol, *Phaseolus spp.* (CIAT, 2003 y 2005); soya, *Glycine max* (Granada, 1979); hortalizas; alfalfa, *Medicago sativa*; la fabácea *Dolichos sp.*; algodón, *Gossypium sp.* y en pastos (Freytag y Sharkey, 2002). Y su distribución en Colombia es amplia, registrándose su presencia en varios departamentos y altitudes: Cundinamarca, Villeta; Atlántico, Caracolí, Barranoa, Palapa; Sucre, Las Peñas, Cantagallo; Quindío, Armenia, Marmato; vereda Primavera; Magdalena, Ciénaga; Valle Palmira; Antioquia, Santafé de Antioquia, Cotové. Desde 0 hasta 2.289 m (CIAT, 2003; Pinzón, 2010).

Como cualquier Hemiptero, *Scaphytopius* es hemimetabolo y tiene cinco instares (Wilson y Weintraub, 2007), los cuales duran alrededor de un mes antes de llegar al estado adulto. Ovipositan generalmente en el envés de las hojas de manera individual y en ocasiones

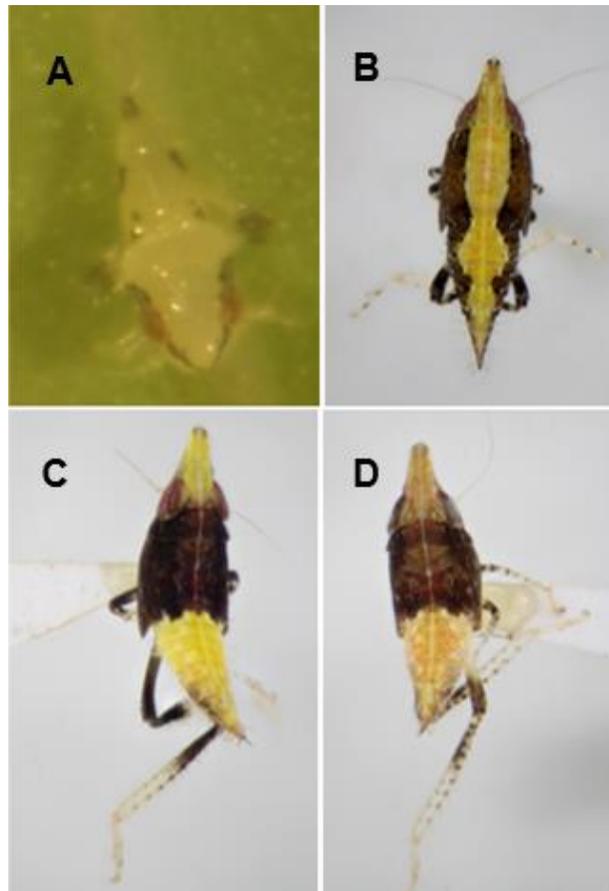
pueden encontrarse varios huevos alineados, son de difícil observación por su apariencia translúcida. Las ninfas son móviles, pero suelen permanecer por varios días en una misma hoja. Los adultos pueden vivir más de un mes, lo cual permitió el desarrollo de las pruebas de transmisión en detalle.

**Figura 4-1.** *Scaphytopius marginelineatus*



A. Habitus lateral. B. Vista general de la genitalia masculina en vista ventral. C. Vista general de la genitalia masculina en vista lateral. D. Detalle en vista lateral del edeago (ed). La flecha indica los procesos apicales con longitud cercana a la mitad de la longitud del tallo del edeago, ligeramente doblados o inclinados. E. Detalle en vista ventral del conectivo y los estilos (es). La flecha inferior derecha señala la banda esclerotizada en el conectivo en su punto de unión con el edeago. F. Detalle en vista ventral del edeago. La flecha inferior indica el ápice con una abertura. Fotos: Carlos Beltran, MSc. Entomólogo, ICA Tibaitatá.

**Figura 4-2.** Estados inmaduros de *Scaphytopius marginelineatus*



A. ninfa de segundo instar con manchas laterales simétricas. B. ninfa de tercer instar con las manchas fusionadas formando una banda en cada lado del cuerpo. C. ninfa (macho) de cuarto instar con mancha oscura en el tórax. D. la ninfa de último instar se torna rojiza. Fotos: Rodrigo Zúñiga Sarria, técnico de entomología en CIAT.

### 4.3.2 Cría de insectos

Los intentos de cría del insecto *Scaphytopius* spp., a partir de capturas en plantas arvenses en CIAT Palmira fueron fallidos, posiblemente porque se trataba de una especie que no consume yuca o no hace parte de su rango de hospedantes. Así, todos los insectos capturados y enjaulados con plantas de yuca SM 909-25, morían antes de tres días, lo que no permitió avanzar a la obtención de colonias y pruebas de transmisión. En el neotrópico la fauna Cicadellidae ha sido poco estudiada Freytag y Sharkey (2002) y Pinzón (2010),

