

Estudio del Amarillamiento letal del cocotero y otras enfermedades causadas por fitoplasmas

Lic. Margarita Palmieri,
Lic. Inf. Fredy. Mejía,
Lic. Irwin Donis

Resumen

Los fitoplasmas son bacterias minúsculas sin pared celular que se han asociado con más de 700 enfermedades en plantas alrededor del mundo a partir de la década de los 60s. El estudio de estos organismos ha sido difícil debido a que los fitoplasmas no se han logrado cultivar en medios libres de células; sin embargo, el desarrollo de pruebas moleculares para su diagnóstico en las últimas décadas ha permitido un avance acelerado en las investigaciones. En Guatemala la primera enfermedad provocada por fitoplasmas que se detectó fue el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), en el año 2001. Recientemente, han aparecido enfermedades en papaya, papa y jocote que parecen ser debidas a fitoplasmas. Otros campos de investigación se han visto beneficiados gracias al estudio de los fitoplasmas, especialmente el estudio de insectos del orden Homóptera, al que pertenecen todos los vectores de fitoplasmas reportados. La búsqueda de variedades de cultivos resistentes o tolerantes a los fitoplasmas ha cobrado importancia debido a que, por ahora, su siembra ha probado ser el mejor enfoque para el control de las enfermedades provocadas por estos patógenos. En este trabajo se presenta una crónica de los estudios sobre fitoplasmas y algunos de los resultados relevantes que se han logrado.

Introducción

En la década de los cincuentas se descubrieron algunas enfermedades en las plantas de etiología desconocida conocidas como “amarillamientos”. Al principio se sospechó que los amarillamientos se debían a algún tipo de virus ya que algunas evidencias experimentales apoyaban esta hipótesis, por ejemplo: eran transmisibles por injertos; podían ser transmitidas por *Cuscuta* spp¹. o por insectos del orden Homóptera y algunas enfermedades de amarillamiento podrían dar protección cruzada contra otras enfermedades virales en huéspedes infectados (1).

En 1967 un grupo de investigadores japoneses descubrió en microfotografías electrónicas la presencia de organismos similares a micobacterias (1-3), un grupo de bacterias pequeñas y difíciles de cultivar. Debido a este descubrimiento se acuñó el término MLO (Mycoplasma-Like Organisms, organismos similares a micoplasmas) para referirse a estos patógenos. A finales de los 90's se empezó a usar el término fitoplasmas para referirse a ellos (1).

¹*Cuscuta* spp.: Género de enredaderas parásitas que obtiene sus nutrientes absorbiéndolos directamente de los haces vasculares del hospedero. Debido a esta propiedad, se han usado para estudios de transmisión de virus y otras enfermedades en plantas.

Los fitoplasmas son bacterias diminutas que habitan en elementos cribosos del floema de las plantas hospederas; carecen de pared celular y hasta ahora no ha sido posible cultivarlos en medios libres de células (1, 3). El estudio de los fitoplasmas ha sido muy difícil debido a esta característica; hasta hace algunas décadas estas enfermedades podían ser estudiadas y clasificadas usando pruebas biológicas principalmente. La microscopía electrónica no ha podido diferenciar a los fitoplasmas y por lo tanto se han desarrollado técnicas de tinción especial para visualizar a los fitoplasmas con microscopía óptica, pero la sensibilidad de esta prueba diagnóstica obviamente ha sido inferior a la sensibilidad obtenida con la microscopía electrónica y nuevamente no ha permitido diferenciar a los organismos a partir de sus características (2, 3).

Los síntomas que presentan las plantas infectadas por fitoplasmas son bastante característicos y pueden servir como diagnóstico, siempre y cuando el orden de la aparición de los síntomas coincida con lo esperado. El problema es que algunas enfermedades provocadas por virus, bacterias, hongos o nemátodos pueden producir síntomas casi idénticos, pero con un orden de aparición distinto.

Por tanto, el diagnóstico basado solamente en la sintomatología no es suficiente para asegurar que una enfermedad se deba a fitoplasmas.

Aunque los síntomas son diversos según el fitoplasma y el hospedero, se pueden distinguir tres generales: (a) en las flores, se puede observar un enverdecimiento y una falta de desarrollo que hace que los pétalos parezcan sépalos; hay ocasiones en que la producción de flores se detiene por completo, (b) las “escobas de bruja” se forman debido a una producción aumentada de yemas

axilares; también puede darse el caso en el que se producen flores a partir de las partes sexuales de las flores afectadas, y (c) la producción de frutos suele detenerse después de la infección por fitoplasmas; los frutos que se habían formado hasta el momento detienen su desarrollo y son abortados (1, 3).

