

# PRESENCIA DE FITOPLASMAS EN EL CICADÉLIDO *Circulifer tenellus* EN EL ESTADO DE ZACATECAS, MÉXICO

Presence of phytoplasma in the cicadellid *Circulifer tenellus* in the state of Zacatecas, México

Ximena Abrajan-del Rio<sup>1</sup>, Luis Roberto Reveles-Torres<sup>1</sup>, Rodolfo Velásquez-Valle<sup>1</sup>, Manuel Reveles-Hernández<sup>1</sup> y José Ángel Cid-Ríos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Campo Experimental Zacatecas – INIFAP, Km. 24.5 Carr. Zacatecas – Fresnillo, Calera de V. R., Zacatecas, México, CP 98500. e-mail: jimenux\_92@hotmail.com

## RESUMEN

Dentro de los insectos vectores de fitoplasmas, el cicadélido *Circulifer tenellus* está reportado como uno de los principales transmisores de estos patógenos, ocasionando enfermedades a una gran cantidad de cultivos agrícolas de importancia económica. Este trabajo tuvo como objetivo determinar si *Circulifer tenellus* es portador de fitoplasmas. Se realizó un conteo poblacional mensual durante un año mediante captura con trampas de agua. Se encontró que esta especie está presente todo el año, siendo el mes de abril donde se registró la mayor abundancia con 167 individuos, y el mes de septiembre el de menor registro con solo seis individuos. Para el diagnóstico de fitoplasmas se capturaron organismos mediante redeo, durante los meses de mayo a septiembre. Los resultados arrojaron que el 13% de los individuos de *Circulifer tenellus* son portadores de fitoplasmas; y de acuerdo a los umbrales de acción para las medidas de prevención a la infectividad de este vector, el estado de Zacatecas está en peligro latente de fitoplasmosis.

**Palabras Clave:** Fitoplasmosis, infectividad, conteo poblacional.

## SUMMARY

Among phytoplasmas vectors insects, the cicadellidae *Circulifer tenellus* is reported of these pathogens, causing disease to a large number of economically important agricultural crops. This study aimed to determine whether *Circulifer tenellus* carries phytoplasmas. Monthly population count was conducted for one year by using water pan traps. It was found that this species is present throughout the year, with April being the month with the highest population with 167 individuals. In September was the lowest with only six adults. For the diagnosis of phytoplasma organisms were captured by enmeshing during the months of

May to September. The results indicated that 13% of individuals carry *Circulifer tenellus* phytoplasma; according to action thresholds for preventing infectivity of this vector, the state of Zacatecas is in potential danger of phytoplasmas.

**Keywords:** phytoplasmas, infectivity, population count.

## INTRODUCCIÓN

El estado de Zacatecas es uno de los mayores productores agrícolas del país, por consiguiente sus campos de cultivos se ven afectados por problemas fitosanitarios que pueden afectar su calidad y producción. La mayoría de los fitopatógenos no requieren de un vector activo para infectar plantas, pero en algunos procariontes como los de la clase Mollicutes (fitoplasmas y espiroplasmas), los insectos vectores son necesarios para su transmisión, dispersión y multiplicación (Ariszendi *et al.*, 2010).

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular que viven en el floema de las plantas infectadas y que requieren para su diseminación de un agente vector que debe alimentarse de la savia contenida en el floema (Alfaro-Fernández *et al.*, 2011). Hasta ahora se han relacionado con insectos de la orden Hemiptera, y en especial de la familia Cicadellidae como principales vectores de fitoplasmas. Los cicadélidos (Cicadellidae) son una familia de insectos hemípteros de la superfamilia Membracoidea y del suborden Auchenorrhyncha, que son conocidos comúnmente como chicharritas o saltahojas. Éstos son pequeños insectos que se encuentran distribuidos en todo el mundo; y constituyen una de las familias más grandes de Hemiptera; se sabe que hay aproximadamente 22,000 especies descritas. Se alimentan principalmente de la savia de las plantas por lo que son los vectores perfectos de virus, bacterias y otros patógenos.