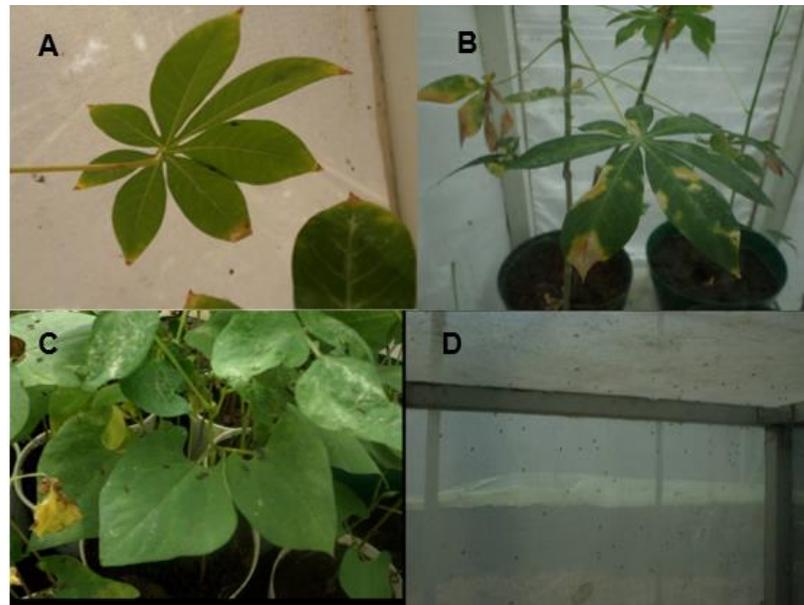
quienes estiman que puede haber entre 10000 y 15000 especies sin describir. En Colombia hay descritas 679 especies de cicadélidos, para las cuales en la mayoría de los casos no se conoce su hospedero vegetal (Freytag y Sharkey, 2002). Por lo tanto, son también escasos los reportes de información taxonómica, hábitat o ciclo de vida, lo que complica su estudio y procesos de cría.

Además, el rango de plantas hospedantes de cada insecto en la naturaleza está determinado por intrincados procesos de coevolución que determinan además la especificidad y su comportamiento alimentario, siendo posible encontrar potenciales vectores mono, oligo, o polífagos (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1996; Weintraub y Beanland, 2006).

De otra parte, los insectos capturados en cultivos de yuca en Santander de Quilichao, (*Scaphytopius marginelineatus*) fueron criados, aunque con relativa dificultad en estas plantas, alcanzando una población inicial de aproximadamente 30 insectos, la cual se estabilizó al menos durante tres meses, sin incrementos importantes. Esta situación dio paso a la posibilidad de avanzar hacia la obtención de grandes poblaciones (más 500 insectos) al introducir plantas de frijol (ICA Pijao) para su mantenimiento. Las cualidades especiales del frijol como hospedero experimental de vectores en patologías asociadas a fitoplasmas, ha sido documentado en anteriores trabajos (CIAT, 2005, Maixner *et al.*, 2010; Perilla, 2013). Los resultados indican que yuca no es un hospedante primario de *S. marginelineatus*, puesto que no fue posible lograr poblaciones grandes sobre esta especie en comparación con lo obtenido en las plantas de frijol, como se indica en la figura 4-3.

Sin embargo, es posible que sea un visitante frecuente del cultivo, en razón a que las capturas también fueron realizadas desde plantaciones experimentales de yuca en Santander de Quilichao.

**Figura 4-3.** Cría del insecto *Scaphytopius marginelineatus*



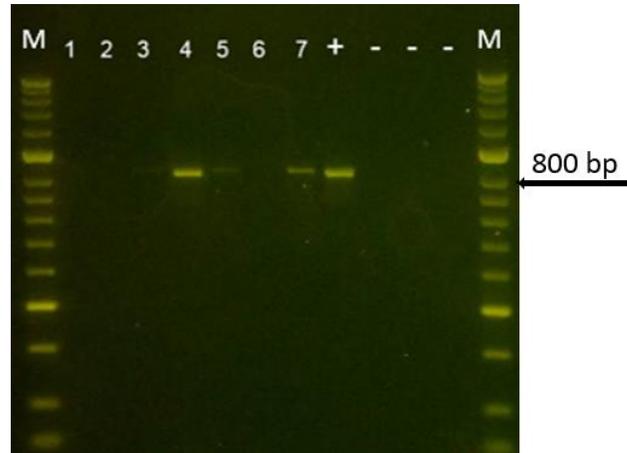
A. colonia establecida en plantas de yuca variedad SM 909-25. B. daño causado por alimentación del insecto en hojas de yuca. C. colonia crecida en plantas de frijol Variedad Pijao. D. Colonia con abundantes insectos lograda en frijol. Fotos: Autor.

### 4.3.3 Pruebas de transmisión

Las pruebas de PCR indicaron que *Scaphytopius marginelineatus* es capaz de adquirir el fitoplasma a partir de la alimentación en plantas de yuca infectadas con el patógeno. La amplificación de ADN fitoplasmático fue posible únicamente al procesar insectos que se alimentaron durante seis u ocho días sobre las plantas enfermas, pero no se logró la detección con insectos expuestos en tiempos inferiores (figuras 4-4 y 4-5).

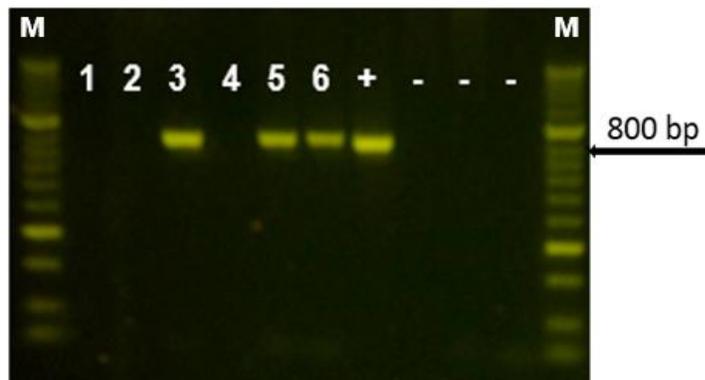
Diferentes autores han demostrado que cuanto mayor sea el período de acceso o exposición de los insectos a la planta enferma mayor la probabilidad y eficiencia en adquisición, aun para aquellos casos en que bastan pocas horas para hacerlo (Purcell, 1982; Golino *et al.*, 1987; Carraro *et al.*, 1996), así los resultados encontrados concuerdan con lo ya registrado en literatura.

