

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



DETECCION Y COMPARACION MOLECULAR
DE FITOPLASMAS PRESENTES EN COCOTERO
(*Cocos nucifera* L.) EN SEIS ESTADOS DE LA COSTA
PACIFICO Y UNO DEL GOLFO DE MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRONOMO

PRESENTA:
PABLO ABNER MONTELONGO RAMOS

MARIN, N. L.

JULIO DEL 2002

TL
SB608
.C58
M6
2002
c.1



1080124513

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN Y COMPARACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS
PRESENTES EN COCOTERO (*Cocos nucífera* L.) EN SEIS
ESTADOS DE LA COSTA PACÍFICO Y UNO DEL GOLFO DE
MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTA

PABLO ABNER MONTELONGO RAMOS

Marín, N.L.

Julio del 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN Y COMPARACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS
PRESENTES EN COCOTERO (*Cocos nucífera* L.) EN SEIS
ESTADOS DE LA COSTA PACÍFICO Y UNO DEL GOLFO DE
MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTA

PABLO ABNER MONTELONGO RAMOS

Marín, N.L.

Julio del 2002

TL

SB608

C58

M6

2002

**DETECCIÓN Y COMPARACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS
PRESENTES EN COCOTERO (*Cocos nucifera* L.) EN SEIS
ESTADOS DE LA COSTA PACÍFICO Y UNO DEL GOLFO DE
MÉXICO**

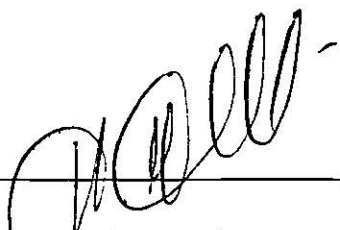
ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ
PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO
DE

INGENIERO AGRÓNOMO

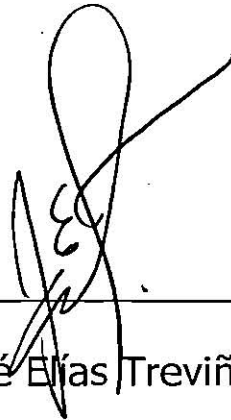
COMITÉ PARTICULAR



Dr. Omar G. Alvarado Gómez
Director de Tesis



Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón
Asesor



M.C. José Elías Treviño Ramírez
Asesor

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	III
INDICE DE CUADROS.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Importancia económica y social del cocotero.....	4
2.2 Amarillamiento Letal del Cocotero.....	6
2.2.1 Sintomatología.....	7
2.2.2 Agente causal y vectores asociados.....	7
2.2.3 Hospederos.....	9
2.2.4 Distribución geográfica y situación actual en México.....	9
2.3 Métodos de diagnóstico.....	11
2.3.1 Microscopía electrónica.....	11
2.3.2 Tratamiento selectivo con antibióticos.....	12
2.3.3 Microscopía de fluorescencia.....	12

	Pág.
2.3.4 Sondas moleculares.....	13
2.3.5 PCR.....	13
2.3.5.1 PCR-RFLP.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Fuente de fitoplasmas y muestreo de árboles.....	17
3.2 Extracción de DNA	19
3.3 Reacción en cadena de la polimerasa	20
3.3.1 Comparación de iniciadores	20
3.3.2 Condiciones de reacción	21
3.3.3 Electroforesis en geles de agarosa	22
3.4 Análisis de restricción de productos de PCR	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Extracción de DNA.....	24
4.2 PCR y PCR anidado.....	25
4.3 Comparación de fitoplasmas.....	29
V. CONCLUSIONES	34
VI. LITERATURA CONSULTADA	35
VII. APÉNDICE.....	40

DEDICATORIA

A mis padres, Pablo Montelongo Bonilla y Griselda Ramos de Montelongo, gracias por su invaluable apoyo, amor, confianza y claro, por seguir siendo mis mejores maestros a tantos kilómetros de distancia, los quiero mucho.

A mis hermanos, Ricardo (Rica) y Arturo (Conchio) por alentarme a continuar en la búsqueda de más éxitos en esto que llamo un sueño, mi vida. Gracias de todo corazón hermanos.

A mis abuelos, Cirilo, Marcelino, Adela y Maria Luisa†, de quienes he aprendido que en esta vida el éxito se da con base en la voluntad y el esfuerzo, gracias abuelos.

A mi tío Enoch†, por todos esos momentos tan especiales en mi niñez.

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y desempeñarme en lo que más me gusta. Muchas gracias Señor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Omar Alvarado asesor principal de esta tesis muchas gracias por tan gran disposición y apoyo al colaborar en este trabajo.

Dr. Ramiro González Garza, gracias por las facilidades y prestaciones del laboratorio Biociencia S.A de C.V.

M.C. Ma. de la Luz, Dr. Gerardo de Lira, Dr. Fco. Zavala, M.C. José Elías Treviño, Ing. José Quintanilla, Dr. Emilio Olivares, Dr. Hazael Gutiérrez, Ing. Fernando Gómez Triana y el DAE UANL, gracias por su gran amistad y apoyo.

A compañeros especiales de Agronomía UANL, Yadelí Arenas (Coca Cola), Rafael Solís (Raspas), Félix Gil (Moustro), Doña Tere y Don Arturo, Manuel Loera, Arturo Puente (Vera), Fco. Javier de Alejandro (Montes), Ricardo Martínez (Chiapo), Verónica Ancona, gracias a todos, por todo el apoyo y momentos tan especiales en estos años y los que faltan.....

A Dora, gracias por ayudarme en casa durante mis estudios en Monterrey, sinceramente, gracias Dora.

A mis amigos de siempre, Waldemar Velásquez (Valde), Jorge Luis Ramos (Coco), Billy Sandoval (Billicio), Juan Merlín (Marco), Ana Laura (Shak).

A todas mis amistades y familia del famoso pueblo de Pochutla ya saben que aunque estamos un poco lejos, siempre nos recordamos. A compañeros de escuela, maestros y a todos aquellos que directa e indirectamente han estado presentes en mi vida estudiantil, gracias totales.

Al Hospital Universitario (UANL), en especial al Dr. Pedro Martínez y Dr. Anzer.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AL	Amarillamiento Letal
<i>A</i> / <i>u</i> I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia AG↓CT
°C	Grados centígrados
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil-amonio. , Bromuro de hexadeciltrimetil-amonio
DAPI	4',6-diamidin-2-fenilindole.2HCL
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucléosidos trifosfatados
EDTA	Etilendiaminotetracetato disódico
<i>et al.,</i>	Y colaboradores
g	Gramos; gravedades
Ha	Hectárea
HCl	Ácido clorhídrico
M	Concentración molar
<i>Mbo</i> I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia ↓GATC
<i>Mbo</i> II	Enzima de restricción que reconoce la secuencia GAAGA
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Concentración micromolar
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
OTM's	Organismos tipo micoplasma
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pmoles	Picomoles
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
seg	Segundos
16S	Ácido ribonucleico ribosomal con coeficiente de sedimentación 16
23S	Ácido ribonucleico ribosomal con coeficiente de sedimentación 23
TBE	Solución amortiguadora tris-borato-EDTA
TE	Solución amortiguadora tris-EDTA
Tris	Tris hidroximetilaminometano-Trizma base
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
%	Por ciento

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1.- Superficie sembrada con cocotero en la República Mexicana.....	5
2.- Especies de palmas susceptibles al AL.....	10
3.- Localidades de muestreo de las palmas de cocotero utilizadas para la detección y comparación de fitoplasmas.....	18
4.- Secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación parcial del genoma de fitoplasmas presentes en palmas de cocotero colectadas en diferentes localidades.....	20
5.- Programas térmicos utilizados para la amplificación del DNA de los fitoplasmas presentes en cocotero.....	21

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.- DNA genómico de cocotero (<i>Cocos nucifera</i> L.) colectado en diferentes regiones de la República Mexicana.....	25
2.- Amplificación de fitoplasmas por PCR utilizando los iniciadores P1/Tint y DNA de cocotero muestreado en diferentes estados de la República Mexicana.....	27
3.- Amplificación de fitoplasmas por PCR anidada utilizando los iniciadores fU5/rU3 a partir de productos de P1/Tint.....	28
4.- Amplificación de fitoplasmas por PCR anidada utilizando los iniciadores 503f/LY16Sr a partir de productos de P1/Tint.....	29
5.- Perfiles de restricción de productos de PCR, utilizando los iniciadores P1/Tint y digeridos con la enzima <i>A/</i> u I en muestras de cocotero de diferentes estados de la República Mexicana.....	31
6.- Perfiles de restricción de productos de PCR con los iniciadores fU5/rU3 y digeridos con la enzima <i>Mbo</i> I.....	32
7.- Perfiles de restricción de productos de PCR con los iniciadores fU5/rU3 y digeridos con las enzimas <i>Mbo</i> I y <i>Mbo</i> II.....	32

8.- Simulación de amplificación por PCR de una parte del genoma del fitoplasma causal del AL utilizando las accesiones U18747 y AF024639 como secuencias molde, y los iniciadores P1, Tint, fU5, rU3, 503f y LY16Sr.....	40
9.- Secuencias genómicas asociadas con el síndrome de AL, disponibles en el Genbank.....	41

RESUMEN

Con la finalidad de generar información acerca de la ocurrencia y diseminación de la enfermedad Amarillamiento Létal (AL) del cocotero (*Cocos nucifera* L.) en la región costa del Pacífico Mexicano, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1) Detección de fitoplasmas en palmas de cocotero establecidas en la costa Pacífico, y 2) Comparación molecular de los fitoplasmas hospedantes de las palmas de cocotero en seis estados de la costa Pacífico, con los del estado de Veracruz en el Golfo de México. Para la detección de fitoplasmas se utilizaron las técnicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR anidada. Con los iniciadores P1/Tint que amplifican el gen 16S del RNA ribosomal (rRNA), y el espacio intergénico entre los genes 16S y 23S del rRNA, se amplificaron fragmentos de 1600 pb aprox., tanto en muestras de la costa Pacífico como del estado de Veracruz. La PCR anidada utilizando los iniciadores fU5/rU3 y 503f/LY16Sr a partir del producto de la PCR inicial con P1/Tint, mostró resultados más precisos en la detección del agente causal del AL. Los fragmentos amplificados tanto en PCR como en PCR anidada con los iniciadores antes mencionados; se sometieron a un análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando las enzimas *Alu* I, *Mbo* I y *Mbo* II, y se compararon los perfiles observados y esperados de acuerdo con simulaciones realizadas utilizando el programa DNA Strider. Con las tres enzimas de restricción mencionadas, se obtuvieron perfiles iguales en las muestras representativas de los siete estados estudiados. Con los resultados obtenidos podemos advertir la presencia de fitoplasmas en los estados de Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco y Sinaloa en la costa del Pacífico Mexicano, así como determinar que el fitoplasma encontrado en dichas regiones tiene gran similitud con el fitoplasma causal del AL que afecta a las palmas de cocotero del estado de Veracruz en el Golfo de México.

I. INTRODUCCIÓN

En México, el cocotero *Cocos nucifera* L. es un cultivo típico de las zonas costeras, se siembra desde Veracruz hasta Yucatán en el Golfo de México, y en el Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas. La superficie sembrada con este cultivo en la región del Golfo se ha visto muy afectada por la presencia del agente causal del Amarillamiento Letal, del cual se tienen evidencias que pertenece al genero *Phytoplasma* y es transmitido por un insecto vector conocido como chicharrita pálida, *Myndus crudus* Van Duzee, (Homoptera: Cixiidae) (Cordova y Narváez, 2001).

Hoy en día, la superficie de cocotero sembrada en la costa del Pacífico Mexicano también se esta viendo dañada por una enfermedad parecida al Amarillamiento Letal y se tiene la sospecha de que su agente causal este relacionado con el de la región del Golfo de México. Se han llevado a cabo diagnósticos de la enfermedad de acuerdo con la sintomatología presente en las palmas, pero este método es tardío y poco confiable, ya que algunos síntomas son similares a deficiencias nutricionales y a otras enfermedades. Recientemente, la aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades han permitido precisar los agentes causales involucrados (Ahrens y Seemüller, 1992; Chen *et al.*, 1989). La técnica de Biología Molecular comúnmente empleada para la detección y comparación de fitopatógenos es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) complementada con el análisis polimórfico en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), ambas ofrecen ventajas como mayor sensibilidad, especificidad y permiten obtener resultados rápidos, así como la comparación de diferentes patógenos con la finalidad de distinguir relaciones o diferencias genéticas entre ellos.

Debido a reportes recientes sobre la ocurrencia de síndromes parecidos a los del AL en lugares colindantes al Océano Pacífico, y a la incertidumbre sobre la

similitud del agente causal encontrado, con el que ocasiona la enfermedad en las palmeras del Golfo de México, se ha detectado la necesidad de confirmar la ocurrencia del AL y obtener información sobre la existencia de otros fitoplasmas presentes en palmas de la zona costa Pacífico, por lo cual, los esfuerzos del presente trabajo van dirigidos a la generación de información que permita confirmar la presencia del AL y/o de otros fitoplasmas en los estados de Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco y Sinaloa utilizando las técnicas de la PCR, PCR anidado, y el análisis de restricción de los productos amplificados.

1.1 HIPÓTESIS

1. La enfermedad Amarillamiento Letal se encuentra presente en las palmas de cocotero establecidas en la costa del Pacífico en México.
2. El agente causal del Amarillamiento Letal de las palmas de cocotero localizadas en el área de influencia de la costa del Pacífico y del Golfo de México, es el mismo.

1.2 OBJETIVOS

Detección y comparación de fitoplasmas presentes en palmas de cocotero establecidas en seis estados de la costa del Pacífico Mexicano y en muestras de palmas procedentes del estado de Veracruz en el Golfo de México, utilizando las técnicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR anidado y un análisis de los perfiles de restricción de sus productos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia económica y social del cocotero

México es afortunado por tener una extensa zona costera con clima adecuado para el cultivo de plantas tropicales, como el cocotero *Cocos nucifera* L. que sirve de sustento a muchos productores, además de embellecer el paisaje en los destinos turísticos. Sin embargo en los últimos seis años el cultivo de palma de coco perdió su rentabilidad, a consecuencia de lo cual disminuyó 4% la superficie plantada. Por ende, la producción de copra disminuyó 23%, al derribarse plantaciones y generar el abandono de 30 mil hectáreas, situación que dio lugar al problema social que afecta directamente a 50 mil productores y otros grupos sociales. En consecuencia, la industria procesadora de copra, que en el país emplea a cerca de ocho mil obreros, también se encuentra en crisis, pues del total de 29 fábricas, solamente 13 están en operación, y trabajan al 60% de su capacidad instalada (<http://pri.senado.gob.mx/comisiones/agricultura/28dic00propuestapalmacoco.html>).