En años recientes la cantidad de publicaciones relacionadas con fitoplasmas ha aumentado considerablemente gracias al desarrollo de pruebas de diagnóstico moleculares. Las sondas de ADN y pruebas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han utilizado para estudiar la relación genética que existe entre los fitoplasmas identificados hasta ahora, con un límite de detección de hasta 340 a 37,000 fitoplasmas por gramo de tejido (1-3). Se han reportado más de 700 enfermedades provocadas por fitoplasmas en varios cientos de especies vegetales (4).

Las pruebas moleculares han permitido también el estudio del genoma de los fitoplasmas, con lo cual se ha identificado genes que producen proteínas de membrana, enzimas y otros péptidos que tienen cierta similitud con otras bacterias (5).

Los fitoplasmas se han clasificado en 16 grupos según los patrones de bandas que se obtienen con el método del poliformismo del largo de fragmentos de restricción (RFLPs) (2). El fitoplasma que causa el ALC pertenece al grupo IV (ver Figura 1). Además del ALC, en Guatemala se sospecha la presencia de fitoplasmas en papaya, papa y jocote. En la papaya (*Carica papaya*) se ha identificado un posible fitoplasma, este fitoplasma no se ha estudiado a fondo debido su baja incidencia en muestras recientes, pero es probable que pertenezca al grupo XII.

Las muestras de papa (*Solanum tuberosum*) en las que se ha encontrado fitoplasmas son muy pocas también. Se sabe que en el valle de México coexisten al menos dos fitoplasmas distintos en cultivares de papa. El PPT (“Potato Purple Top”, punta morada de la papa) es un fitoplasma del grupo I, y el PHS (“Potato Hair Sprouts”, brotes de pelo de la papa) pertenece al grupo II (6). Aunque se ha observado una sintomatología muy similar a la de PPT, el diagnóstico certero de este fitoplasma no ha sido posible; tampoco se ha visto alguna planta con síntomas de PHS.

En los últimos años ha aparecido una enfermedad en papa llamada *papa rayada* (“Zebra Chip”, en inglés). La papa rayada (ver Figura 2) ha causado serios daños en plantaciones comerciales de papa pues los tubérculos pierden su valor comercial para consumo humano. Desde hace dos años se ha estudiado esta enfermedad en conjunto con compañías privadas y universidades extranjeras y hasta el momento se ha detectado la presencia de fitoplasmas en muchas de las muestras de papa que se han estudiado, pero no en todas. No se sabe con certeza si el principal causante de la papa rayada es un fitoplasma, pero se ha visto una asociación entre los síntomas y la presencia de estos patógenos. Además, algunos experimentos y observaciones en campo sugieren que la papa rayada es transmitida por un insecto vector; estas observaciones han impulsado el estudio de la taxonomía de los homópteros y se ha optimizado pruebas de PCR para detectar la presencia de fitoplasmas en los insectos.

Desde mediados del Siglo XX el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) ha estado presente en toda la región del Caribe, incluyendo Honduras, Belice y la península de Yucatán. A pesar de que

el ALC es considerado como una de las enfermedades del coco más severas y dañinas hasta ahora encontradas, en Guatemala no se le había prestado mucha atención al problema, en parte debido a que no existían industrias dedicadas a la explotación del coco. Todo esto cambió en el año 2000, cuando se reportaron los primeros casos de palmeras con síntomas similares al ALC en la costa atlántica del país. En esta región, el coco no tiene una importancia comercial tan grande como otros cultivos, pero sí un gran valor cultural ya que forma parte de la dieta de las comunidades garífunas y keekchies. Además, el ALC puede atacar a otras 33 especies de palmáceas, lo que implica un alto riesgo ecológico y podría, eventualmente, afectar el comercio de palmas ornamentales.

En el año 2001 la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), en conjunto con la Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (UNR-MAGA), elaboró una propuesta de investigación presentada al Fondo Competitivo de Desarrollo Tecnológico Agroalimentario (AGROCYT). La propuesta titulada “Vigilancia epidemiológica del Amarillamiento Letal del Cocotero en los departamentos de Izabal y Petén: búsqueda de medidas locales para su control” fue aprobada en el año 2002 para ser ejecutada en un período de tres años.

Gracias a este proyecto se ha podido estudiar al fitoplasma causante de esta enfermedad en Guatemala y otros fitoplasmas emergentes en cultivos de interés. A continuación se describen los objetivos y logros obtenidos hasta la fecha.

Objetivos y métodos

Vigilar la región costera del departamento de Izabal y la región fronteriza a Belice del departamento de El Petén para detectar nuevos brotes de la enfermedad.