**Figura 4-4.** Electroforesis En gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de muestras de ADN de *Scaphytopius marginelineatus*.



Tamaño esperado de 800 bp. Carril 1. ADN de insectos no expuestos a plantas infectadas. Carriles 2, 3 y 4: ADN de insectos con período de adquisición 6 días. Carriles 5, 6 y 7: ADN insectos con período de adquisición 8 días. (+): Control positivo (plásmido fitoplasma 16SrIII). (-): Control negativo. M: Marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

**Figura 4-5.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de muestras de ADN de ninfas de *Scaphytopius marginelineatus*.



Tamaño esperado de 800 bp. Carriles 1 -6, corresponde a ADN de insectos inmaduros (5 por muestra) expuestos a plantas infectadas (una semana). (+): Control positivo (plásmido fitoplasma 16SrIII). (-): Control negativo. M: Marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

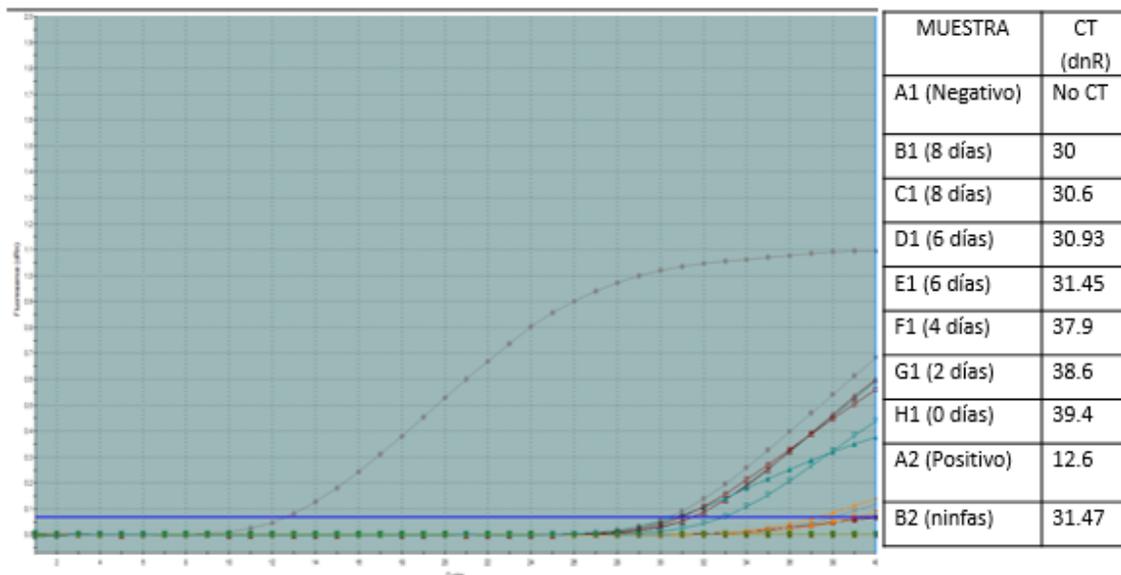
Ahora bien, la prueba molecular permite la comprobación de la adquisición del fitoplasma en aquellos insectos donde se detecta, pero no descarta la posibilidad de que los insectos puedan adquirirlo en tiempos inferiores, puesto que la detección está ligada a la concentración del microorganismo. Además, es importante tener en consideración el movimiento del fitoplasma en el interior del insecto desde su aparato bucal al sistema digestivo, hemolinfa y finalmente cerebro, colonización de glándulas salivales, y la multiplicación dentro del insecto como se ha descrito en varias investigaciones (Lee *et al.* 1998; Weintraub y Beanland, 2006).

Tanto ninfas como adultos adquirieron el fitoplasma 16 SrIII de yuca, y el periodo de adquisición, se puede definir en al menos una semana. Resultados similares fueron obtenidos por otros investigadores en CIAT (2005) trabajando en el mismo patosistema. Otros estudios, como el de Granada (1979), con *S. fuliginosus* en machismo de soya determinó un período de adquisición de 5 a 10 días y Marques (2011); Wulf *et al.*, (2015) fijaron en dos semanas la adquisición del fitoplasma 16Sr IX asociado a HLB en cítricos por *S. marginelineatus*.

La adquisición del fitoplasma a partir de plantas de yuca infectadas por el microorganismo también se verificó mediante la prueba de PCR en tiempo real, al procesar insectos con tiempos de adquisición de seis y ocho días, se logró la amplificación, pero no con los expuestos durante dos y cuatro, o los insectos alimentados en frijol (Figura 4-6). Las muestras procedentes de insectos con ocho días de adquisición presentaron mayor concentración que aquellas con seis días.

Estos resultados guardan relación con lo argumentado por Purcell, (1982), quien afirma que la adquisición es más eficiente con períodos más prolongados de exposición, lo cual además, permite concluir que hay mayor acumulación del microorganismo en el insecto o que ha iniciado el proceso de multiplicación en su interior.