Hasta 1982, en México la superficie cultivada con cocotero era de aproximadamente 207 mil hectáreas, actualmente esta superficie se ha reducido, sin embargo, se mantiene el primer lugar de producción en América Latina y el décimo a nivel mundial (Oropeza y Arellano, 1994). El cultivo es importante no sólo por el alto valor de su producción, calculado en más de 150 millones de pesos anuales, sino también por las más de 70 mil familias que de él dependen y por el atractivo turístico que significa (Carrillo y Piña, 1994).

Es preciso señalar que el cocotero es uno de los cultivos tropicales de gran importancia para México, en el año 2000 ocupaba 171,916 hectáreas, principalmente en las costas de Guerrero, Colima, Tabasco y Oaxaca, los cuales concentran el 88% de la superficie cultivada con cocotero en el país (Cuadro 1) .

Asimismo, la producción anual de copra asciende a 204,030 toneladas, cuyo precio es cercano a los 850 millones de pesos.

(<http://pri.senado.gob.mx/comisiones/agricultura/28dic00propuestapalmacoco.html>)

Cuadro 1. Superficie sembrada con cocotero en la República Mexicana (<http://148.223.253.103/StateLevel/Query.jsp>), (INEGI, 1998, 2000, 2001).

Estado	Superficie sembrada (Has)
Guerrero	83,938
Tabasco	26,889
Colima	24,523
Oaxaca	10,330
Michoacán	9,847
Sinaloa	6,370
Jalisco	4,396
Campeche	2,750
Chiapas	841
Nayarit	773
Yucatán	678
Veracruz	581
Total	171,916

Además del gran valor económico que representa la cosecha anual de copra, la palma de coco tiene trascendencia social, debido a que es cultivada en especial por los productores de escasos recursos y se generan numerosos empleos tanto en el campo como en la industria; por otra parte, la agroindustria nacional beneficia diversos productos del fruto del cocotero, por ejemplo: de la estopa se producen fibras para rellenar asientos de automóviles y el polvillo se usa para las macetas de

invernadero; de la cáscara dura de la nuez se produce carbón activado, mientras que de la nuez se obtienen otros productos para elaborar jabones, galletas, confitería, chocolates y harinas. Por último, el aceite de coco es el principal subproducto, el 60 % se utiliza en la industria jabonera y el 20 % para leche industrial, mientras que el resto se emplea en la elaboración de mantecas, forrajes y derivados químicos

(<http://pri.senado.gob.mx/comisiones/agricultura/28dic00propuestapalmacoco.html>).

El impacto del AL en México también ha sido turístico, ya que los estados de Yucatán y Quintana Roo que es en donde fue detectado por primera vez no son productores importantes del cocotero. Así mismo el AL representa una amenaza ecológica ya que ataca no solamente al cocotero sino también a otras 30 especies de palmas (Thomas y Norris, 1980).

2.2 Amarillamiento Letal del Cocotero

En términos generales el nombre de "Amarillamiento Letal" (AL), se refiere a la decoloración progresiva de las frondas de las palmas, que culmina con la muerte de la planta (Maramorosch y Hunt, 1981).

El AL es una enfermedad devastadora que afecta a más de 30 especies de palmas (Thomas y Norris, 1980; McCoy *et al.*, 1983; Harrison *et al.*, 1999) incluyendo al cocotero. En años recientes se ha reportado en diferentes países; México en 1979 (McCoy, 1982), Belice en 1994 (Escamilla *et al.*, 1994), Honduras en 1996 (Ashburner *et al.*, 1996) y en Guatemala 2001 (C. Oropeza, com. Personal). El efecto del AL es más notorio en el cocotero ya que es una palma muy abundante y es parte integral del paisaje de las regiones tropicales. En el caribe ha causado en los últimos cincuenta años epidemias que han matado a millones de palmas, resultando en serias pérdidas económicas para cientos de miles de familias cuyos ingresos dependen directa o indirectamente del cocotero. Esto ha sido

favorecido por la rapidez con que el AL se dispersa y el no contar con métodos eficaces para su control.

2.2.1 Sintomatología. Regularmente nos basamos en una escala de severidad de la enfermedad para determinar el grado de avance del AL, esta consta de nueve estadios que van desde la etapa de incubación hasta la muerte de la palma (McCoy *et al.*, 1983). Los aspectos principales de dicha apariencia son:

- Etapa presintomática que comienza cuando el organismo tipo micoplasma ingresa al floema de las palmas vía el insecto vector y se incuba hasta que aparece el primer síntoma visual. Se especula que esta puede durar semanas o meses.
- La caída de frutos y el necrosamiento de inflorescencias; síntoma más característico de la presencia del AL. La desventaja es que en palmas jóvenes la falta de frutos e inflorescencias relegan la aparición de hojas amarillas
- Amarillamiento de hojas inferiores, intermedias y superiores. Aunque bien se sabe que el amarillamiento de las hojas puede ser causado por varios problemas nutricionales y fitosanitarios del cultivo del cocotero.
- Tronco sin follaje (poste de teléfono).

Se ha estimado que probablemente transcurren entre la adquisición del patógeno y la aparición del primer síntoma de 7 a 15 meses, y entre el primer síntoma y la muerte de la palma de 3 a 6 meses.

2.2.2 Agente causal y vectores asociados. Los micoplasmas y fitoplasmas son organismos celulares que pertenecen a la clase *Mollicutes*, a diferencia de las bacterias no tienen pared celular y pueden pasar a través de filtros que retienen

las bacterias, contienen DNA y ribosomas, pero no tienen núcleo ni otro organelo complejo (<http://ns1.oirsa.org.sv/Di02/Di0202/Di020202/Cocotero02.htm>).

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

Estudios realizados por microscopía electrónica en los años setenta, permitieron detectar en los vasos conductores del floema de palmas con síntomas de AL la presencia de fitoplasmas, previamente conocidos como organismos tipo micoplasmas, y confirmar una relación causa-efecto de estos microorganismos con la enfermedad (Hunt *et al.*, 1974; McCoy, 1972).

Aunque morfológicamente los OTMs patogénicos de plantas son parecidos a los micoplasmas asociados con animales y otros hospederos (Tully y Whitcomb, 1979; Whitcomb y Tully, 1990), los primeros no han podido ser cultivados *in vitro*, por esta razón su origen evolutivo y diversidad genética es incierta (Namba *et al.*, 1993). Con base en lo anterior la identificación provisional de los OTMs fue basada casi completamente sobre el ámbito de hospederos, sintomatología de la enfermedad y las relaciones patógeno-vector (Lee *et al.*, 1992).

Myndus crudus Van Duzee, es la especie mas común del orden Homóptera encontrada en palmas de cocotero y en otras especies de palmas susceptibles al AL, tanto en Florida (Howard y Mead, 1980) como en Jamaica (Schuiling, 1976). Los adultos de *M. crudus*, se alimentan sobre el follaje de las palmas, pero ovipositan en el suelo (Eden-Green, 1978); las ninfas desarrollan bajo suelo y se alimentan de las raíces de los pastos, uno de los más comunes es el San Agustín. La evidencia mas convincente de que *M. crudus* es un vector del AL, fue reportado

por Harrison y Oropeza (1997), quienes detectaron al fitoplasma causante del AL en *M. crudus* por medio de PCR.

2.2.3 Hospederos. El AL, ataca por lo menos 34 especies de la familia *Palmaceae* (Cuadro 2), entre ellas el cocotero *Cocos nucifera* L., teniendo como hospedantes del vector algunas especies de las familias *Graminaceae* y *Pandanaceae* (<http://ns1.oirsa.org.sv/Di02/Di0202/Di020202/Cocotero06.htm>).

2.2.4 Distribución geográfica y situación actual en México. El AL se encuentra distribuido desde los Estados Unidos de América en Miami, pasando por México. En Centro América: Belice y Honduras. En el Caribe: Bahamas, Cuba, Jamaica, Haití, República Dominicana e Islas Caimán (<http://ns1.oirsa.org.sv/Di02/Di0202/Di020202/Cocotero01.htm>).

La enfermedad del AL del cocotero fue observada por primera vez en México en 1977 y confirmada en 1982 (McCoy, 1982), en la península de Yucatán. (McCoy *et al.*, 1983). A partir de esta fecha se ha distribuido aproximadamente 650 Km. al este y cerca de 350 Km. al sur del foco de origen.

La amenaza económica del AL en la producción coprera nacional mexicana la constituyen las costas del Golfo de México, en los estados productores de Campeche, Tabasco, Veracruz y Yucatán; estados en donde se ha comprobado la existencia del fitoplasma del AL (30,898 Has). En la costa del Pacífico, los estados de Oaxaca, Guerrero, Colima, Michoacán, Jalisco y Sinaloa (139,404 Has) tienen la sospecha de la posible presencia del agente causal del AL.

Cuadro 2. Especies de palmas susceptibles al AL.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
<i>Aiphanes lindeniana</i>	
<i>Allagoptera arenaria</i> (Gomes) O.Knutze	Palma de la Costa
<i>Arenga engleri</i> Becc.	
<i>Arikuryroba schizophilla</i> (Mart.)Bailey	Palma Arikury
<i>Acaelorrhaphe wrightii</i> H. Wendl.	Palma de Everglades o Tasiste
<i>Borassus flabellifer</i> L.	Palma Palmira
<i>Caryota mitis</i> Lour.	Palma Cola de Pescado
<i>Chrysalidocarpus cabadae</i> H.E. Moore	Palma Cabada
<i>Chrysalidocarpus lutescens</i>	Palma Areca
<i>Cocos nucifera</i> Lineaus	Palma de Coco
<i>Corypha elata</i> Roxb.	Palma Talipot o Gebang
<i>Dictyosperma album</i> (Bory) H.Mendl and Drude Ex Sch.	Palma Huracán o Princesa
<i>Gaussia attenuata</i> (O.F. Cook) Becc.	Palma Puerto Rico
<i>Gaussia maya</i>	Palma Maya
<i>Howea belmoreana</i> (Moore and Muell) Becc.	Palma Belmore
<i>Hyophorbe verschaffeltii</i> H.Wendl.	Palma Huso
<i>Latania loddigesii</i>	Palma Latan
<i>Livistona chinensis</i> (Jacq) R.Br. Ex Mart.	Palma de Abanico Chino
<i>Nannorrhops ritchiana</i> (Grif) J.E.T. Aitch.	Palma Mazari
<i>Neodypsis decaryi</i> Jumelle.	Palma Triángulo
<i>Phoenix canariensis</i> Hort. Ex Chabaud	Palma Datilera Canaria
<i>Phoenix dactylifera</i>	Palma Datilera
<i>Phoenix reclinata</i> Jacq.	Palma Reclinata
<i>Pritchardia affines</i> Becc.	Palma Kona
<i>Pritchardia pacifica</i> Seem & H. Wendl.	Palma Abanico de Fiji
<i>Pritchardia thurstonii</i> F.J.Muell & Drude	Palma Thurston
<i>Ravanea hildebrandti</i> H.Wendl Ex Bouche.	Palma Majestuosa
<i>Roystonea regia</i> (H.B.K.) O.F. Cook	Palma Real Cubana
<i>Thrinax radiata</i>	Palma Paja de Florida
<i>Veitchia merrilli</i> (Becc)H.E. Moore	Palma Manila o de Navidad
<i>Veitchia montgomeryana</i>	Palma de Montgomery
<i>Veitchia spp</i>	Palma Sunshine
<i>Washingtonia filifera</i>	Palma Abanico del Desierto
<i>Washingtonia robusta</i> H.Wendl.	Palma Washington

2.3 Métodos de diagnóstico

El surgimiento de las técnicas moleculares ha impactado a la investigación en Fitopatología, particularmente para la detección y el diagnóstico de enfermedades. En el caso de la detección y el diagnóstico de enfermedades causadas por fitoplasmas las técnicas moleculares son particularmente importantes pues estos microorganismos hasta el momento han resultado ser incultivables, lo que dificulta su detección por técnicas convencionales.

Las enfermedades producidas por fitoplasmas y Organismos Tipo Micoplasmas en general, son diagnosticadas con base en los hospederos y en los síntomas inducidos en ellos. El diagnóstico de la enfermedad AL está basado en la naturaleza del agente causal, un organismo tipo micoplasma ([//ns1.oirsa.org.sv/Di02/Di0202/Di020202/Cocotero02.htm](http://ns1.oirsa.org.sv/Di02/Di0202/Di020202/Cocotero02.htm)).

Para hacer un diagnóstico correcto del AL se tienen diversos métodos, todos ellos complementarios: Microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia, tratamiento selectivo con antibióticos, sondas moleculares de DNA y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.3.1 Microscopía electrónica. La microscopía electrónica fue la primera técnica que reveló la infección y/o presencia de OTMs en plantas e insectos (Doi *et al.*, 1969). Esta técnica no es factible de utilizarse cotidianamente en estudios de campo en reservorios de plantas o insectos vectores debido al alto costo y a que la infección de los OTMs son morfológicamente indistinguibles. Además el patógeno no es detectado por microscopía electrónica cuando se encuentra a bajas concentraciones en el tejido examinado (Harrison *et al.*, 1994). En consecuencia para estudios ecológicos, taxonómicos y de filogenia de los OTMs es necesario el desarrollo de ensayos sensitivos y específicos. Khadhair *et al.* (1998), utilizando la técnica de microscopía electrónica en muestras de tejido de hojas y pecíolos de plantas de perejil (*Petroselinum hortense* Hoffm) logró detectar estructuras de

fitoplasmas que pertenecen al grupo de los aster yellows, principalmente en células del floema.

2.3.2 Tratamiento selectivo con antibióticos. Después de varias décadas de investigación, aún no se dispone de un tratamiento que cure permanentemente a las plantas enfermas de AL. Estas pueden ser tratadas con antibióticos de la familia de las tetraciclinas; oxitetraciclinas (McCoy, 1982) y después de algunos meses se observa la remisión de síntomas, pero el tratamiento deberá repetirse cada tres o cuatro meses, de lo contrario los síntomas reaparecen y finalmente la palma muere. Este tratamiento no es utilizado para diagnóstico sino como medida correctiva (Hunt *et al.*, 1974).