Con ello se deseaba poder apreciar patrones en la dispersión de la enfermedad y tomar medidas fitosanitarias que pudieran prevenir que el ALC llegara a regiones no afectadas. La vigilancia ha consistido en la toma de muestras de cocales y palmas con síntomas y aparentemente sanos en todo el país, dando énfasis al cocotero. El muestreo se ha efectuado colectando aserrín de las plantas, el cual se conserva en una solución amortiguadora que estabiliza la muestra por varios meses sin necesidad de refrigeración.

Desarrollar un método de diagnóstico de la enfermedad.

Este proyecto ha buscado implementar y validar la técnica de diagnóstico usada en Florida, México y Honduras la cual utiliza para la detección del patógeno, la PCR, y para la caracterización, el RFLP. el polimorfismo del largo de fragmentos de restricción (RFLPs).

Identificar posibles vectores y hospederos alternos del ALC.

El ALC es transmitido en otros países del Caribe por el *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae). Sin embargo se ha reportado la presencia del fitoplasma causante del ALC en otras especies de homópteros en Yucatán. Durante este proyecto se han investigado los vectores presentes en las áreas afectadas por el ALC y se han buscado aquellos que tuvieran el fitoplasma y fueran, por lo tanto, posibles vectores alternos de la enfermedad. También se han hecho pruebas para detectar al fitoplasma en otras especies de palmáceas en las regiones afectadas

para encontrar hospederos alternos en donde la enfermedad pudiera permanecer activa.

Cultivo *in vitro* del cocotero y búsqueda de variedades nativas.

En países donde la enfermedad ha estado presente por muchos años, la medida de control que mejor ha funcionado es la siembra de híbridos y variedades de coco tolerantes al ALC. A pesar de que Guatemala no es el centro de origen del cocotero, podría tener variedades de cocotero nativas que fuesen tolerantes a la enfermedad.

El cultivo de tejidos del cocotero sería útil para propagar rápidamente dichas variedades nativas u otras tolerantes. En México se ha encontrado algunas variedades en el Pacífico que han mostrado una alta tolerancia a la enfermedad en pruebas de campo, por lo tanto durante este proyecto se buscarían poblaciones de cocotereros en el litoral pacífico y se sembrarían sus semillas en una parcela experimental en el Atlántico. Aunque durante el período aprobado para este proyecto no se podría evaluar la tolerancia de las plantas sembradas, se ha iniciado una parcela de evaluación para investigaciones futuras. Además, si estas variedades resultaran tolerantes al ALC, se tendría una huerta madre en la región afectada para distribuir semillas y plántulas sanas de cocotereros.

Divulgar la información sobre el Amarillamiento Letal del Cocotero en Guatemala.

En este proyecto se han informado los resultados a través de talleres, seminarios y publicaciones en revistas nacionales e internacionales. La información ha estado dirigida a profesionales, agricultores, estudiantes y público en general interesado en la problemática.

Avances y resultados

Hasta ahora, la enfermedad se ha detectado únicamente en el departamento de Izabal y El Petén. En Izabal, el ALC apareció por primera vez en Punta de Manabique y Estero Lagarto, y se ha dispersado a lo largo de la costa marítima. En el 2003 se diagnosticó la enfermedad en algunos cocoteros sintomáticos en Santo Tomás de Castilla y Puerto Barrios, lo que implicaba que la enfermedad se estaba movilizándose hacia la región urbana del departamento. Sin embargo, recientemente no se han visto nuevos casos de la enfermedad en la zona urbana. En El Petén la situación del ALC aún no es definitiva. Se ha detectado palmas con ALC en este departamento, pero los casos han sido aislados y no se han podido reconfirmar. En la actualidad no se ha visto cocoteros que presenten los síntomas característicos del ALC en El Petén (ver), pero falta aún un monitoreo en donde se incluirá la zona fronteriza con Belice.

En la costa sur no se ha visto cocoteros con síntomas de ALC ni se ha detectado la presencia de fitoplasmas en las muestras que se han tomado, por lo tanto, esta región sigue estando libre de ALC.

Se tiene optimizada la técnica de detección de fitoplasmas en general usando el par de iniciadores universales *P1* y *P7*. Estos iniciadores permiten la detección de la gran mayoría de los fitoplasmas conocidos hasta el momento. Se está trabajando en la optimización de la detección de fitoplasmas en general usando el par de iniciadores *P1/Tint*; *Tint* es otro iniciador universal que en algunas ocasiones da mejores resultados que *P7*.