**Figura 4-6.** PCR en tiempo real de muestras de ADN de *Scaphytopius marginelineatus*



Gráfica de PCR en tiempo real con sonda y cebadores específicos para grupo 16SrIII, indicando que las muestras de ADN de insectos con tiempo de adquisición de 6 y 8 días fueron positivas a fitoplasma. El control positivo correspondió a un plásmido del fitoplasma *Cassava frogskin disease phytoplasma*.

La capacidad de adquisición de fitoplasmas por parte de los Hemipteros y particularmente por aquellos comprendidos en la familia Cicadellidae, se explica en gran medida por su hábito alimenticio en tejidos del floema de las plantas hospedantes, donde dichas bacterias residen (Wilson y Weintraub, 2007; Weintraub, 2010). Además, el tiempo de adquisición puede variar en diferentes patosistemas, ya que en cada uno, las relaciones existentes entre los fitoplasmas, sus hospedantes e insectos, implican interacciones de reconocimiento y respuesta derivados de complejos procesos de coevolución (Howe y Jander, 2008; Nadarasah y Stavrinides, 2011).

Pasado el tiempo de adquisición, dos semanas adicionales fueron necesarias para que el fitoplasma cumpliera su tiempo de latencia en el insecto. Durante el período de latencia, los fitoplasmas se trasladan desde el lumen del sistema digestivo hacia el hemocele, ya sea intracelularmente a través de las células epiteliales del mesenterón (sistema digestivo medio), o intercelularmente, moviéndose entre las células y atravesando la membrana basal (Lefol *et al.*, 1994).

Los fitoplasmas circulan en la hemolinfa, donde pueden multiplicarse porque la concentración de compuestos orgánicos es tan alta como en la savia de tejidos del floema (Moriwaki *et al.*, 2003).

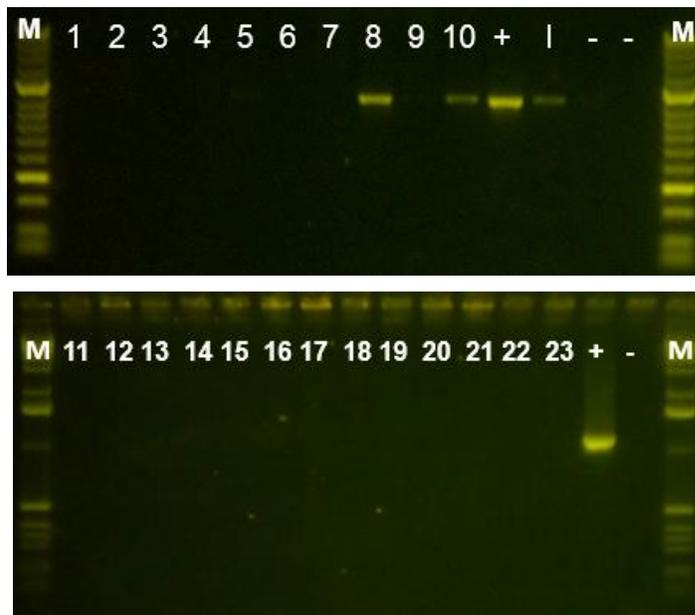
Una vez en la hemolinfa, pueden infectar tejidos, tales como los túbulos de Malpighi (Lherminier *et al.*, 1990), cuerpos grasos, cerebro (Lefol *et al.*, 1994; Nakashima y Hayashi, 1995), u órganos reproductivos (Kawakita *et al.*, 2000). La replicación del fitoplasma en estos tejidos, aunque no la transmisión, puede indicar una larga relación coevolutiva entre el insecto y el patógeno. Eventualmente los fitoplasmas atraviesan células específicas de las glándulas salivales, acumulándose en los ductos salivales (Kirkpatrick, 1992). A partir de este momento, pueden ser transmitidos a otras plantas cuando el insecto libera saliva para alimentarse de ellas (Vega *et al.*, 1993; 1994). En concordancia con estos conceptos, un mes después, incluyendo los cinco días del periodo de inoculación en plantas sanas, se pudo determinar molecularmente la presencia de fitoplasmas, comprobando la transmisión del microorganismo desde el insecto a la planta inoculada. En el transcurso de un año, 20 plantas fueron inoculadas y solamente en dos se logró la detección del fitoplasma (Figura 7).

Entender el ambiente interno del hospedante es indispensable para poder explicar los fenómenos biológicos de las interacciones entre insecto, planta y fitoplasma. Por ejemplo, el bajo porcentaje de transmisión puede deberse a la concentración del fitoplasma en los tejidos foliares donde se alimenta, ya que para este caso particular la disposición del microorganismo se da principalmente en las raíces, como se ha descrito en trabajos previos (Álvarez *et al.*, 2003; 2006; 2009). En muchos casos se ha demostrado también que, el suministro de carbohidratos es superior en los tejidos radicales que el resto de la planta (Saracco *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2013), esto puede restringir además la detección del microorganismo.