2.3.3 Microscopía de fluorescencia. Las técnicas histoquímicas de tinción con colorantes y fluorocromos permiten detectar la presencia de fitoplasmas de forma simple y rápida en los tubos del floema en plantas enfermas. Con el colorante Dienes se puede observar la presencia de los fitoplasmas en las células del floema formando puntos o masas azuladas (Seemuller, 1976; Cazelles, 1978)

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

Khandhair *et al.* (1997) utilizó la microscopía de fluorescencia he identificó fitoplasmas en muestras condensadas de pecíolo, tallo y raíces que contenían tejidos del floema de plantas de manzanilla (*Matricaria perforata* Mérat).

2.3.4 Sondas moleculares. La problemática mas importante para el avance del estudio del AL a nivel mundial es su detección por métodos específicos. Recientemente el Dr. Nigel Harrison, de la Universidad de Florida, ha implementado el uso de sondas moleculares de DNA para la detección del AL. Esta herramienta de investigación ofrece el potencial de conocer la ecología y distribución de los OTM.

Las sondas moleculares de DNA ya fueron probadas en Yucatán y han sido capaces de hibridizar con extractos de DNA provenientes de palmas de cocotero enfermas, pero no de aquellas provenientes de palmas sanas (Escamilla *et al.*, 1994). Esta metodología de diagnóstico, aunque nueva, es específica y ofrece el potencial de ser usada para detectar y diagnosticar OTM-AL en un gran número de muestras de tejidos, no solamente de palmas, sino también de insectos. Su validación práctica es de vital importancia para efectuar el diagnóstico temprano, detectar las zonas de avance de la enfermedad, seguir su trayectoria y servirá también para decidir acerca de las medidas de control fitosanitario más adecuadas.

2.3.5 PCR. En la actualidad una de las técnicas de Biología Molecular comúnmente empleada para la detección de fitopatógenos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por todas las ventajas que ofrece, mayor sensibilidad, especificidad y permite obtener resultados rápidos. La PCR es una síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA que se lleva a cabo en ciclos térmicos.

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

Por otra parte mediante la técnica de PCR se requiere solamente de cantidades pequeñas de tejido infectado, se evitan los largos, tediosos y frecuentemente ineficientes procedimientos de separación de DNA del agente causal y del hospedero, y se reduce el tiempo de trabajo. Además esta metodología permite la obtención de sondas para el diagnóstico de ciertas enfermedades (Firrao *et al.*, 1993) y se pueden identificar directamente a los diferentes organismos tipo micoplasmas cuya secuencia ha sido amplificada si se usan iniciadores específicos (Schneider y Gibb, 1997; Stanoz *et al.*, 1997).

La técnica de PCR ha manifestado un gran avance en la capacidad para detectar e identificar si más de un tipo de organismo tipo micoplasma esta asociado con una determinada enfermedad, o si una planta o insecto hospedero es doblemente infectado por un segundo organismo tipo micoplasma (Namba *et al.*, 1993).

Smart *et al.* (1996), desarrolló iniciadores de PCR para identificar grupos específicos de fitoplasmas de acuerdo con el espacio intergénico de los genes 16S y 23S rRNA de fitoplasmas, entre ellos están los iniciadores P1/PYLR que detectan todos los miembros del grupo proliferación del manzano y los fPD/rPDS los cuales detectan únicamente los fitoplasmas que pertenecen al grupo declinamiento del peral.

Almeyda (1997) realizó estudios para evaluar la especificidad de los iniciadores MMF/MMR, R16F2/R16R2, R16F2/MMR, P1/P7 y P1/Tint en DNA blanco proveniente de tejidos de cocotero (*Cocos nucifera* L.), cempaxúchitl (*Tagetes erecta*) y yuca. Los iniciadores R16F2/R16R2 dieron una reacción positiva en todas estas especies. Estos resultados demostraron la universalidad de estos iniciadores que amplifican todos los fitoplasmas que se someten a prueba. Por otra parte Ceballos (2001) utilizó los iniciadores fU5/rU3 y obtuvo una reacción positiva cuando utilizó DNA de teresita (*Catharanthus roseus* L.), cocotero (*Cocos nucifera*

L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.), observando un producto de 900 pb aproximadamente.

2.3.5.1 PCR-RFLP. La técnica de PCR-RFLPs considera la amplificación selectiva de una región específica de una molécula de DNA y su digestión con enzimas de restricción tipo nucleasas que reconocen y cortan en una secuencia de nucleótidos específica. Con esta técnica obtenemos fragmentos de DNA de diferente tamaño que pueden variar entre individuos debido a cambios en o cerca de los sitios de restricción, así podemos ubicar un gen al correlacionar una característica con una longitud del fragmento (Brown, 1990).

El análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLPs) permite diferenciar patógenos de productos amplificados a través de la PCR. Las endonucleasas *Ssp* I y *Sfe* I mostraron los fragmentos de diferenciación de los fitoplasmas de proliferación del manzano y declinamiento del peral (Lorenz *et al.*, 1995).

Los fragmentos del genoma de fitoplasmas que infectan al cocotero, cempaxúchitl y teresita, amplificados por PCR utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, y que fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR* I, presentan el mismo patrón de fragmentos, siendo imposible distinguir diferencia entre ellos (Almeyda, 1997). Estos resultados confirman que realmente se amplificó el gen 16S rRNA de fitoplasmas y concuerdan con los resultados obtenidos por Schneider *et al.* (1993), quienes indican que todos los aislados de diferentes OTMs que fueron sometidos al análisis de restricción muestran un sitio único de corte para *EcoR* I, sin embargo cuando el producto fue digerido con la enzima de restricción *Afu* I, se observaron dos fragmentos de restricción.

Gibb *et al.* (1996), analizó por medio de RFLP productos de 1800 pb digeridos con las enzimas *Alu* I, *Rsa* I y *Mse* I y observó que las enfermedades presentes en papaya (*Carica papaya* L.); yellow crinkle y mosaico que son causadas por fitoplasmas, presentaban el mismo perfil de restricción, concluyendo que el agente causal es similar en dichas enfermedades.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, localizado en el municipio de Marín, Nuevo León.

3.1 Fuente de fitoplasmas y muestreo de árboles

Se utilizaron 35 muestras de palmas de cocotero colectadas durante los años 2001 y 2002 en siete estados de la República Mexicana; seis de ellos localizados en la costa del Pacífico; Oaxaca, Guerrero, Colima, Jalisco, Michoacán y Sinaloa; y Veracruz, ubicado en la costa del Golfo de México (Cuadro 3). En todos los casos se utilizaron cinco muestras individuales de tejido vegetal (por cada estado) obtenidas a partir del tallo en forma de aserrín, excepto en las muestras de Veracruz, en donde se utilizaron meristemos apicales.

Para la obtención de muestras se siguió el procedimiento recomendado por Oropeza *et al.* (2001), que consiste en utilizar un taladro para hacer un orificio en el tronco de 5/8 de pulgada de diámetro y 10 cm de profundidad aproximadamente a 1.5 m de altura del suelo. Las virutas resultantes se colectaron en una bolsa de plástico limpia abajo del sitio donde se hizo el orificio evitando hacer contacto de las virutas con las manos ya que éstas son el tejido de donde se extraerá el DNA para análisis. Una vez tomadas las muestras del tronco de una palma, la broca se lavó con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% y después se enjuagó con agua. Esta operación se realizó antes de hacer un orificio en otra palma para evitar contaminación cruzada de una palma a otra.

Cuadro 3. Localidades de muestreo de las palmas de cocotero utilizadas para la detección y comparación de fitoplasmas.

# de muestra	Estado	Municipio
1	Oaxaca	Pinotepa nacional
2		San Pedro Mixtepec
3		Santa María Colotepec
4		Matias Romero
5		Juchitán
6	Guerrero	Teniente José Usueta
7		La Unión
8		Petatlán
9		Tecpan
10		Coyuca
11	Michoacán	Lázaro Cárdenas
12		
13		
14		
15		
16	Sinaloa	Escuinapa
17		
18		
19		Rosario
20		
21	Colima	Tecomán
22		
23		
24		Cuyutlán
25		
26	Jalisco	Cihuatlán
27		
28		
29		
30		
31	Veracruz	Tamiahua
32		Tuxpan
33		Tecolutla
34		Alto Lucero
35		Lerdo de Tejada

Una vez obtenidas las muestras se marcaron las bolsas con la información correspondiente a la localidad, número de muestra y fecha de muestreo, usando un plumón de tinta permanente, y se colocaron en una hielera para su transportación al laboratorio.

3.2 Extracción de DNA

Para la extracción del DNA total se utilizó el procedimiento de Doyle y Doyle (1990) modificado, que consistió en lo siguiente: Se pesaron 0.2 g de tejido fresco en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, se agregaron 400 µl de solución de extracción precalentada a 60°C (CTAB a una concentración del 2% p/v, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, polivinilpirrolidona 40,000 1% p/v). Previamente a la solución de extracción se le agregó la cantidad requerida de β-mercaptoetanol para obtener la solución a una concentración final del 0.2%, se homogenizó la solución y se incubó durante 30 min a 60°C, mezclando ocasionalmente.

Al extracto se le agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suave pero completamente y se centrifugó a 5000 g durante 5 min. Se extrajo la fase acuosa y se le agregó un volumen de la solución de precipitación (CTAB 1% p/v, Tris-HCl 50 mM pH 8 y EDTA 10 mM pH 8), y se centrifugó por 5 min a 700 g. El precipitado se resuspendió en 100 µl de solución amortiguadora con alto contenido de sales (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 mM pH 8, NaCl 1 M). El DNA se precipitó adicionándole 0.7 volúmenes de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 5000 g durante 6 min. El precipitado se lavó con 200 µl de etanol al 80%, se centrifugó a 5000 g durante 3 min, se secó por inversión y se resuspendió en 30 µl de solución amortiguadora TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0).

La cuantificación del DNA se hizo por visualización directa de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio al intercalarse entre la doble cadena

de DNA, al colocar los extractos obtenidos en un gel de agarosa al 1%, y comparando la intensidad emitida con un marcador de cantidad conocida (DNA mass ladder, Gibco, BRL).

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Se realizaron las pruebas de PCR y PCR anidado a las 35 muestras individuales colectadas en las diferentes localidades de la costa Pacífico y del Golfo de México, y se utilizaron diferentes iniciadores ó primers y programas térmicos.

3.3.1 Comparación de iniciadores. Los iniciadores utilizados en el presente trabajo se describen en el Cuadro 4. P1/Tint y fU5/rU3 se consideran universales, ya que amplifican la mayoría de los fitoplasmas, 503f/LY16Sr son más específicos al fitoplasma causal del amarillamiento letal del cocotero. Todos los iniciadores se seleccionaron de la literatura consultada previa simulación computacional de apareamiento con las secuencias molde disponibles utilizando el programa Amplify versión 1.2 (Engels, 1993) (Figura 8 del apéndice).

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación parcial del genoma de fitoplasmas presentes en palmas de cocotero colectadas en diferentes localidades.

Iniciador	Secuencia	Talla del fragmento amplificado	Referencia
P1	5'- aag agt ttg atc ctg gct cag gatt-3'	1600 pb	Smart <i>et al.</i> (1996)
Tint	5'- tca ggc gtg tgc tct aac cag c-3'		
fU5	5'- cgg caa tgg agg aaa c-3'	882 pb	Lorenz <i>et al.</i> (1995)
rU3	5'- ttc agc tac tct ttg taa ca -3'		
503f	5'- cag cag ccg cgg taa tac ata-3'	933 pb	Harrison <i>et al.</i> (1999)
LY16Sr	5'- gct tac gca gtt agg ctg tc-3'		

3.3.2 Condiciones de reacción. Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en tubos eppendorf de 200 µl los cuales contenían 2.5 µl de solución buffer 10x, 0.5 µl de desoxinucleósidos trifosfatados 10mM (PROMEGA), 2.0 µl de MgCl₂ 25mM, 20 pmoles de cada iniciador (BIO-SYNTHESIS, INC.), 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (PROMEGA), de 5 a 40 ng de DNA y se completó con agua grado mili-Q hasta 25 µl.

Para el caso de PCR directo se utilizaron los iniciadores P1/Tint, y apartir de sus productos se hicieron reacciones de PCR anidado comparando los pares de iniciadores fU5/rU3 y 503f/LY16Sr.

Las reacciones se realizaron en un termociclador Minicycler PTC-150 (MJ Research) y los programas térmicos fueron diferentes para cada par de iniciadores, de acuerdo con el Cuadro 5.

Cuadro 5. Programas térmicos utilizados para la amplificación del DNA de los fitoplasmas presentes en cocotero.

Iniciador	Etapas	Temperatura °C	Tiempo (seg)	No. de ciclos
503f/LY16Sr	Desnaturalización	94	60	1
	Desnaturalización	94	30	35
	Apareamiento	60	50	
	Polimerización	74	120	
	Extensión	74	240	1
P1/Tint	Desnaturalización	94	60	1
	Desnaturalización	94	30	35
	Apareamiento	56	50	
	Polimerización	74	80	
	Extensión	74	240	
fU5/rU3	Desnaturalización	94	60	1
	Desnaturalización	94	30	35
	Apareamiento	56	50	
	Polimerización	74	80	
	Extensión	74	240	1

Una vez concluido el proceso de amplificación se observaron los resultados utilizando la técnica de electroforesis en geles de agarosa.

3.3.3 Electroforesis en geles de agarosa. Para la preparación de los geles de agarosa al 1%, se pesaron 0.3 g de agarosa y se agregaron 30 ml solución TBE 0.5x (0.045M Tris-HCL, 0.045M ácido bórico, 1mM EDTA) se disolvió la agarosa con calor y se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 55°C, se agregaron 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcló la solución. Se depositó la solución en un molde y se colocó éste en la cámara de electroforesis (HORIZON 58, Life Technologies). Una vez solidificado el gel, se agregó solución amortiguadora TBE 0.5x, hasta cubrir el gel aproximadamente 0.5 cm y se cargaron los carriles. Las muestras de DNA o productos de PCR's fueron mezcladas con los colorantes azul de bromofenol y xilencianol, y posteriormente depositadas en los orificios dejados por el peine. Se encendió la fuente de poder (MODELO 250) a 64 volts por 5 min y luego se incrementó la corriente a 104 volts por 40 min, aproximadamente el colorante recorrió tres cuartas partes del gel. Se visualizó el gel en un transiluminador con luz ultravioleta modelo TM 10 UVP, y se fotografió el gel con una cámara instantánea Polaroid blanco y negro modelo DS 34.