El diagnóstico certero del ALC se hace a través de un PCR anidado (*nested PCR*), en el que se usa el par de iniciadores *LY16Sr* y *16S503F*. Este método brinda una mayor sensibilidad que el PCR para fitoplasmas en general y sirve para el diagnóstico de todos los fitoplasmas del grupo IV, es decir, los pertenecientes al grupo del Amarillamiento Letal del Cocotero. Finalmente, la confirmación de los resultados anteriores se hace usando los iniciadores específicos para ALC denominados *LYF1* y *LYR1* (ver Figura 3).

La diferenciación de posibles cepas del fitoplasma causante del ALC se hace a través de RFLP's, empleando cuatro enzimas de restricción para el estudio de los fitoplasmas: *AluI*, *RsaI*, *HinfI* y *TaqI*. Con estas enzimas no se ha logrado detectar, hasta ahora, una variante de fitoplasmas distinta a la que se encuentra en todo el Caribe.

En cuanto a los insectos y hospederos alternos, durante el proyecto se han recolectado homópteros en las áreas afectadas por el ALC. Después de su identificación taxonómica, se ha extraído el ADN de los insectos para correr las mismas pruebas de PCR a las que se somete a las plantas. Aunque se ha identificado una gran cantidad de insectos, solamente se ha confirmado la presencia de fitoplasmas en dos muestras de *Myndus crudus*, confirmando así lo reportado en la literatura. En cuanto a otras especies hospederas, se sospecha que la conífera, *Manicaria saccifera* pudiera ser un hospedero. Esta sospecha debe ser confirmada antes de poder reportarla como una especie hospedera de la enfermedad.

En el área de cultivo de tejidos se ha logrado utilizar con éxito la técnica desarrollada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) hasta la primera fase del método. No se ha logrado producir plántulas en el laboratorio, pero se ha logrado desarrollar callos embriogénicos a partir de los cuales se debería poder obtener plántulas. Se está trabajando con distintos medios que varían en la concentración de hormonas para lograr los resultados esperados.

Durante el proyecto se ha capacitado a técnicos del MAGA en las técnicas de diagnóstico molecular para el ALC. También han sido capacitados estudiantes y técnicos del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola). Gracias a este proyecto se presentó un proyecto FACYT en el cual se contó con la presencia de investigadores del CICY y del CIRAD, se presentó a técnicos del MAGA, UVG y productores de coco los avances del proyecto y de la investigación del ALC en el Caribe. Se ha participado en congresos internacionales en los que se ha presentado la situación actual de Guatemala y se ha logrado establecer relaciones profesionales con investigadores en Florida, México, Cuba, Alemania, Inglaterra, Francia, Honduras y República Dominicana.

El reporte internacional de la presencia de ALC en Guatemala se hizo a través de una publicación (7).

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada principalmente con fondos del CONCYT en su línea AGROCYT (Contrato No. 004-2002). Se hace un reconocimiento, también, a la colaboración de los dueños de fincas con plantaciones de coco, tanto del área sur como del norte de la República de Guatemala.



1. Caída de los frutos en cualquier estadio de desarrollo.



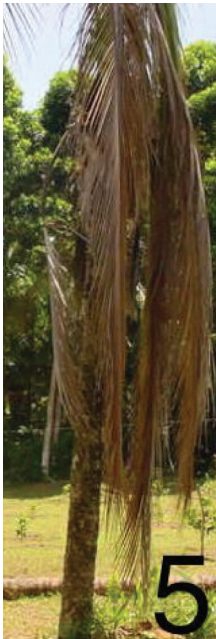
2. Necrosis de inflorescencias.



3. Amarillamiento de hojas inferiores.



4. Amarillamiento de hojas superiores.



5. Caída de hojas y muerte de la palma.



Figura 1. Sintomatología del Amarillamiento letal del cocotero en Guatemala

Figura 2.
Sintomatología de la
Papa Rayada



1.
Marchitamiento
general de la
planta.



2.
A veces
aparecen
manchas
púrpuras en las
hojas.



3.
Aparición de tubérculos aéreos y necrosis
en la parte inferior del tallo.



4.
Manchas de color café cerca de los extremos de los
tubérculos y coloración rosada en la unión del estolón
(síntoma de "omblijo rosado").