Sobre este particular, trabajos de transmisión de un fitoplasma del grupo IX asociado a HLB en cítricos y realizados con la especie *S. marginelineatus* en Brasil, dieron cuenta de su baja capacidad como vector. Los porcentajes de transmisión no alcanzaron el 1 % cuando se intentó pasar el microorganismo desde plantas de naranja dulce infectadas con HLB a plantas sanas de la misma especie (Wulf *et al.*, 2015). Los autores argumentan

esta falta de capacidad de transmisión, además de la baja concentración del fitoplasma en los tejidos, al hecho de que esta especie no es hospedante primario del insecto. Sin embargo, especies dentro del género *Scaphytopius* son eficientes vectores del agente causante de Stuborn en cítricos, enfermedad asociada a *Spiroplasma citri*. De otra parte, los insectos se ven afectados en su capacidad de transmisión por efecto de las condiciones ambientales, principalmente por la temperatura (Marzachi *et al.*, 2004). Así mismo, en el proceso de reconocimiento a nivel celular y molecular de componentes entre el insecto y el fitoplasma, el caso de proteínas de membrana *Amp* de los fitoplasmas es particularmente interesante, por su interacción diferencial con las proteínas de los microfilamentos de cicadélidos, que influyen en la habilidad de transmitir fitoplasmas en diferentes especies (Suzuki *et al.*, 2006). Entonces, no todos los insectos en los cuales se detecten fitoplasmas tiene la habilidad de transmisión (Vega *et al.*, 1993; Hogenhout *et al.*, 2010).

**Figura 4-7.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 de muestras de ADN de plantas de yuca en prueba de transmisión con insectos



Tamaño esperado de 800 bp. Carriles 1 -10 y 11 - 20, corresponden a ADN de plantas expuestas (cinco días) a insectos inoculativos. Carriles 21-23: plantas no expuestas a insectos, (+): Control positivo (plásmido fitoplasma 16SrIII). (I): ADN de planta usada como fuente de inóculo. (-): Control negativo. M: Marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

#### 4.3.3.1 Secuencias de fitoplasmas

La adquisición del fitoplasma por los insectos *S. marginelineatus* fue comprobada finalmente a través del análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados con cebadores específicos R16F2n - R2 del gen 16Sr RNA, mediante (Máximo apareamiento y porcentajes más altos de homología) con la herramienta BLAST. Éstos mostraron homología del 99 o 100% con las secuencias de Cassava frogskin disease phytoplasma reportados en el banco de genes.

Seis secuencias de ADN de fitoplasma 16SrIII-L, obtenidas a partir del insecto *S. marginelineatus* se registraron en el banco de genes bajo la siguiente codificación asignada por el National Center for Biotechnology Information:

BankIt1798939 Seq3 KP759897

BankIt1798939 Seq5 KP759898

BankIt1798939 Seq6 KP759899

BankIt1798939 Seq10 KP759900

BankIt1798939 Seq9 KP759901

BankIt1798939 Seq1 KP759902

Los experimentos de transmisión con insectos resultaron útiles para comprobar que *Scaphytopius marginelineatus* no solamente porta el fitoplasma 16 SrIII-L, asociado a cuero de sapo, sino que puede actuar como vector del patógeno.

La transmisión por insectos se ha considerado por mucho la forma más importante de dispersión de enfermedades asociadas a fitoplasmas en la naturaleza (Bosco y D'Amelio, 2010). No obstante en el presente estudio, los tiempos registrados para la adquisición, incubación y alimentación para inoculación limitan su eficiencia, situación que se evidenció al detectar que solo dos plantas fueron positivas de 20 inoculadas con *S. marginelineatus* durante un año y que mantiene la propagación vegetativa de la yuca como el medio más eficiente de diseminación de la enfermedad.

## 4.4 Conclusiones y Recomendaciones

Se pudo demostrar biológica, molecular y genéticamente, que el insecto *Scaphytopius marginelineatus* (Cicadellidae) es capaz de adquirir el fitoplasma "Cassava frogskin disease Phytoplasma" a partir de plantas de yuca infectadas con el patógeno. La capacidad de transmisión del fitoplasma por el insecto es muy reducida y teniendo en consideración el tiempo necesario para la adquisición, incubación e inoculación, que ajusta casi cuatro semanas; es poco probable que tenga posibilidades importantes en la naturaleza para generar efectos epidemiológicos de gran magnitud, ya que el insecto prefiere hospedantes alternos de otras especies y su permanencia en el cultivo de yuca es esporádica.

A mayor tiempo de exposición de los insectos en plantas enfermas para adquisición, mayor es la concentración de fitoplasmas detectados por qPCR, debido posiblemente al movimiento y reproducción del microorganismo en el cuerpo del insecto.

La cría del insecto puede realizarse con mayor facilidad al alternar fríjol y yuca en las jaulas, puesto que el insecto tiene diferencias marcadas en su tasa reproductiva en cada especie. En la primera, el insecto se reproduce en gran cantidad y permite posteriores transferencias de un número adecuado de individuos a plantas de yuca para las pruebas de transmisión. En la yuca no fue posible incrementar de manera suficiente las poblaciones para pruebas de transmisión.

*Scaphytopius marginelineatus* es un insecto polífago y al parecer la yuca no es su hospedante primario, sino alterno, lo que se pudo evidenciar desde la colecta y en el proceso de cría.

Es conveniente continuar con estudios tendientes a determinar la variabilidad genética del insecto, evaluación de las condiciones de cría, en búsqueda de lograr el ambiente óptimo para su mantenimiento y evaluar su fluctuación de población en campo y posible efecto sobre la epidemiología de la enfermedad.