En el caso de productos de PCR digeridos se siguió el mismo procedimiento, pero los geles fueron elaborados a una concentración de 1.5% con agarosa de alta resolución (SIGMA).

3.4 Análisis de restricción de productos de PCR

Para determinar si existe algún tipo de relación entre los fitoplasmas encontrados en la región de la costa Pacífico y Golfo de México, los fragmentos obtenidos con la amplificación parcial del genoma de fitoplasmas presentes en las muestras de cocotero, con los iniciadores P1/Tint y fU5/rU3 fueron sometidos a una digestión con las enzimas de restricción *Mbo* I y *Mbo* II que reconocen las secuencias /GATC y GAAGA respectivamente, así como con la enzima *Alu* I que reconoce la secuencia AGCT la cual fue utilizada únicamente con los productos de P1/Tint.

Para conocer los sitios de corte esperados, previamente se realizó una simulación de digestión con la secuencias de fitoplasmas conocidas (Fig. 9 del apéndice) y las enzimas *Mbo* I, *Mbo* II y *Alu* I, utilizando los programa DNA club y DNA Star.

Para la digestión se utilizaron 17.5 µl de producto de PCR, al cual se le agregaron 2 µl de solución amortiguadora compatible con la enzima utilizada, 0.5µl (5 unidades) de la enzima de interés, 0.2 µl de BSA (10 µg µl⁻¹) . Se mezcló y se dejó incubando por dos horas. Después se visualizaron los productos obtenidos en un gel de agarosa de alta resolución (SIGMA) al 1.5%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de DNA

El DNA obtenido a partir de todas las muestras utilizadas aplicando el método de extracción Doyle y Doyle (1990) modificado, en general fue de buena calidad pero de baja cantidad.

Las concentraciones de DNA obtenidas en las 35 muestras analizadas se encontraron en un intervalo de 1.3 a 2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido, sin embargo la muestra número 35 alcanzó una concentración de 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fig. 1), cabe mencionar que el tejido de esta muestra fue obtenido del meristemo apical o cogollo y ésta fue la que mostró mejor éxito en la extracción en cuanto a calidad y cantidad de DNA lo cual se atribuye a que éste tejido es mas joven, fresco y está en constante crecimiento, mientras que la mayoría de las muestras procedentes del tronco venían mas secas y fenolizadas. A este respecto Doyle y Doyle (1990) reconocen la importancia de utilizar material fresco para obtener mayores rendimientos de DNA, pero en nuestro caso, la distancia entre las zonas de colecta y el laboratorio favorecen el deterioro de las muestras aun y cuando son transportadas con refrigerante. A pesar de lo anterior el DNA obtenido fue suficiente para ser utilizados en las reacciones de PCR.

Almeyda (1997), utilizando también el método de extracción de Doyle y Doyle modificado (1990), en cocotero, obtuvo 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de DNA de buena calidad, a partir de muestras en las que inicialmente se tuvo problemas para el aislamiento del DNA debido al gran contenido de compuestos fenólicos.

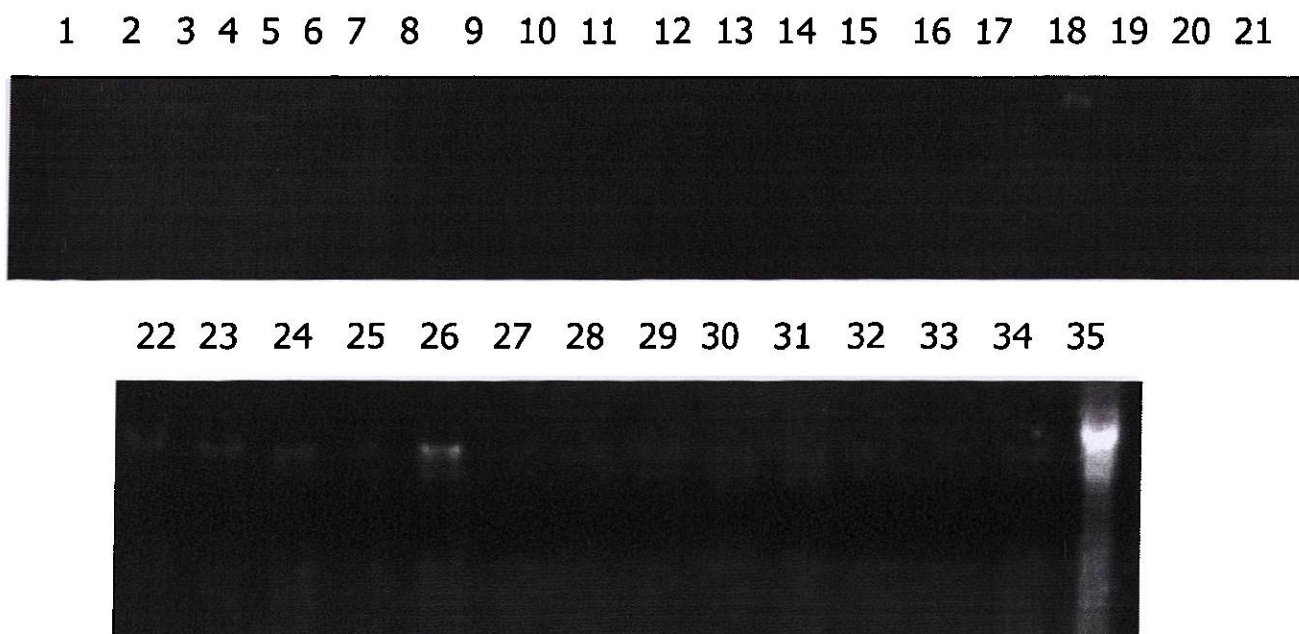


Fig. 1. DNA genómico de cocotero (*Cocos nucifera* L.) colectado en diferentes regiones de la República Mexicana. Carriles 1-34, DNA obtenido a partir de tallo; y carril 35 meristemo apical.

4.2 PCR y PCR Anidado

La prueba de PCR, se llevo a cabo con el DNA extraído de muestras del tronco y de meristemo apical del cocotero. Los iniciadores utilizados fueron: para el PCR inicial P1/Tint, y para PCR anidado fU3/rU5 y 503f/LY16Sr que amplifican el gen que codifica para el 16S RNA ribosomal de diferentes OTMs y la región intergénica del RNAt entre el gen 16S RNA Y 23S RNA en el caso del iniciador Tint.

Los iniciadores P1/Tint amplificaron fragmentos de 1600pb aproximadamente en las muestras que resultaron positivas (Fig. 2), tanto extraídas a partir de tronco como de meristemo apical, tal y como se esperaba de acuerdo con la simulación computacional realizada utilizando las secuencias moldes disponibles (Fig. 9 del apéndice) y las secuencias de los iniciadores referidos. Con las 35 muestras utilizadas se logro una amplificación en cinco de ellas, entre estas, dos colectadas en Veracruz, dos en Colima y una en Guerrero, lo anterior no

es indicativo de que las demás muestras sean negativas como se verá mas adelante con los resultados obtenidos con las reacciones de PCR anidadas. De todos los productos de PCR obtenidos con los iniciadores P1/Tint se observó que el estado de Veracruz mostró mayor intensidad de banda amplificada, esto se pudo deber al tejido utilizado para la extracción de DNA que en este caso fue meristemo apical, así como a la concentración de DNA obtenida que fue mayor al resto de las muestras.

También se visualizó un segundo grupo de muestras que amplificaron, pero a diferencia de las primeras, estas presentaron una banda más tenue, se puede suponer que pudiera ser por las cantidades de DNA molde utilizadas en las muestras de las demás localidades que fueron entre los 10 a 20 ng en comparación con las de Veracruz que tenían de 30 a 35 ng.

Un tercer grupo de muestras no mostraron amplificaciones, lo cual indica que pueden ser negativos o falsos negativos para fitoplasmas, debido a que fueron bajas las cantidades de DNA molde utilizadas, siendo en este caso de 5 ng a 15 ng muy por debajo de las del estado de Veracruz.

Almeyda (1997) al utilizar los iniciadores P1/ Tint logró reacciones positivas de PCR con DNA genómico extraído de cocotero amplificando un fragmento de 1600 pb, estos mismos iniciadores también fueron utilizados en la PCR para la detección de fitoplasmas en: maravilla (*Tagetes erecta*), papa (*Solanum tuberosum*), teresita (*Catharanthus roseus*), y mandioca (*Manihot esculenta*), en todas las especies vegetales antes mencionadas incluyendo palmas de coco sin síntomas recogidas de zonas infectadas de AL, se amplificaron fragmentos al del tamaño esperado. Esto nos indica la universalidad de los iniciadores.

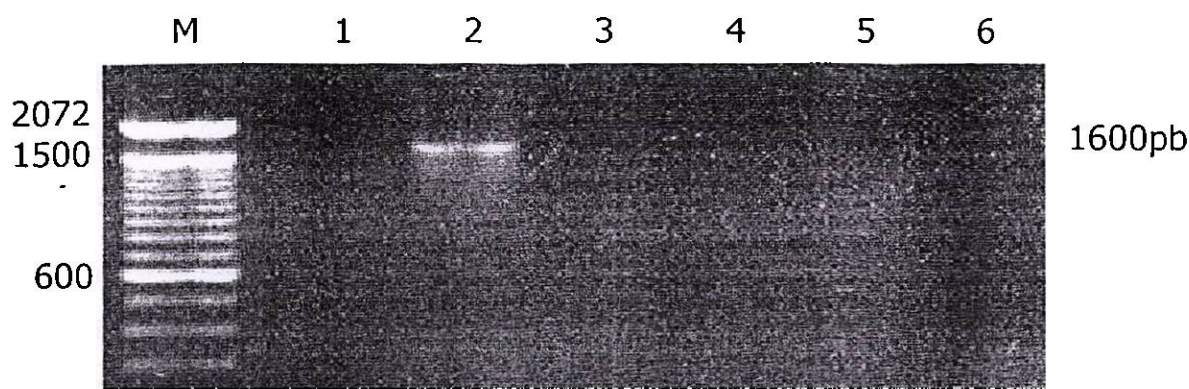


Fig. 2. Amplificación de fitoplasmas por PCR utilizando los iniciadores P1/Tint y DNA de cocotero muestreado en diferentes estados de la República Mexicana. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 (Gibco, BRL); Líneas 1 y 2 Veracruz, 3 y 4 Colima, 5 Guerrero.

En la PCR anidada se utilizaron los iniciadores fU5/rU3 y 503f/LY16Sr de manera independiente, partiendo de los productos de la PCR inicial realizada con P1/Tint. Los iniciadores fU5/rU3 tienen la característica de universalidad al unirse a secuencias molde de fitoplasmas de diferentes especies (Lorenz *et al.*, 1995), en cambio 503f/LY16Sr son considerados específicos para el agente causal de AL del cocotero (Harrison *et al.*, 1999).

En los resultados obtenidos con las 35 muestras utilizadas se encontró que 13 fueron positivas con los iniciadores fU5/rU3 y 11 positivas con los iniciadores 503f/LY16Sr. Estas muestras positivas se encontraron distribuidas en los siete estados muestreados, con una mayor incidencia en Sinaloa (3 positivos), seguido de Michoacán (3 positivos), Guerrero (2 positivos), Veracruz (2 positivos), Oaxaca (1 positivo), Colima (1 positivo) y Jalisco (1 positivo). Hay que considerar que el muestreo realizado fue heterogéneo pues mientras que en algunas regiones se dirigió a plantas sintomáticas, en otras fue general, por lo tanto, la ocurrencia de muestras positivas referida se debe tomar con la reserva del caso. También se confirmó que los fragmentos amplificados de muestras obtenidas del meristemo apical presentaban mayor concentración de fitoplasmas, ya que estos presentaban productos de gran intensidad tanto en PCR inicial como en PCR anidado. Con estos

resultados se vuelve a corroborar que los tejidos ricos en floema tienen mas presencia de fitoplasmas (Thomas y Norris, 1980).

En las reacciones de PCR directa que habían dado resultados negativos para fitoplasmas, se encontró que la mayoría eran falsos negativos ya que las mismas reacciones al ser sometidas a PCR anidado con los iniciadores fU5/rU3 (Fig. 3) y 503f/LY16Sr (Fig. 4) amplificaron fragmentos de 882 y 930 pb aproximadamente. Esto se debe a la baja concentración del DNA de fitoplasmas que se encontró en la reacción de la PCR inicial ya que al someter esta a PCR anidada la sensibilidad y especificidad de los iniciadores lograron multiplicar el DNA del patógeno. También se puede atribuir en parte a los tamaños de fragmentos obtenidos con los diferentes iniciadores, ya que P1/Tint amplifican una talla casi del doble que fU5/rU3 y 503f/LY16Sr, lo cual resta actividad a la enzima *Taq* DNA polimerasa. Con respecto a las reacciones de PCR directa que continuaron siendo negativas en PCR anidado, concluimos que son negativas, ya que ni los iniciadores fU5/rU3, ni 503f/LY16Sr, los primeros universales y los segundos específicos para el AL, fueron capaces de promover amplificaciones.

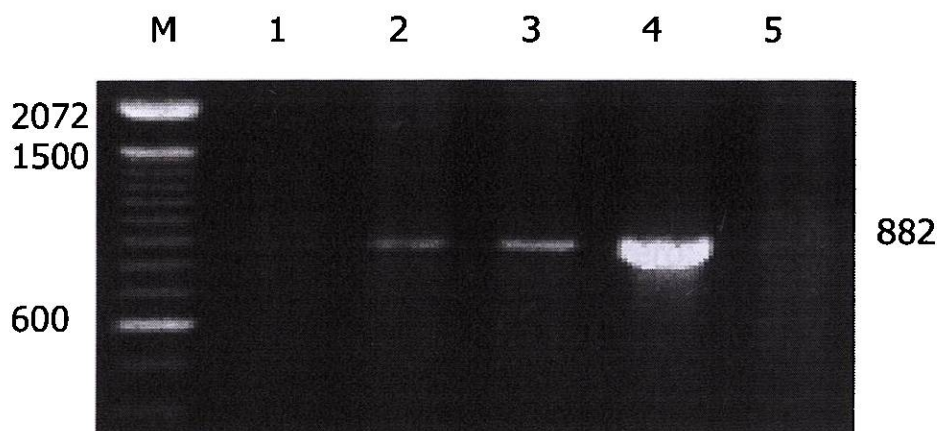


Fig. 3. Amplificación de fitoplasmas por PCR anidada utilizando los iniciadores fU5/rU3 a partir de productos de P1/Tint. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 (Gibco, BRL); Línea 1= Guerrero; Línea 2= Jalisco; Línea 3= Colima; Línea 4= Veracruz; Línea 5= Testigo negativo.