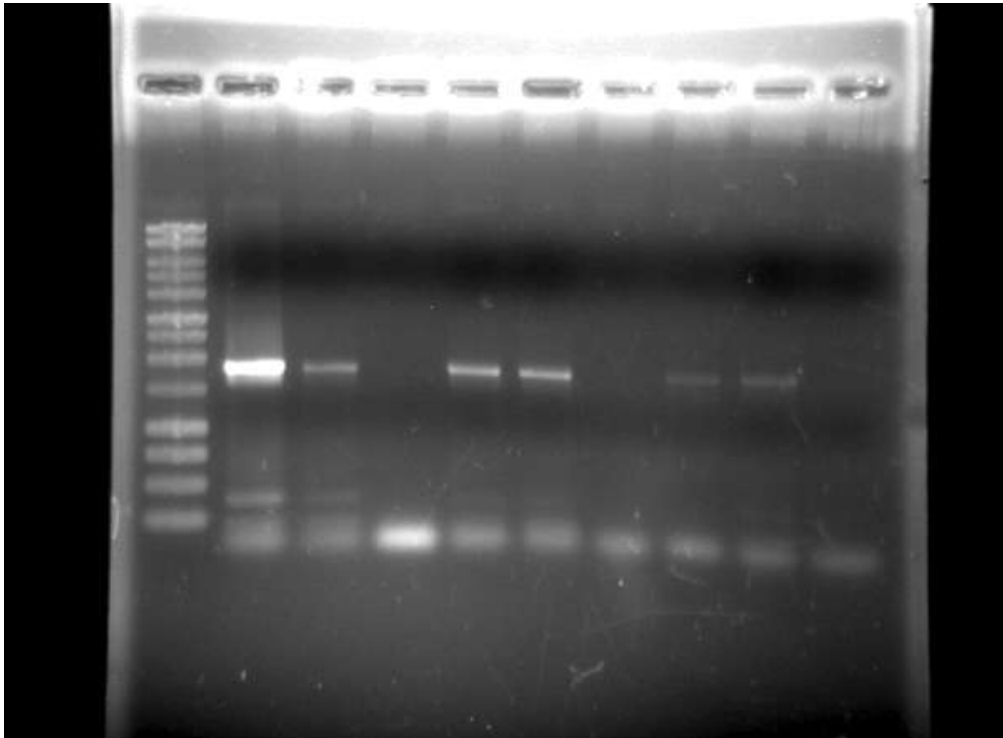


Figura 3.
Resultado
de una
prueba de
PCR.

Pozo 1: Marcador de tamaño molecular de ADN de 1Kb.

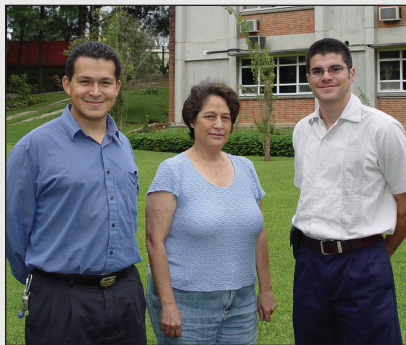
Pozos 2 y 3: Control positivo para fitoplasmas.

Pozo 4: Control negativo para fitoplasmas.

Pozos 5, 6, 8 y 9: Muestras de coco infectadas con ALC.

Pozos 7 y 10: Muestras de coco sanas.

Los resultados positivos se visualizan como bandas de aproximadamente 1.8 kb; la ausencia de las bandas sugiere un resultado negativo.



Lic. Inf. Fredy. Mejía, Investigador
fmejia@uvg.edu.gt;

Lic. Margarita Palmieri, Directora
palmieri@uvg.edu.gt;

Lic. Irwin Donis, Colaborador
irwin_donigon@yahoo.com;

Laboratorio de Protección Vegetal,
Centro de Estudios Agrícolas y
Forestales del Instituto de
Investigaciones de la Universidad
del Valle de Guatemala

Bibliografía

1. Jones, P. et al. *Phytoplasma Plant Pathogens* in: Waller, J.M. et al. (eds.) *Plant Pathologist's Pocketbook* CAB International, 2002
2. Seemüller, E. et al. *Current status of molecular classification of the phytoplasmas* Journal of Plant Pathology 80: 3-26, 1998
3. Lee, I.-M. et al. *Phytoplasmas: Phytopathogenic Mollicutes* Annu. Rev. Microbiol. 54: 221-255, 2000
4. Wei, W. et al. *In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission* Phytopathology 94: 244-250, 2004
5. Kakizawa, S. et al. *Cloning and expression analysis of phytoplasma. Protein translocation genes* Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 1043-1050, 2001
6. Leyva-Lopez, N. E. et al. *Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México* Can. J. Microbiol. 48: 1062-1068, 2002
7. Mejía, F. et al. *First report of coconut letal yellowing disease in Guatemala* The British Society for Plant Pathology. New Disease Reports.
<http://www.bspp.org.uk/ndr/july2004/2004-28:asp>