## Bibliografía

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. 215: 403 – 410.
- Álvarez, E., Mejía, J. F., Loke, J. B., Hernández, L., and Llano, G. A. 2003. Detecting the phytoplasma frogskin disease association in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia. (Abstr.) *Phytopathology*, 93:S4 (Also presented as a poster at the APS annual meeting, held in Charlotte, 9 - 13 aug. 2003. USA.
- Álvarez, E., Mejía, J.F, Loke, J.and Llano, G. 2006. Detection and characterization of a phytoplasma associated with cassava frogskin disease. *Fitopatología Colombiana*, 24, No 2.
- Álvarez, E., Mejía, J., Llano, G., Loke, J., Calari, A., Duduk, B. and Bertaccini, A. 2009. Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease*, 93: 1139 - 1145.
- Álvarez, E., Mejía, J.F. and Pardo, J.M. 2010. Development of a Real-time PCR assay, to detect and quantify a 16SrIII-L Phytoplasma associated with cassava frogskin disease (CFSD). *Phytopathology*, 100:S5.
- Álvarez, E., Llano, G., and Mejía, J. 2012. Cassava Disease.165 – 200 p. In: *Cassava in the third millennium; modern production, processing, use, and marketing systems*. Ospina, B. and Ceballos, H. (eds). CIAT (The International Center for Tropical Agriculture), CLAYUCA (The Latin American and Caribbean Consortium to Support Cassava Research and Development), CTA (The Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation).

- Álvarez, E. y Pardo, J. 2013. Diseño de sonda TaqMan® y cebadores específicos para la detección de fitoplasmas asociados a la marchitez letal en Palma de Aceite (*Elaeis guineensis*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Informe Técnico, archivo Patología de Yuca.
- Bellotti, A., Arias, B., Vargas, O., Reyes, J. and Guerrero, J. 2012. Insects and mites that attack Cassava, and their control. 213 – 250 p. In: Cassava in the third millennium; modern production, processing, use, and marketing systems. Ospina, B. and Ceballos, H. (eds). CIAT (The International Center for Tropical Agriculture), CLAYUCA (The Latin American and Caribbean Consortium to Support Cassava Research and Development), CTA (The Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation).
- Bertaccini, A., and Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol Mediterr* 48:355–378.
- Bosco, D. D'Amelio, R. 2010. Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In: Weintraub PG, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Wallingford, UK, pp 293–308.
- Burrows, P. 1987. Improved Estimation of Pathogen Transmission Rates by Group Testing. *Phytopathology*. 77: 363-365.
- Calvert, L. A., Cuervo, M., Lozano, J., Villareal, N., and Arroyave, J. 2004. Identification of a reolike virus infecting *Manihot esculenta* and associated with cassava frog-skin disease. Sixth Int. Sci. Meet. Cassava Biotechnol. Network. PS4:68.
- Carraro, L., Loi, N., Gregoris, A., Ermacora, P., and Osler, R. 1996. Studies on the transmission of a phytoplasma from *Chrysanthemum leucanthemum* L. by the leafhopper *Euscelidius variegatus* Kbm. *IOM Lett* 4:127–128.

Catalano, M. 2011. Cicadélidos vectores de fitoplasmas a cultivos de importancia económica en Argentina; Sistemática y bioecología (Insecta- Auchenorrhyncha- Cicadellidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Argentina. 134 p.

Ceballos, H. y Ospina, B. 2002. La Yuca en el Tercer Milenio. Sistemas Modernos de producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), CLAYUCA (Consortio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca), CTA (Centro Técnico para Cooperación Rural y Agricultura), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, FENAVI (Federación Nacional de Avicultores de Colombia). Cali, Colombia.

Chaparro, E., and Trujillo, G. 2001. First report of frog skin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. *Plant Disease*, 85:1285.

Christensen, N., Nicolaisen, M., Hansen, M. and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17 (11): 1175–1184.

(CIAT) INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE. 2003. Integrated pest and disease management in major agroecosystems. Annual report (of) Proje PE-1. Cali (Colombia). p. 110, 141.

(CIAT) INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE. 2005. Crop and agrosystem health management. Annual report (of) Proje PE -1. Cali (Colombia). p. 51- 53.

Crosslin, J., Munyaneza, J., Jensen, A. and Hamm, P. 2005. Association of beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) with a clover proliferation group phytoplasma in columbia basin of Washington and Oregon. *J. Econ. Entomol.* 98(2): 279-283.

Dickinson, M., Tuffen, M. and Hodgetts, J. 2013. The Phytoplasmas: An Introduction. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*,

Methods in Molecular Biology, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_2, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.

Dietrich, C. 2005. Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Florida Entomologist. 88 (4): 502-517.

Figueroa, E. 2012. El CIAT le apunta a las semillas sintéticas de yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). <http://www.ciatnews.cgiar.org/es/2012/05/15/el-ciat-le-apunta-a-las-semillas-sinteticas-de-yuca/>. Consultado febrero de 2013.

Freytag, P. and Sharkey, M. 2002. A preliminary list of the leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) of Colombia. Biota Colombiana 3(2): 235-283.

Ge, Q. and Maixner, M. 2003. Comparative experimental transmission of grapevine yellows phytoplasmas to plants and artificial feeding medium. Extended Abstracts 14th Meeting of the ICVG, September 12-17, 2003 Locorotondo (Bari), Italy ,109-110.

Golino, D., Old field, G. and Gumpf, D. 1987. Transmission characteristics of the beet leafhopper transmitted virescence agent. Phytopathology. 77: 954–957.

Goodchild, A. 1966. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. Biological Reviews, 41: 97-140.