Los iniciadores 503f/LY16Sr también fueron utilizados en PCR anidado, partiendo de una PCR directa con los iniciadores P1/Tint. En algunas reacciones se obtuvieron fragmentos positivos de 930 pb y otras amplificaron tamaños diferentes al esperado (Fig. 4), se sospecha que esto haya ocurrido debido a que estos iniciadores pueden aparearse a sitios múltiples que codifican para el gen 16S RNA ribosomal del fitoplasma que infecta al cocotero como se observó en la simulación computacional. Almeyda (1997) utilizando los iniciadores R16F2/R16R2 que han sido reportados con éxito en la detección del fitoplasma asociado al AL obtuvo resultados inconsistentes y fragmentos de diferente tamaño al esperado de 1200 pb. Con los iniciadores LYF1/LYR1 que también han sido reportados con alta especificidad de apareamiento con el fitoplasma causante del AL (Harrison *et al.*, 1994b) además del fragmento esperado de 1000 pb amplificó otros fragmentos inespecíficos de diferentes tamaños.

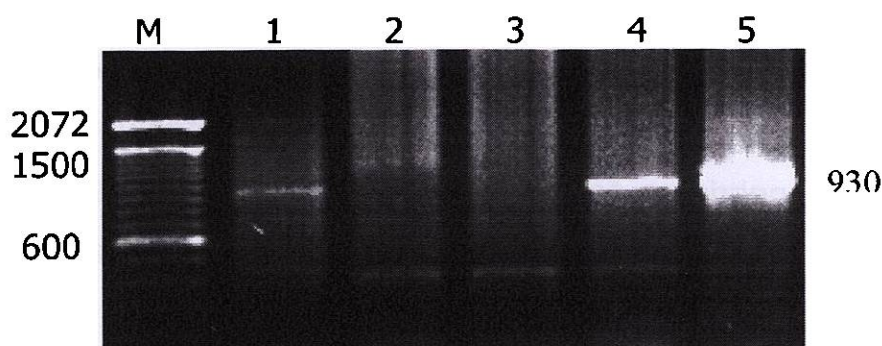


Fig. 4. Amplificación de fitoplasmas por PCR anidada utilizando los iniciadores 503f/LY16Sr a partir de productos de P1/Tint. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 (Gibco, BRL); Línea 1= Guerrero; Línea 2= Jalisco; Línea 3= Sinaloa; Línea 4= Colima; Línea 5= Veracruz.

4.3 Comparación de fitoplasmas

De las 35 muestras analizadas en el presente trabajo, 13 amplificaron con los iniciadores fU5/rU3, y de estos, 11 lo hicieron con 503f/LY16Sr. Basados en la especificidad de los iniciadores 503f/LY16Sr, pudiéramos decir que el fitoplasma

causal del AL presente en Veracruz es el mismo que el encontrado en los siete estados del Pacífico.

Buscando establecer mayor contundencia en la posible relación entre los fitoplasmas que infectan al cocotero de la región costa del Pacífico y el Golfo de México, los fragmentos que fueron amplificados en la PCR con los iniciadores P1/Tint y fU5/rU3, fueron sometidos a tratamientos de digestión con enzimas de restricción. A los productos obtenidos de la amplificación 503f/LY16Sr no se les dio este tratamiento debido a la especificidad reconocida, puesto que se dice que amplifican únicamente al amarillamiento letal y la intención de este trabajo fue en parte la detección de otros fitoplasmas presentes en las palmas de la costa Pacífico, ya que la sintomatología reportada en algunas regiones difiere de la reconocida del AL.

Los perfiles de los productos obtenidos con los iniciadores P1/Tint, al ser digeridos con la enzima *A/*u** I presentan en la Figura 5, pueden apreciarse 4 fragmentos con las siguientes tallas aproximadamente: 220, 320, 410 y 800 pb. Sumando las tallas de los 4 fragmentos mencionados se obtiene un producto de 1750 pb lo cual corresponde a la talla aproximada esperada con la amplificación de P1/Tint, confirmando que el producto inicial corresponde a una sección del fitoplasma, así como la efectividad de la digestión. Los fragmentos señalados fueron idénticos para las 5 muestras representativas, una de cada estado: Colima, Guerrero, Jalisco, Sinaloa y Veracruz, lo que nos sugiere que el fitoplasma que afecta las palmas de cocotero de la región costa del Pacífico es muy similar al del Golfo de México, ya que fueron comparados con la muestra del estado de Veracruz. Esto también nos confirman que el producto obtenido de la amplificación correspondía al esperado y es posible que en este caso el gen y la región intergénica no muestren suficiente variación al menos en los 3 sitios de reconocimiento para distinguir el fitoplasma encontrado.

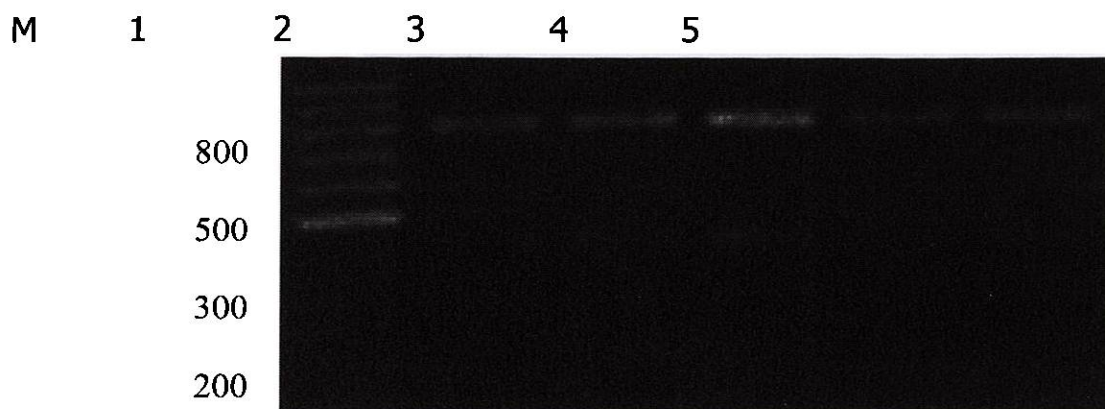


Fig. 5. Perfiles de restricción de productos de PCR, utilizando los iniciadores P1/Tint y digeridos con la enzima *A/*u I en muestras de cocotero de diferentes estados de la República Mexicana. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 (PROMEGA); Línea 1= Colima; Línea 2= Guerrero; Línea 3= Jalisco; Línea 4= Sinaloa; Línea 5= Veracruz.

Khandhair *et al.* (1998), digirió con la enzima *A/*u I, productos obtenidos de PCR a partir de muestras de perejil (*Petroselinum hortense* Hoffm) y los comparó con los de los aster yellows, sus resultados mostraron perfiles de restricción similares para el gen 16S rDNA del fitoplasma del perejil y aster yellow.

Al digerir con la enzima *Mbo* I el producto de PCR obtenido con fU5/rU3 se pudieron observar los 2 fragmentos mayores de los 4 esperados, con sus diferentes tamaños: 18, 49, 267 y 546 pb (Figs. 6 y 7), esto se pronosticó de acuerdo con la simulación computacional realizada con los programas DNA Strider y DNA club. No fue posible observar los fragmentos de 18 y 49 pb a pesar de utilizar un gel con agarosa de alta resolución (High Strength) debido a que son muy pequeños y se confunden con los iniciadores y bases no incorporadas. Este resultado junto con las digestiones con *A/*u I también soportan la idea de la similitud entre los fitoplasmas de la costa Pacífico y Golfo de México.

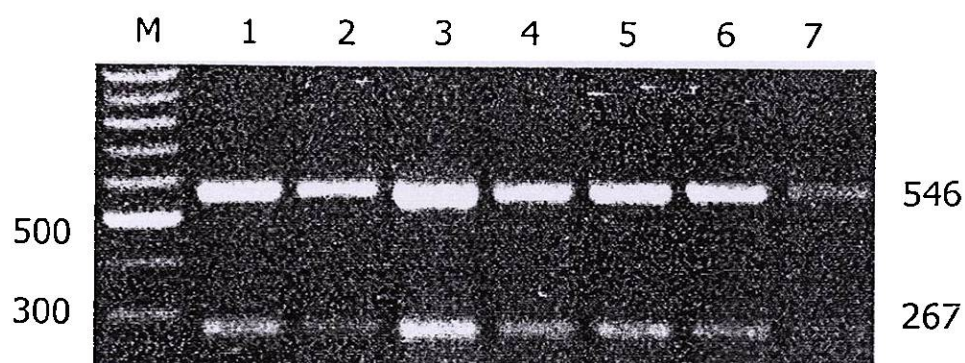


Fig. 6. Perfiles de restricción de productos de PCR con los iniciadores fU5/rU3 y digeridos con la enzima *Mbo* I. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 (PROMEGA); Línea 1= Colima; Línea 2= Guerrero; Línea 3= Jalisco; Línea 4= Sinaloa; Línea 5= Veracruz; Línea 6= Michoacán; Línea 7= Oaxaca.

Al digerir con la enzima *Mbo* II los productos obtenidos con los iniciadores fU5/rU3, los resultados mostraron los 2 fragmentos mayores de los 4 que se esperaban, con los tamaños: 3, 75, 298 y 504 pb, de acuerdo con los programas de simulación antes mencionados (Fig. 7, carriles 5;6;7).

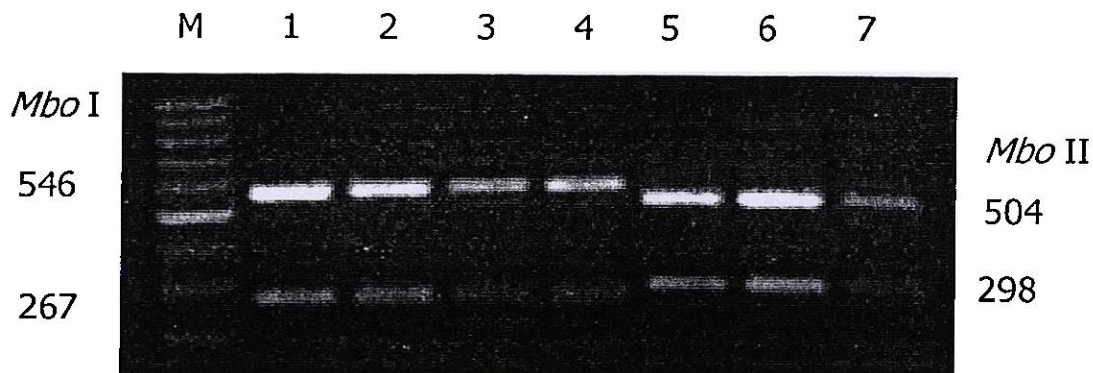


Fig. 7. Perfiles de restricción de productos de PCR con los iniciadores fU5/rU3 y digeridos con las enzimas *Mbo* I (líneas 1-4) y *Mbo* II (líneas 5-7). Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 (PROMEGA); Líneas 1 y 5= Colima; Líneas 2 y 6= Guerrero; Líneas 3 y 7= Veracruz; Línea 4= Sinaloa.

Integrando los resultados de los perfiles de restricción de las 3 enzimas utilizadas así como las amplificaciones obtenidas con los 3 juegos de iniciadores podemos concluir que existe una gran similitud entre los fitoplasmas de las dos regiones, sin embargo podemos sugerir que es necesario utilizar más muestras tanto en las reacciones de PCR como en las digestiones, así como otras enzimas

para poder dar una conclusión más certera. Indudablemente que la prueba más contundente para asegurar la similitud entre fitoplasmas sería la secuenciación de los productos, sin embargo nuestro grupo aún no está en posibilidad de llevar a cabo este trabajo.

V. CONCLUSIONES

- Con el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y los iniciadores P1/Tint, fue posible la detección de fitoplasmas hospedantes de cocotero, en muestras colectadas en los estados de Veracruz, Colima y Guerrero.
- La PCR anidada utilizando los iniciadores fU5/rU3 y 503f/LY16Sr a partir de los productos de P1/Tint, permitió una mayor sensibilidad de detección de fitoplasmas comparado con los resultados de la PCR directa a partir de P1/Tint. Permitiendo la detección de fitoplasmas en muestras procedentes de los siete estados bajo estudio: Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco, Sinaloa y Veracruz.
- El uso de las enzimas *Alu* I, *Mbo* I y *Mbo* II, permitieron comparar los perfiles de restricción generados a partir de productos de PCR obtenidos con los iniciadores P1/Tint y fU5/rU3.
- Los perfiles de restricción obtenidos en este trabajo con las tres enzimas referidas fueron idénticos en las muestras de los siete estados de la República Mexicana, advirtiéndose que el agente causal del amarillamiento letal del cocotero presente en las muestras de Veracruz, es similar al fitoplasma encontrado en las muestras de los seis estados de la costa Pacífico estudiados.

VI. LITERATURA CONSULTADA

1. Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplified a sequence of 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832
2. Almeyda L.I.H, 1997. Detección molecular de fitoplasmas y su uso en el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 88pp.
3. Ashburner, G.R., Cordova, I. y Oropeza, C.M., Illingworth, R., and Harrison, N.A. 1996. First report of coconut lethal yellowing disease in Honduras. *Plant Dis.* 80:960.
4. Brown, T.A. 1990. *Gene Cloning: an Introduction*. Second edition. 334 p.
5. Carrillo, R.H. y Piña, R.J. 1994. Investigación y algunas estrategias de manejo sobre el amarillamiento letal del cocotero en la Península de Yucatán. Folleto Técnico INIFAP-SARH-MEXICO. 26 pp
6. Cazelles, O. 1978. *Phytopathology Z.*, 91. 314-319.
7. Ceballos-Medina, F. 2001. Implementación de la técnica de PCR para el diagnóstico de punta morada (*Solanum tuberosum* L.) y su ocurrencia en la región de San Rafael, municipio de Galeana, Nuevo León. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Agronomía, UANL.
8. Chen, T.A., Lei J.D., Lin, C.P. 1989. Detection and identification of plant and insect mollicutes. *In: The Mycoplasma*, vol.5 (Eds: Whitcomb R.F. and Tully, J.G.) Academic Press, New York, 393-424).
9. Cordova I. 2000. Estudio sobre el fitoplasma causante del amarillamiento letal en el cocotero mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Tesis de maestría. Programa de postgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. CICY, Merida Yucatán 59pp.
10. Cordova I. y Narváez, M. 2001. Curso Teórico-Práctico Sobre La Detección del Fitoplasma del Amarillamiento Letal por Medio de PCR. Querétaro, Qro.

11. Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyana, H. 1969. Micoplasma or P.L.T. group-like organism found in the floem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows or paulownia witches broom. *Ann. Phytopathology Soc. Jpn.* 33:259-266.
12. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
13. Eden-Green, S.J. 1978. Rearing and transmission techniques for *Haplaxius sp.*, a suspected vector of lethal yellowing disease of coconut palms in Jamaica. *Ann. Appl. Biol.* 89:173-176.
14. Engels, B. 1993. Amplify. Versión 1.2. For analyzing PCR experiments. University of Wisconsin, Madison, WI.
15. Escamilla, J.A., Oropeza, C., Harrison, N., Alpizar, L., Cordova, I., and Islas-Flores, I. 1994. Evaluación de sondas moleculares de DNA para el estudio de organismos tipo micoplasma causantes del amarillamiento letal. Reporte de Proyecto, CONACYT, México.
16. Firrao, G., Gobbi, E., and Locci, R. 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 602-607.
17. Gibb, K.S., Persley, D.M., Schneider, B., and Thomas, J.E. 1996. Phytoplasmas associated with papaya diseases in Australia. *Plant Dis.* 80:174 –178.
18. Harrison, N.A., Cordova, I., Richardson, P., and Dibonito, R. 1999. Detection and diagnosis of lethal yellowing *In*: C. Oropeza, J.L., Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardaña and J.M. Santamaria (Eds.) *Current Advances in Coconut Biotechnology* pp 183-196 Kluwer academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
19. Harrison, N.A. and Oropeza, C. 1997. Recent studies on detection of lethal yellowing disease phytoplasmas in the Americas *In*: *Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of coconut*, Elmina, Ghana, November 1995 pp 221-234. Eden-Green and Ofori F. (eds.) Natural Resources Institute. (NRI).

20. Harrison, N.A., Richardson, P.A., Jones, P., Tymon, A.M., Eden-Green, S.J., and Mpunami, A.A. 1994. Comparative investigation of MLOs associated with Caribbean and African coconut lethal decline diseases by DNA hybridization and PCR assays. *Plant Dis.* 78:507-511.
21. Howard, F.W. and Mead, F.M. 1980. A survey of Auchenorrhyncha (Insecta: Homoptera) associated with palms in southern Florida. *Trop. Agric. (Trinidad)* 57:145-153.
22. Hunt, P., Dabek, A.J., and Schuiling, M. 1974 Remission of symptoms following tetracycline treatment of lethal yellowing infected coconut palms. *Phytopathology* 63:307-312.
23. INEGI, 1998, 2000, 2001. Anuarios Estadísticos Estatales.
24. Khadhair, A.-H., McClay, A., Hwang, S.-F. and Shah, S. 1997. Aster yellow phytoplasma identified in scentless chamomile by microscopical examination and molecular characterization. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20:55-61, 1997.
25. Khadhair, A.H., Kawchuk, L.M., Taillon, R.C., and Botar, G. 1998, Detection and molecular characterization of an aster yellows phytoplasma in parsley. *Microbiological Research* 156, 179-184.
26. Lee I.M., Davis, R.E., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C. and Schaff, D.A. 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82:977-986.
27. Lorenz, K-H, Shneider, B., Ahrens, U., and Seemüller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
28. Maramorosh, K. and Hunt, P. 1981. Lethal yellowing disease of coconut and other plants. *In: Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs*. 1st ed. Maramorosch K. and Raychaudhuri (Eds.) USA pp 185-211.
29. McCoy, R.E. 1972 Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. *Plant Dis Report* 56:1019-1021.

30. McCoy, R.E. 1982. Use of tetracycline antibiotics to control yellow diseases. *Plant Dis.* 66: 530-542.
31. McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., de Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J. Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Seemüller, E. 1989: Plant disease associated with micoplamalike organism *In: The Mycoplasmas*. Vol. 5 Spiroplasmas, Acholeplasmas, and Mycoplasmas of plant and Arthropods (Eds: Whitcomb R. F. And Tully, J.G.). Academic Press, New York, 545-640.
32. McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, RA, Eskafi, FM, Britt L., and Collins. 1983. Lethal yellowing of palms. Agricultural Experiment Stations. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville. Bulletin 834. 100pp.
33. Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaisu, H., Shiozawa, H., and Tsuchizaki, T. 1993. Detection and differentiation of plant-photogenic mycoplasmalike organism using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83: 786-791.
34. Oropeza, C. and Arellano, J. 1994. The Coconut Industry in Latin America and the Caribbean. *In: Coconut Industry into 21st Century*. Pangahas, B.B. (ed.) Pp. 33-47.. Jakarta, Indonesia: Asia and Pacific Coconut Community (APCC).
35. Oropeza, C., Cordova, I., Escamilla, J.A., Alpizar, L., Narváez, M. Harrison, N. 2001. Manual para el Muestreo, la Detección y el Diagnóstico de Amarillamiento Letal en Cocotero. Rio-CICY.
36. Russel, W.C., Newman, C., and Williamson, D.H. 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253: 461-462.
37. Saiki, R.K., Gelfand, G.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., and Horn, G. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase. *Science* 239: 487-491.
38. Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C., and Seemüller, E. 1993. Classification of plant – photogenic mycoplasma-like organism using

- restriction – site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. of Gen. Microbiology* 139:519-527.
39. Schneider, B. and Gibb, K.S. 1997. Detection of phytoplasmas in declining pears in Southern Australia. *Plant Dis.* 81:254-258.
40. Schuiling, M. 1976. A survey of insect population on *Cocos nucifera*. (Abstr.) *Principes* 20:67.
41. Seemüller, E. 1976. Investigation to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort.* 67:109-112.
42. Simone, G.W. 1992. Lethal yellowing disease. *In: Diseases and Disorders of Ornamental Palms*. Chase, A.R. and Broschat, T.K. (Eds.) APS Press St. Paul, Minnesota. Pp 16-20.
43. Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma – specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer – region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993.
44. Stanosz, G.R., Heimann, M.F., and Lee, I-M. 1997. Purple coneflower is a host of the Aster Yellows Phytoplasma. (Abstr.) *Plant Dis.* 81:424.
45. Thomas, D.L. and Norris, R.C. 1980. The use of the electron microscope for lethal yellowing diagnosis. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 93: 304 – 307.
46. Tully, J.G. and Whitcomb, R.F. (Eds.) 1979. *Human and Animal Mycoplasmas*. Vol. 2 of the *Mycoplasmas* (Academic Press, N.Y.)
47. Whitcomb, R.F. and Tully, J.G. 1990. *The mycoplasma. Spiroplasma, Acholeplasmas, and Mycoplasmas of plants and arthropods*. Academic Press, Inc. V.

VII. APENDICE

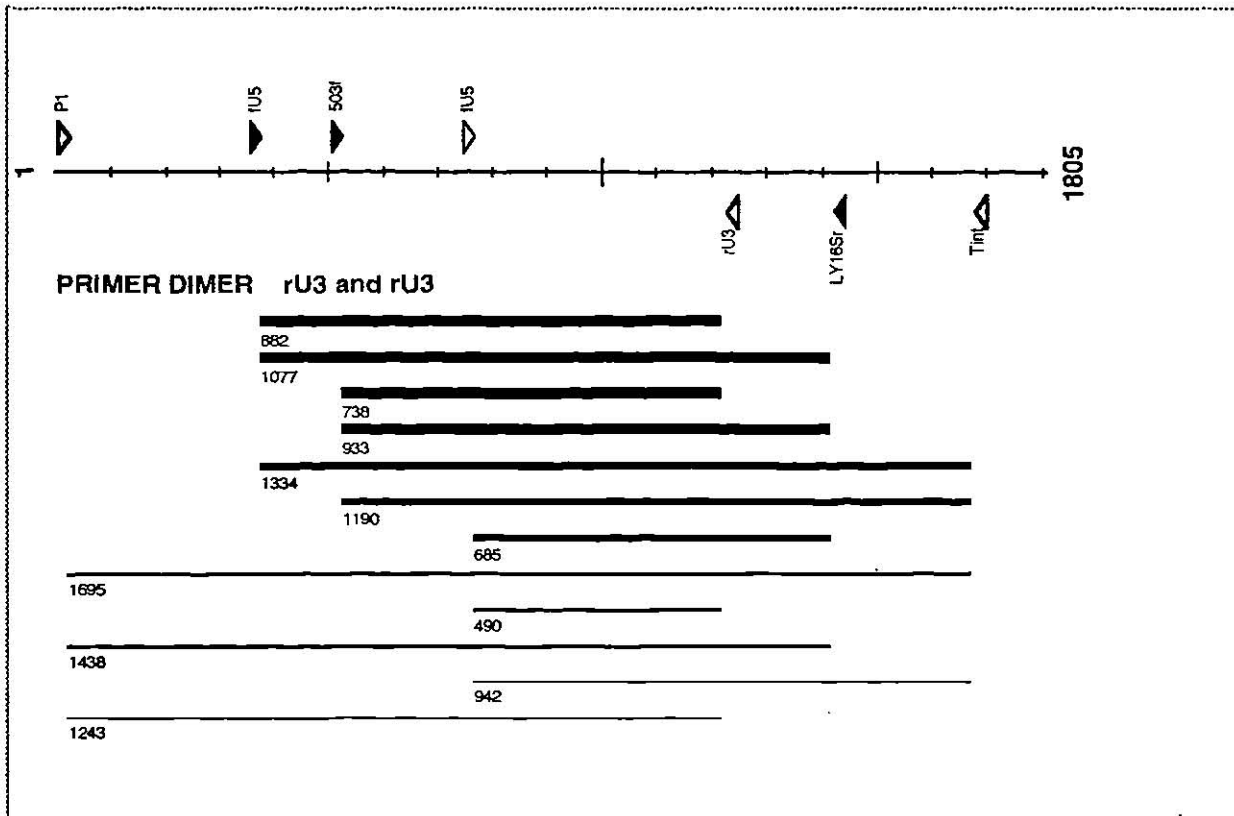


Fig. 8. Simulación de amplificación por PCR de una parte del genoma del fitoplasma causal del AL utilizando las accesiones U18747 y AF024639 como secuencias molde, y los iniciadores P1, Tint, fU5, rU3, 503f y LY16Sr.



Nucleotide

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM Books

Search Nucleotide ☐ for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenBank ☐ Save Text Add to Clipboard

Show: 20 ☐ Items 1-8 of 8 One page

1: AF498309. Coconut lethal ye...[gi:21311780]

Related Sequences, Taxonomy

LOCUS AF498309 1524 bp DNA linear BCT 02-JUN-2002
 DEFINITION Coconut lethal yellowing phytoplasma strain Florida (LY-C2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION AF498309
 VERSION AF498309.1 GI:21311780
 KEYWORDS
 SOURCE Coconut lethal yellowing phytoplasma.
 ORGANISM Coconut lethal yellowing phytoplasma
 Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales; Acholeplasmataceae; Phytoplasma; 16SrIV (Coconut lethal yellows group).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1524)
 AUTHORS Harrison,N.A., Myrie,W., Jones,P., Carpio,M.L., Castillo,M., Doyle,M.M. and Oropeza,C.
 TITLE Distinctions between phytoplasmas associated with lethal yellowing disease of palms in Jamaica and neighboring regions
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1524)
 AUTHORS Harrison,N.A. and Carpio,M.L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Research and Education Center, University of Florida, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314, USA
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1524
 /organism="Coconut lethal yellowing phytoplasma"
 /strain="Florida (LY-C2)"
 /db_xref="taxon:37369"
 /note="group: 16SrIV"
 rRNA <1..>1524
 /product="16S ribosomal RNA"
 BASE COUNT 452 a 284 c 412 g 376 t
 ORIGIN

```

1 agtttgatcc tggctcagga ttaacgctgg cggcgtgctt aatacatgca agtcgaacgg
61 aaatctttta gatttttagtg gcgaacgggt gagtaacacg taagcaacct gcctttaaga
121 cgagaataac aattggaac agttgctaag gctggatagg aaataaaaag gaatcttttt
181 atttttaaaa gacctttttc ggaaggatag cttaaagagg ggcttgcgct acattagtta
241 gttggtaggg taaaggccta ccaagacgat gatgtgtagc tggactgaga ggttgaacag
301 ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaattttcg
361 gcaatggagg aaactctgac cgagcaacgc cgcgtgaacg acgaagtact tcggtatgta
421 aagttctttt attgaagaag aaacaatagt ggaaaaacta tcttgacgtt attcaatgaa
481 taagccccgg ctaactatgt gccagcagcc gcggttaatac atagggggcg agcgttatcc
541 ggaattattg ggcgtaaagg gtgcgtaggc ggtttaataa gtctctagtt taatttcaac
601 gcttaacggt gtctgtctag agaaactggt taactagagt gagatagagg taagcggaat
661 tccatgtgta gcggtaaaat gtgtaaaat atggaggaac accagaggcg taggcggctt
721 actgggtctt tactgacgct gatgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc
781 tggtagtcca cgccgtaaac tatgagtact aagtgtcggg gttaaactcg gtactgaagt

```

```

841 taacacatta agtactccgc ctgagtagta cgtacgcaag tatgaaactt aaaggaattg
901 acgggatccc gcacaagcgg tggatcatgt tgtttaattc gaagatacac gaaaaacctt
961 accaggtcct gacatactct gcaaagctat agaaatatag tggaggttat cagggatata
1021 ggtggtgcat ggttgctcgc agctcgtgtc gtgagatgtt aggttaagtt ctaaaacgag
1081 cgcaacccct gtcgttaatt gccagcacgt tatggtgggg acttttagcga gactgccaat
1141 gaaaaattgg aggaaggtgg ggattacgtc aaatcatcat gccccttatg atctgggcta
1201 caaacgtgat acaatggcta ttacaaagag tagctgaaac gcgagttttc ggcaaatttc
1261 aaaaaaatag tctcagttcg gattgaagtc tgcaactcga cttcatgaag ttggaatcgc
1321 tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttttc ggggtttgta cacaccgccc
1381 gtcaaaccac gaaagtggac aatacccgaa agcgacagcc taactgcgta agcagaggga
1441 atcgtctaag gtagggtcga tgattggggg taagtcgtaa caaggtatcc ctaccggaag
1501 gtgggggatgg atcacctcct ttct