Gourret, j., Maillet, and Gouranton, J. 1973. "Virus-like particles associated with the mycoplasmas of clover phyllody in the plant and in the insect vector," Journal of General Microbiology. 74 (2): 241–249.

Granada, G. A. 1979. Machismo disease of soybeans: I. Symptomatology and transmission. Plant Disease Reporter, 63(1): 47-50.

- Gundersen D., Lee I., Schaff, D., Harrison, N., Chang, C., Davis, R. and Kingsbury, D. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16s rRNA groups I (aster yellows) and III (X-disease). *International Journal Systematic Bacteriology*, 46: 64-75.
- Hamilton, K. 1984. The tenth largest family? In: *Tymbal Auchenorrhyncha Newsletter*, No. 3: 4-5.
- Hernández, A., Calderón, H., Zarate, R. y Lozano, J. 1975. Cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Noticias fitopatológicas*. 4: 117 – 118.
- Hill, G. and Sinclair, W. 2000. Taxa of Leafhoppers Carrying Phytoplasmas at Sites of Ash Yellows Occurrence in New York State. *Plant Disease*. 84 (2): 134-138.
- Hogenhout, S. and Music, Š. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics—what have we learnt? In: Weintraub PG, Jones, P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CABI Publishing, Oxfordshire, pp 19–36.
- Howe, A. y Jander, G. 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review Plant Biology*. 59: 41–66.
- IRPCM. 2004. “*Candidatus* Phytoplasma”, a taxon for wall - less, non - helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1243 – 1255.
- Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsunashi, W. and Watanabe, K. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90: 909-914.

- Kingdom, H. 2013. Insect Maintenance and Transmission. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_5, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.
- Kirkpatrick, B. 1992. Mycoplasma-like organisms-plant and invertebrate pathogens. In: *The Prokaryotes*. Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. (Eds.). New York. Springer, 4: 4050–4067.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R. and Seemüller, E. 2012. Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 185942, 25 pages doi:10.1100/2012/185942.
- Lee, I., Hammond, R. and Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- Lee, I., Gundersen, D., Hammond, R. and Davis, R. 1994. Use of mycoplasma like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559 – 566.
- Lee, I., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M. and Bartoszyk, I. 1996. Multiple phytoplasmas detected in two species of Homoptera feeding on pear trees with decline symptoms. *International Organization for Mycoplasmaology Lett.* 4: 199.
- Lee, I., Gundersen, D., Davis, R. and Bartoszyk, E. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 1153-1169.

- Lee, I., Polashock, J., Bottner-Parker, K., Bagadia, P., Rodriguez-Saona, C., Zhao, Y., and Davis, R. 2014. New subgroup 16SrIII-Y phytoplasmas associated with false-blossom diseased cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) plants and with known and potential insect vectors in New Jersey. *Eur J Plant Pathol.* 39:399–406. DOI 10.1007/s10658-014-0396-7.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Louis, C. *et al.* 1994. Propagation of Flavescence dorée MLO (mycoplasma like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 285-293.
- Lherminier, J., Prensier, G., Boudon-Padieu, E. and Caudwell, A. 1990. Immuno labeling of grapevine Flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38: 79-86.
- Marques, R., Teixeira, D., Martins, E., Leite, A., Sanches, A., Yamamoto, P. and Lopes, J. 2010. Detection of the phytoplasma associated with citrus huanglongbing symptoms in the leafhopper *Scaphytopius marginelineatus*. *Citrus Research and Technology.* 31: 40.
- Marques RN. 2011. Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno [dissertation]. [Piracicaba (SP)]: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- Marques, R., Teixeira, D., Yamamoto, P. and Lopes, J. 2012. Weedy hosts and prevalence of potential leafhopper vectors (Hemiptera: Cicadellidae) of a phytoplasma (16SrIX group) associated with Huanglongbing symptoms in citrus groves. *Journal of Economic Entomology.* 105 (2): 329-37.
- Maixner, M., Reinert, W., Darimont, H. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis.* 39 (2):83-84.

- Maixner, M., Weintraub, P. and Jarasch, B. 2010. Grapevine yellows vector sampling and monitoring training school Bernkastel-Kues, Germany 5th to 9th of July, 2010. Reporte COST Action 0807 Working Group 2 - Insect vectors.
- Marzachi, C., Milne, R. and Bosco, D. 2004. Phytoplasma-plant-vector relationships. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in plant pathology. Vol: 3. Research Signpost Trivandrum, Kerala, India, pp 211–241.
- McKamey, S. 2002. Leafhoppers of the World database: progress report. In: Hoch, Asche, H.; Homberg, C. and Kessler, P. (eds). 11th. International Auchenorrhyncha Congress, 5-9 August. Berlin (Germany).
- Moriwaki, N., Matsushita, K., Nishina, M. and Kono, Y. 2003. "High concentrations of trehalose in aphid hemolymph,". *Applied Entomology and Zoology*. 38 (2): 241–248.
- Munyanzeza, J. E. and Upton, J. E. 2005. Beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) settling behavior, survival, and reproduction on selected host plants. *Journal of Economic Entomology*, 98:1824-1830.
- Murrill, D., Nault, L., Hoy, C., Madden, L. and Miller, S.v 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89:1223-1232.
- Nadarasah, G. and Stavrinides, J. 2011. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Review*. 35: 555–575.
- Nagaich, B., Puri, B., Sinha, R., Dhingra, M. and Bhardwaj, P. 1974. Mycoplasma like organisms in plants affected with purple top-roll, marginal flavescence and witches' broom diseases of potatoes. *Journal of Phytopathology*, 81: 273–379.

- Nakashima, K. y Hayashi, T. 1995. Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Phytopathological Society of Japan*, 61:451-455.
- Nault, L. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*. 70: 659-662.
- Nault, L. and Ammar, E. 1989. Leafhoppers and planthoppers transmission of plant viruses. *Annual Review Entomology*, 34: 503-529.
- Nielson, M. 1979. Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. pp. 3–27. In: Maramorosch, K. y Harris, K. (eds.). *Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents*. London: Academic.
- Olivier, C., Lowery, D., Vincent, C., Stobbs, L., Saguez, J., Galka, B., and Bittner, L. 2008. Phytoplasma diseases in Canadian vineyards. ENDURE International Conference, Diversifying crop protection. 12-15 October 2008. La Grande-Motte, France.
- Perilla, L. 2013. Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ciencias – Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Departamento de Química. Bogotá, Colombia.
- Perozo, J., Fuenmayor, F. y Morales, P. 2007. Manejo de insectos-plaga en el cultivo de la yuca. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIA Divulga 10. 58 p.
- Pineda, B. y Lozano, J. C. 1981. Investigaciones sobre la enfermedad del "cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, CIAT. 16 p. (Seminarios Internos).
- Pineda, B., Jayasinghe, U. y Lozano, J. C. 1983. La enfermedad "Cuero de Sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA* 4:10-12.

- Pinzón, L. 2010. Sinópsis de las especies del género *Scaphytopius* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) para Colombia. Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Prince, J., Davis, R., Wolf, T., Lee, I., Mogen, B., Dally, E., Bertaccini, A., Credi, R. and Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X - disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83:1130-1137.
- Purcell, A. 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 20: 397-417.
- Rice Mahr SE, Wyman JA, Chapman RK. 1993. Variability in aster yellows infectivity of local populations of the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) in Wisconsin. *J Econ Entomol.* 86:1522–1526
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 215 p.
- Saracco, P., Bosco, D., Veratti, F. and Marzachi, C. 2006. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 67, 212–219.
- Seemüller, E., Marcone, C., Laurer, U., Ragozzino, A. and Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80 (1): 3-26.
- Smart, C., Schneider, B., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K., Seemüller, E. and Kirkpatrick, B. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environment Microbiology*, 62: 2988-2993.

- Suzuki, M. and Giovannoni, S. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microb.* 62, 625-630.
- Toloy, R., Martins, E., Coletti, D., Teixeira, D. and Wulff, N. 2011. Acquisition of 16SrIX, HLB associated phytoplasma, by *Scaphytopius marginelineatus* (Hemiptera: Cicadellidae) from *Crotalaria juncea*. Hemipteran-Plant Interactions Symposium. July 11 – 14, 2011. Piracicaba-Brazil.
- Torres, E., Bertolini, B., Cambra, M., Montón, C. y Martín, M. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes.* 19, 334–340
- Vega, F., Davis, R., Barbosa, P., Dally, E. and Purcell, A. 1993. Detection of a plantpathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83: 621-624.
- Vega, F., Davis, R., Dally, E., Barbosa, P., Purcell, A. *et al.* 1994. Use of a biotinylatedDNA probe for detection of the aster yellows mycoplasma-like organism in *Dalbulus maidis* and *Macrostelus fascifrons* (Homoptera: Cicadellidae). *The Florida Entomologist*, 77: 330-334.
- Webb, M. and Godoy, C. 1993. Review of the leafhopper tribe Scaphytopiini (Homoptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) with a key to genera. *J. nat. Hist.* 27: 423-427.
- Weintraub, P. 2010. Collection and trapping of Grapevine Yellows vectors. In: Grapevine Yellows Vector Sampling and Monitoring Training School. European Cooperation in Science and Technology. Bernkastel-Kues, Germany 5th to 9th of July, 2010.
- Weintraub, P and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology.* 51: 91-111.

- Weintraub, P. and Wilson, M. 2010. Control of Phytoplasma diseases and vectors CAB International 2010. Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors (eds P.G. Weintraub and P. Jones).
- Weintraub, P. and Gross, J. 2013. Capturing Insect Vectors of Phytoplasmas. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (eds.), Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 938, DOI 10.1007/978-1-62703-089-2\_5, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.
- Wilson, R. and Weintraub, P. 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. Bulletin of Insectology. 60 (2): 177-178.
- Wulff, N., Teixeira, D., Martins, E., Toloy, R., Bianco, L. Colletti, D., Kitajima, E. and Bové, J. 2015. Sunn hemp, a major source-plant of the phytoplasma associated with huanglongbing symptoms of sweet orange in São Paulo State, Brazil. Journal of Citrus Pathology. 2(1). iocv\_journalcitruspathology\_26956.
- Zahniser, J. and Dietrich, C. 2008. Phylogeny of the leafhopper subfamily Deltocephalinae (Insecta: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) and related subfamilies based on morphology. Systematics and Biodiversity 6 (1): 1-24.
- Zhao, Y., Davis, R., Wei, W., Shao, J. and Jomantiene, R. 2014. Phytoplasma genomes: Evolution through mutually complementary mechanisms, gene loss and horizontal acquisition. 235-271. In: Genomics of plant associated bacteria. Gross, A. Lichens Park, and Kole. eds. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ziv, A. and Fuentes, C. 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. Universidad Nacional de Colombia. Fems Microbiol Lett, 272 (2): 269 - 275.