```

//

J2: AF498308. Coconut lethal ye...[gi:21311779]

Related Sequences, Taxonomy

LOCUS AF498308 1524 bp DNA linear BCT 02-JUN-2002
 DEFINITION Coconut lethal yellowing phytoplasma strain Florida (LYF-C5) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION AF498308
 VERSION AF498308.1 GI:21311779
 KEYWORDS .
 SOURCE Coconut lethal yellowing phytoplasma.
 ORGANISM Coconut lethal yellowing phytoplasma
 Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales; Acholeplasmataceae; Phytoplasma; 16SrIV (Coconut lethal yellows group).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1524)
 AUTHORS Harrison,N.A., Myrie,W., Jones,P., Carpio,M.L., Castillo,M., Doyle,M.M. and Oropeza,C.
 TITLE Distinctions between phytoplasmas associated with lethal yellowing disease of palms in Jamaica and neighboring regions
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1524)
 AUTHORS Harrison,N.A. and Carpio,M.L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Research and Education Center, University of Florida, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314, USA
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1524
 /organism="Coconut lethal yellowing phytoplasma"
 /strain="Florida (LYF-C5)"
 /db_xref="taxon:37369"
 /note="group: 16SrIV"
 rRNA
 <1..>1524
 /product="16S ribosomal RNA"
 BASE COUNT 451 a 284 c 412 g 37 t
 ORIGIN

```

1 agtttgatcc tggctcagga ttaacgctgg cggcgtgctt aatacatgca agtcgaacgg
61 aaatctttta gatttttagtg gcgaacgggt gagtaacacg taagcaacct gcctttaaga
121 cgagaataac aattggaaac agttgctaag gctggatagg aaataaaaag gcactctttt
181 atttttaaaa gacctttttc ggaaggtatg cttaaagagg ggcttgctgc acattagtta
241 gttggtaggg taaaggccta ccaagacgat gatgtgtagc tggactgaga gggtgaacag
301 ccacattggg actgagacac ggccaaaact cctacgggag gcagcagtag ggaattttcg
361 gcaatggagg aaactctgac cgagcaacgc cgcgtgaacg acgaagtact tcggtatgta
421 aagttctttt attgaagaag aaacaatagt ggaaaaacta tcttgacgtt attcaatgaa
481 taagccccgg ctaactatgt gccagcagcc gcggtaatac atagggggcg agcgttatcc
541 ggaattattg ggcgtaaagg gtgcgtaggc ggtttaataa gtctctagtt taatttcaac
601 gcttaacgtt gtccgtgctag agaaactgtt taactagagt gagatagagg taagcggaat
661 tccatgtgta gcggtaaaat gtgtaaatat atggaggaac accagaggcg taggcggctt
721 actgggtctt tactgacgct gatgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc
781 tggtagtcca cgccgtaaac tatgagtact aagtgtcggg gttaaaactcg gtactgaagt

```

```

841 taacacatta agtactccgc ctgagtagta cgtacgcaag tatgaaactt aaaggaattg
901 acgggatccc gcacaagcgg tggatcatgt tgtttaattc gaagatacac gaaaaacctt
961 accaggtcct gacatactct gcaaagctat agaaatatag tggaggttat cagggataca
1021 ggtggtgcct ggttgctgct agctcgtgct gtgagatggt aggttaagtt ctaaaacgag
1081 cgcaaccctt gtcgttaatt gccagcacgt tatgggtggg acttttagcg gactgccaat
1141 gaaaaattgg aggaagggtg ggattacgtc aaatcatcat gcccttatg atctgggcta
1201 caaacgtgat acaatggcta ttacaaagag tagctgaaac gcgagttttc ggcaaatctc
1261 aaaaaaatag tctcagttcg gattgaagtc tgcaactcga cttcatgaag ttggaatcgc
1321 tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttctc ggggtttgta cacaccgccc
1381 gtcaaaccac gaaagtggac aatactcgaa agcgacagcc taactgcgta agcagaggga
1441 atcgtctaag gtagggtcga tgattggggt taagtcgtaa caaggtatcc ctaccggaag
1501 gtggggatgg atcacctcct ttct

```

//

3: AF498307. Coconut lethal ye...[gi:21311778]

Related Sequences, Taxonomy

LOCUS AF498307 1524 bp DNA linear BCT 02-JUN-2002

DEFINITION Coconut lethal yellowing phytoplasma strain Jamaica (LYJ-C8) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AF498307

VERSION AF498307.1 GI:21311778

KEYWORDS .

SOURCE Coconut lethal yellowing phytoplasma.

ORGANISM Coconut lethal yellowing phytoplasma
Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
Acholeplasmataceae; Phytoplasma; 16SrIV (Coconut lethal yellows group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 1524)

AUTHORS Harrison,N.A., Myrie,W., Jones,P., Carpio,M.L., Castillo,M., Doyle,M.M. and Oropeza,C.

TITLE Distinctions between phytoplasmas associated with lethal yellowing disease of palms in Jamaica and neighboring regions

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1524)

AUTHORS Harrison,N.A. and Carpio,M.L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Research and Education Center, University of Florida, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1524
/organism="Coconut lethal yellowing phytoplasma"
/strain="Jamaica (LYJ-C8)"
/db_xref="taxon:37369"
/note="group: 16SrIV"

rRNA <1..>1524
/product="16S ribosomal RNA"

BASE COUNT 451 a 284 c 412 g 377 t

ORIGIN

```

1 agtttgatcc tggctcagga ttaacgctgg cggcgtgctt aatacatgca agtcgaacgg
61 aaatctttta gatttttagtg gcgaacgggt gagtaacacg taagcaacct gcctttaaga
121 cgagaataac aattggaaac agttgctaag gctggatagg aaataaaaag gcatcttttt
181 atttttaaaa gacctttttc ggaaggtagt cttaaagagg ggcttgctgc acattagtta
241 gttggtaggg taaaggccta ccaagacgat gatgtgtagc tggactgaga ggttgaacag
301 ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaattttcg
361 gcaatggagg aaactctgac cgagcaacgc cgcgtgaacg acgaagtact tcggtatgta
421 aagttctttt attgaagaag aaacaatagt ggaaaaacta tcttgacggt attcaatgaa
481 taagccccgg ctaactatgt gccagcagcc gcggttaata atagggggcg agcggtatcc
541 ggaattattg ggcgtaaagg gtgcgtaggc ggtttaataa gtctctagtt taatttcaac
601 gcttaacggt gtcctgctag agaaactggt taactagagt gagatagagg taagcggaat
661 tccatgtgta gcggtaaaat gtgtaaatat atggaggaac accagaggcg taggcggctt
721 actgggtcct tactgacgct gatgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc
781 tggtagtcca cgccgtaaac tatgagtact aagtgctcgg gttaaactcg gtactgaagt

```

```

841 taacacatta agtactccgc ctgagtagta cgtacgcaag tatgaaactt aaaggaattg
901 acgggatccc gcacaagcgg tggatcatgt tgtttaattc gaagatacac gaaaaacctt
961 accaggtctt gacatactct gcaaagctat agaaatatag tggagggtat cagggataca
1021 ggtggtgcat ggttgctgctc agctcgtgctc gtgagatggt aggttaagtt ctaaaacgag
1081 cgcaaccctt gtcgttaatt gccagcacgt tatggtgggg acttttagcga gactgccaat
1141 gaaaaattgg aggaagggtg ggattacgctc aaatcatcat gcccttatg atctgggcta
1201 caaacgtgat acaatggcta ttacaaagag tagctgaaac gcgagttttt ggcaaatctc
1261 aaaaaaatag tctcagttcg gattgaagtc tgcaactcga cttcatgaag ttggaatcgc
1321 tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttctc ggggtttgta cacaccgccc
1381 gtcaaaccac gaaagtggac aatacccgaa agcgacagcc taactgcgta agcagaggga
1441 atcgtctaag gtagggtcga tgattggggg taagtcgtaa caaggatatcc ctaccggaag
1501 gtgggggatgg atcacctcct ttct

```

//

J4: U18753. Yucatan coconut 1...[gi:16329167]

Related Sequences, Taxonomy

LOCUS MOU18753 1537 bp DNA linear BCT 23-OCT-2001

DEFINITION Yucatan coconut lethal decline phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION U18753

VERSION U18753.2 GI:16329167

KEYWORDS .

SOURCE Yucatan coconut lethal decline phytoplasma.

ORGANISM Yucatan coconut lethal decline phytoplasma
Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
Acholeplasmataceae; Phytoplasma; 16SrIV (Coconut lethal yellows group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 1537)

AUTHORS Harrison,N.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-DEC-1994) University of Florida, Research and Education Center, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314, USA

REFERENCE 2 (bases 1 to 1537)

AUTHORS Tymon,A.M., Jones,P. and Harrison,N.A.

TITLE Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers

JOURNAL Ann. Appl. Biol. 132, 437-452 (1998)

REFERENCE 3 (bases 1 to 1537)

AUTHORS Harrison,N.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-OCT-2001) University of Florida, Research and Education Center, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314, USA

REMARK Sequence update by submitter

COMMENT On Oct 23, 2001 this sequence version replaced gi:841194.

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..1537

/organism="Yucatan coconut lethal decline phytoplasma"

/strain="Yucatan coconut lethal decline MLO"

/specific_host="Cocos nucifera"

/db_xref="taxon:37370"

rRNA <1..>1537

/product="16S ribosomal RNA"

/evidence=experimental

BASE COUNT 453 a 285 c 415 g 384 t

ORIGIN

```

1 agtttgatcc tggctcagga ttaacgctgg cggcgtgctt aatacatgca agtcgaacgg
61 aaatctttta gagaaatctt ttagatttta gtggcgaacg ggtgagtaac acgtaagcaa
121 cctgccttta agacgagaat aacaattgga aacagttgct aaggctggat agggaaataaa
181 aaggcatctt tttattttta aaagaccttc ttcggagggt atgcttaaag aggggcttgc
241 gtcacattag ttagttggta gggtaatggc ctaccaagac gatgatgtgt agctggactg

```

```

301 agaggttgaa cagccacatt gggactgaga cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag
361 tagggaattt tcggcaatgg aggaaactct gaccgagcaa cgccgcgtga acgacgaagt
421 acttcggtat gtaaagttct tttattgaag aagaaacaat agtggaaaaa ctatcttgac
481 gttattcaat gaataagccc cggctaacta tgtgccagca gccgcggtaa tacatagggg
541 gcgagcggtt tccggaatta ttgggcgtaa aggtgcgta ggcggtttaa taagtctcta
601 gtttaatttc aacgcttaac gttgtcctgc tagagaaaact gtttgactag agtgagatag
661 aggtaagcgg aattccatgt gtagcggtaa aatgtgtaaa tatatggagg aacaccagag
721 gcgtaggcgg cttactgggt ctttactgac gctgatgcac gaaagcgtgg ggagcaaaaca
781 ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aactatgagt actaagtgtc ggggttaaac
841 tcggtactga agttaacaca ttaagtactc cgctgagta gtacgtacgc aagtatgaaa
901 cttaaaggaa ttgacgggat cccgcacaag cggtgatca tgttggttaa ttcgaagata
961 caccgaaaaac cttaccagggt cttgacatac tctgcaaaac tatagaaata tagtggaggt
1021 tatcagggat acagggtgggt catggttggt gtcagctcgt gtcgtgagat gttagggttaa
1081 gttctaaaac gagcgcaacc cctgtcgtta attgccagca cgttatgggt gggacttttag
1141 cgagactgcc aatgaaaaat tggaggaagg tggggattac gtcaaatacat catgcccctt
1201 atgatctggg ctacaaacgt gatcaaatgg ctattacaaa gagtggctta aacgcgagtt
1261 ttgggcaaat ctcaaaaaaa tagtcttagt tcggattgaa gtctgcaact cgacttcatt
1321 aagttggaat cgctagtaat cgcgaatcag catgtcgcgg tgaatacgtt ctcgggggtt
1381 gtacacaccg cccgtcaaac caccgaaagt gacaataccc gaaagcgata gcctaactgc
1441 gcaagcagag ggaatcgctt aaggtagggt cgatgattgg gggttaagtcg taacaaggta
1501 tccctaccgg aaggtgggga tggatcacct cctttct

```

//

5: U18747. Coconut lethal ye...[gi:841193]

Related Sequences, Taxonomy

LOCUS MOU18747 1524 bp DNA linear BCT 03-APR-2000

DEFINITION Coconut lethal yellowing phytoplasma 16S ribosomal RNA (16S rRNA) pseudogene, partial sequence.

ACCESSION U18747

VERSION U18747.1 GI:841193

KEYWORDS .

SOURCE Coconut lethal yellowing phytoplasma.

ORGANISM Coconut lethal yellowing phytoplasma
Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
Acholeplasmataceae; Phytoplasma; 16SrIV (Coconut lethal yellows group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 1524)

AUTHORS Harrison,N.A., Kramer,J.B., Richardson,P.A., Smart,C.D. and Tsai,J.H.

TITLE PCR amplification and analysis of 16S rDNA of mycoplasma-like organisms associated with coconut lethal decline diseases

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1524)

AUTHORS Harrison,N.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-DEC-1994) Nigel A. Harrison, University of Florida, Research and Education Center, 3205 College Avenue, Fort Lauderdale, FL 33314 USA

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..1524

/organism="Coconut lethal yellowing phytoplasma"

/strain="Coconut lethal yellowing MLO"

/specific_host="Veitchia merrillii"

/db_xref="taxon:37369"

gene <1..>1524

/gene="16S rRNA"

rRNA <1..>1524

/gene="16S rRNA"

/product="16S ribosomal RNA"

/pseudo

/evidence=experimental

BASE COUNT 451 a 285 c 412 g 376 t

ORIGIN

```

1 agtttgatcc tggetcagga ttaacgctgg cggcgtgctt aatacatgca agtcgaacgg
61 aaatctttta gatttttagtg gcgaacgggt gagtaacacg taagcaacct gcctttaaga
121 cgagaataac aattggaaac agttgctaag gctggatagg aaataaaaag gcactctttt
181 atttttaaaa gacctttttc ggaaggtatg cttaaagagg ggcttgcgtc acattagtta
241 gttggtaggg taaaggccta ccaagacgat gatgtgtagc tggactgaga ggttgaacag
301 ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaattttcg
361 gcaatggagg aaactctgac cgagcaacgc cgcgtgaacg acgaagtact tcggtatgta
421 aagttctttt attgaagaag aaacaatagt ggaaaaacta tcttgacgtt attcaatgaa
481 taagccccgg ctaactatgt gccagcagcc gcggtaatat atagggggcg agcgttatcc
541 ggaattattg ggcgtaaagg gtgcgtaggc ggtttaataa gtctctagtt taatttcaac
601 gcttaacggt gtcctgctag agaaactgtt taactagagt gagatagagg taagcggaat
661 tccatgtgta gcggtaaaat gtgtaaatat atggaggaac accagaggcg tagggcgctt
721 actgggtctt tactgacgct gatgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc
781 tggtagtcca cgccgtaaac tatgagtact aagtgtcggg gttaaactcg gtactgaagt
841 taacacatta agtactccgc ctgagttaga cgtacgcaag tatgaaactt aaaggaattg
901 acgggatccc gcacaagcgg tggatcatgt tgtttaattc gaagatacac gaaaaacctt
961 accagggtctt gacatactct gcaaagctat agaaatatag tggaggttat cagggataca
1021 ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgtc gtgagatgtt aggttaagtt ctaaaacgag
1081 cgcaacccct gtcgttaatt gccagcacgt tatggtgggg acttttagcg gactgccaat
1141 gaaaaattgg aggaagggtg ggattacgtc aaatcatcat gcccttatg atctgggcta
1201 caaacgtgat acaatggcta ttacaaagag tagctgaaac gcgagttttc ggcaaattctc
1261 aaaaaaatag tctcagttcg gattgaagtc tgcaactcga ctcatgaag ttggaatcgc
1321 tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttctc ggggtttgta cacaccgccc
1381 gtcaaaccac gaaagtggac aatacccga agcgacagcc taactgcgta agcagaggga
1441 atcgtctaag gtagggtcga tgattggggg taagtcgtaa caaggtatcc ctaccggaag
1501 gtggggatgg atcacctcct ttct

```

//

_J6: Y13912. Phytoplasma sp. 1...[gi:3581874]

Related Sequences, Taxonomy

LOCUS PY13912 1530 bp DNA linear BCT 09-SEP-1998

DEFINITION Phytoplasma sp. 16S rRNA gene, strain LDG.

ACCESSION Y13912

VERSION Y13912.1 GI:3581874

KEYWORDS 16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.

SOURCE Phytoplasma sp.

ORGANISM Phytoplasma sp.
Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
Acholeplasmataceae; Phytoplasma.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1530)

AUTHORS Tymon,A., Jones,P. and Harrison,N.A.

TITLE Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers

JOURNAL Ann. Appl. Biol. 132, 437-452 (1998)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1530)

AUTHORS Tymon,A.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (17-JUN-1997) A.M. Tymon, IACR-ROTHAMSTED, Dept. Crop & Disease Management, Rothamsted Experimental Station, Harpenden Herts. AL5 2JQ, UK

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..1530

/organism="Phytoplasma sp."

/strain="Coconut lethal yellowing disease"

/sub_strain="Ghanaian Cape St. Pauls Wilt disease (LDG)"

/specific_host="Cocos nucifera"

/db_xref="taxon:2155"

gene 1..1530

/gene="16S rRNA"

rRNA 1..1530

/gene="16S rRNA"


```

/product="16S ribosomal RNA"
BASE COUNT      448 a      287 c      418 g      377 t
ORIGIN
  1 aagagtttga tcctggctca ggattaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa
 61 cggaacacct tcgggggtttt agtggcgaac ggggtgagtaa cacgtaagta acctgccttt
121 aagacgagaa taacaattgg aaacagtggc taaggctgga taggaaataa tgaggcatct
181 cgttattttt aaaagacctt cgcaagaagg tatgcttaaa gaggggcttg cgccacatta
241 gtttggttgg aaggtaacgg cttaccaaga cgatgatgtg tagctggact gagaggttga
301 acagccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca gtagggaatt
361 ttcggcaatg gaggaaactc tgaccgagca acgcccgcgtg aacgatgaag tatttcggta
421 tgtaaagttc ttttattaaa gaagaaacgc tagtggaata actagtttga cgttatttaa
481 tgaataagcc ccggcaaact atgtgccagc agccgcggta atacataggg ggcgagcggt
541 atccggaatt attgggcgta aagggtgcgt aggcggttta gtaagtctct agtttaaatt
601 caacgcttaa cgttgtcctg ctagagaaac tactagacta gagtaggata gaggcaagcg
661 gaattccatg tgtagcggta aaatgtgtaa atatatggag gaacaccaga ggcgtaggcg
721 gcttgctggg tctttactga cgctgaggca cgaagcgtg gggagcaaac aggattagat
781 accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tactaagtgt cgggggttct ctcggtactg
841 aagttaacac attaatgact ccgcctgagt agtacgtacg caagtatgaa acttaaagga
901 attgacggga tcccgcacaa gcggtggatc atgttggtta attcgaagat acacgaaaaa
961 ccttaccagg tcttgacatt attctgcgaa gctatagaaa tatagtggag gttatcagaa
1021 taacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttaggtt aagtcctaaa
1081 acgagcgcaa cccttgctgt tagttaccag cacgttatgg tggggacttt agcgagactg
1141 ccaatgaaaa aattggagga aggtgaggat tacgtcaaat catcatgcc cttatgatct
1201 gggctacaaa cgtgatacaa tggctattac aaagagcagc tgaaacgtga gttgttagct
1261 aatctcaaaa aaatagtctc agttcggatt gaagtctgca actcgacttc atgaagttgg
1321 aatcgctagt aatcgcgaa cagcatgtcg cgggtgaatac gttctcgggg tttgtacaca
1381 ccgcccgtca aaccatgaaa gttgacaata cccaaaacca gtcgcttaac tacttcggta
1441 gagggagctg tctaaggtag ggtcgatgat tgggggttaag tcgtaacaag gtatccctac
1501 cggaaggtgg ggatggatca cctectttct

```

//

7: Y14175. Phytoplasma sp. 1...[gi:3559976]

Related Sequences, Taxonomy

```

LOCUS      PY14175              1530 bp      DNA      linear      BCT 07-SEP-1998
DEFINITION Phytoplasma sp. 16S rRNA gene, strain LDN.
ACCESSION  Y14175
VERSION    Y14175.1  GI:3559976
KEYWORDS   16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE     Phytoplasma sp.
  ORGANISM Phytoplasma sp.
            Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
            Acholeplasmataceae; Phytoplasma.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1530)
  AUTHORS  Tymon,A., Jones,P. and Harrison,N.A.
  TITLE    Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the
            development of specific oligonucleotide PCR primers
  JOURNAL  Ann. Appl. Biol. 132, 437-452 (1998)
REFERENCE  2 (bases 1 to 1530)
  AUTHORS  Tymon,A.M.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (17-JUN-1997) A.M. Tymon, IACR-ROTHAMSTED, Dept. Crop &
            Disease Management, Rothamsted Experimental Station, Harpenden
            Herts. AL5 2JQ, UK
FEATURES   Location/Qualifiers
    source  1..1530
            /organism="Phytoplasma sp."
            /strain="Coconut lethal yellowing disease"
            /sub_strain="Nigerian Awka disease (LDN)"
            /specific_host="Cocos nucifera"
            /db_xref="taxon:2155"
    gene    1..1530
            /gene="16S rRNA"

```

```

rRNA          1..1530
               /gene="16S rRNA"
               /product="16S ribosomal RNA"
BASE COUNT    447 a    290 c    420 g    373 t
ORIGIN
  1 aagagtttga tcctggetca ggattaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa
 61 cggaaacctt tcggggtttt agtggcgaac gggtgagtaa cacgtaagta acctgccttt
121 aagacgagaa taacaattgg aaacagttgc taaggctgga taggaaataa tgaggcatct
181 cgttatTTTT aaaagacctt cgcaagaagg tatgcttaaa gaggggcttg cgccacatta
241 gtttggttgg agggtaacgg cctaccaaga cgatgatgtg tagctggact gagaggttga
301 acagccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca gtagggaatt
361 ttcggaatg gaggaactc tgaccgagca acgccgcgtg aacgatgaag tatttcggta
421 tgtaaagtgc ttttattaaa gaagaaacgc tagtggaata actagtttga cgttatttaa
481 tgaataagcc ccggcaaaact atgtgccagc agccgcggta atacataggg ggcgagcgtt
541 atccggaatt attgggcgta aagggtgcgt aggcggttta gtaagtctct agtttaaatt
601 caacgcttaa cgttgctccg ctagagaaac tactagacta gagtaagata gaggcaagcg
661 gaattccatg tgtagcggtg aatgtgtaa atatattggag gaacaccaga ggctaggcg
721 gcttgctggg tctttactga cgctgaggca cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat
781 accctggtag tccacgcgct aaacgatgag tactaagtgt cgggggtttc ctcggtactg
841 aagttaacac attaatgtact ccgcctgagt agtacgtacg caagtatgaa acttaaagga
901 attgacggga tcccgacaaa gcggtggatc atgttgttta attcgaagat acacgaaaaa
961 ccttaccagg tcttgacatt atcctgcgaa gctatagaaa tataggggag gttatcagga
1021 taacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttaggtt aagtcctaaa
1081 acgagcgcaa cccttgctgt tagttaccag cacgttatgg tggggacttt agcgagactg
1141 ccaatgaaaa aattggagga aggtgaggat tacgtcaaat catcatgccc ctatgatct
1201 gggctacaaa cgtgatacaa tggctattac aaagagcagc tgaaacgtga gttgttagct
1261 aatctcaaaa aaatagtctc agttcggatt gaagtctgca actcgacttc atgaagttgg
1321 aatcgctagt aatcgcaat cagcatgtcg cgggtgaatac gttctcgggg tttgtacaca
1381 ccgccgctca aaccatgaaa gttgacaata cccaaaacca gtcgcttaac tacttcggta
1441 gagggagctg tctaaggtag ggctgatgat tgggggtaag tcgtaacaag gtatccctac
1501 cggaaggtgg ggatggatca cctcctttct

```

//

_18: X80117. Phytoplasma sp. 1...[gi:2251190]

Related Sequences, Taxonomy

```

LOCUS      MSP16SRRN          1524 bp    DNA    linear    BCT 07-SEP-1998
DEFINITION Phytoplasma sp. 16S rRNA gene, strain LD.
ACCESSION  X80117
VERSION    X80117.1    GI:2251190
KEYWORDS   16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE     Phytoplasma sp.
  ORGANISM Phytoplasma sp.
            Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
            Acholeplasmataceae; Phytoplasma.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1524)
  AUTHORS  Tymon,A.M.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (11-JUL-1994) A.M. Tymon, Rothamsted Experimental
            Station, Harpendedn, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK
  REMARK   revised by [3]
REFERENCE  2 (bases 1 to 1524)
  AUTHORS  Tymon,A.M.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (08-JUL-1997) A.M. Tymon, Rothamsted Experimental
            Station, Harpendedn, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK
REFERENCE  3 (bases 1 to 1524)
  AUTHORS  Tymon,A., Jones,P. and Harrison,N.A.
  TITLE    Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the
            development of specific oligonucleotide PCR primers
  JOURNAL  Ann. Appl. Biol. 132, 437-452 (1998)
COMMENT    On Jul 9, 1997 this sequence version replaced gi:511045.
FEATURES   Location/Qualifiers

```

```
source      1..1524
            /organism="Phytoplasma sp."
            /strain="Coconut lethal yellowing disease"
            /sub_strain="Tanzanian lethal disease (LD)"
            /specific_host="Cocos nucifera"
            /db_xref="taxon:2155"
gene        1..1524
            /gene="16S rRNA"
rRNA        1..1524
            /gene="16S rRNA"
            /product="16S ribosomal RNA"
BASE COUNT  454 a      285 c      411 g      374 t
ORIGIN
    1 aagagtttga tcctggctca ggattaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa
   61 cggaaacctt cgggttttag tggcgaacgg gtgagtaaca cgtaagcaac ctacctttaa
  121 gacgagaata acaattggaa acagttgcta aggctggata ggaaatgaaa aggcattctt
  181 ttatttttaa aagaccttct tcggagggta tgcttaaaga ggggcttgcg tcacattagt
  241 tagttggtaa ggtaaaggct taccgaagcg atgatgtgta gctggactga gaggttgaac
  301 agccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaatttt
  361 cggcaatgga ggaaactctg accgagcaac gccgcgtgaa tgatgaagta cttcggtagt
  421 taaaattctt ttattgaaga agaaaaaata gtggaaaaac tatattgacg ttattcaatg
  481 aataagcccc ggctaactat gtgccagcag ccgcggtaat acataggggg cgagcgttat
  541 ccggaattat tgggcgtaaa ggggtgcgtg gccggtttgat aagtctctag tttaatttca
  601 gcgettaacg ctgtcctgct agagaaaactg tcttactaga gtgagataga ggcaagcgga
  661 attccatgtg tagcggtaaa atgtgtaaat atgtggagga acaccagagg cgtaggcggc
  721 ttgctgggtc tttactgacg ctgaggcacg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac
  781 cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagta ctaagtgtcg gggcaactcg gtactgaagt
  841 taacacatta agtactccgc ctgagtagta cgtacgcaag tatgaaactt aaaggaattg
  901 acgggatccc gcacaagcgg tggatcatgt tgtttaattc gaagatacac gaaaaacctt
  961 accaggtctt gacatattct gcgaagctat agaaatatag tagaggttac cagaaatata
 1021 ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct gtgagatgtt aggttaagtt ctaaaacgag
 1081 cgcaaccctt atcgttagtt accagcatgt tatgatgggg acttttagcg gactgccaat
 1141 gaaaaatttg aggaagggtg ggattacgtc aaatcatcat gcccttatg atctgggcta
 1201 caaacgtgat acaatggcta ttacaaagag tagctgaaac gcgagttttt agccaatctc
 1261 aaaaaaatag tctcagttcg gattgaagtc tgcaactcga cttcatgaag ttggaatcgc
 1321 tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttctc ggggtttgta cacaccgccc
 1381 gtcaaaccac gaaagttgac aatacccaaa aacggtagcc taactacgca agtagagggg
 1441 tccgtctaag gtaggggttg tgattggggg taagtcgtaa caaggtatcc ctaccggaag
 1501 gtggggatgg atcacctect ttct

//
```

Revised: July 5, 2002.

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