Algunas especies son importantes plagas agrícolas como lo es la especie "*Circulifer tenellus*" que ataca principalmente al cultivo de chile. Se estima que el 70 % de los insectos vectores de enfermedades a las plantas pertenecen a esta familia (Lee *et al.*, 2003), y que más de 70 especies son conocidas como vectores de fitoplasmas en diferentes especies vegetales (Weintraub y Beanland, 2006). Este trabajo tuvo como objetivo determinar si *Circulifer tenellus* es portador de fitoplasmas, como medio de conocimiento del grado de infectividad potencial en el estado de Zacatecas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de las chicharritas pertenecientes a la especie *Circulifer tenellus*, se realizó durante los meses Octubre del 2013 a Septiembre del 2014, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las chicharritas fueron capturadas mediante dos técnicas, una de ellas fue por medio de trampas de agua, la cual consiste en recipientes con agua y jabón; y la otra es la técnica por redeo, utilizando una red entomológica. El conteo, la identificación y el sexado de los insectos se llevaron a cabo en el Laboratorio Entomológico del Campo Experimental Zacatecas del INIFAP.

### Extracción de ADN de *Circulifer tenellus*

La detección de fitoplasmas en chicharritas, se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Campo Experimental Zacatecas en el INIFAP. Para la extracción del ADN total de los insectos, se utilizó el método propuesto por Ceñís *et al.* (1993) con algunas modificaciones. El método consistió en macerar individualmente los adultos capturados en un mortero que contenía 50 µl de una solución Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM, NaCl: 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Enseguida el tejido del insecto se transfirió a un tubo eppendorf y se le agregaron 25 µl de acetato de sodio (3M, pH 5.2); los tubos fueron incubados a -20°C durante 20 minutos y posteriormente centrifugados por 10 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 500 µl de isopropanol frío para la precipitación del ADN y se dejaron reposando por 20 minutos a temperatura ambiente. Para obtener las pastillas, se centrifugó por 20 minutos a 13,000 rpm, y se desechó el sobrenadante.

La pastilla se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 25 ml de buffer TE pH 7 (Tris- EDTA 0.01 Mm pH 8.0) y se almacenaron a -20°C.

### Detección de los fitoplasmas por PCR anidada

La detección de los fitoplasmas en el insecto vector, se llevó a cabo mediante la amplificación del gen 16S rRNA. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos universales, P1/Tint y R16F2n/R16R2, para el PCR directo y anidado, respectivamente (Almeyda, 1997; Deng and Hiruki, 1991; Gundersen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1997; Smart *et al.*, 1996). Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0.5 ml, el volumen total de reacción fue de 25 µl y se conformó de la siguiente manera: 2.5 µl del ADN templado, 0.5 µl de cada primer, 2.5 µl de cada dNTP, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µl de Taq ADN polimerasa Invitrogen®. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 3 minutos y 30 ciclos adicionales con el siguiente programa: 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de alineación a 55 °C, 2 minutos de polimerización a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron fraccionados sobre geles de agarosa 1% a 85 voltios por 45 minutos, teñidos con bromuro de etidio (0.7 µg/ml) y visualizados bajo luz ultravioleta.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Conteo poblacional

Con la contabilización de las capturas de *Circulifer tenellus* en las trampas de agua durante 12 meses, arrojan datos que esta especie está presente todo el año, siendo el mes de abril donde se registró la mayor abundancia con 167 individuos, y el mes de septiembre el de menor registro con solo seis. Además, parece que los machos al menos en este estudio, son más abundantes que las hembras, dado que el número de estos siempre fue mayor al de las hembras, registrando un total de 449 machos y 195 hembras; lo que equivale a una relación de 7:3 macho-hembra (Cuadro1).

**Cuadro 1. Insectos de la especie *Cirfulifer tenellus* spp. capturados por medio de trampas de agua en los meses de Octubre 2013 – Septiembre del 2014 en el campo experimental Zacatecas (INIFAP).**

Mes de captura	Macho	Hembra
Octubre 2013	25	12
Noviembre 2013	34	12
Diciembre 2013	49	13
Enero 2014	99	18
Febrero 2014	15	9
Marzo 2014	34	19
Abril 2014	132	35
Mayo 2014	-	58
Junio 2014	51	16
Julio 2014	4	4
Agosto 2014	-	-
Septiembre 2014	6	-
<b>Total</b>	<b>449</b>	<b>195</b>

### Detección de los fitoplasmas por PCR anidada

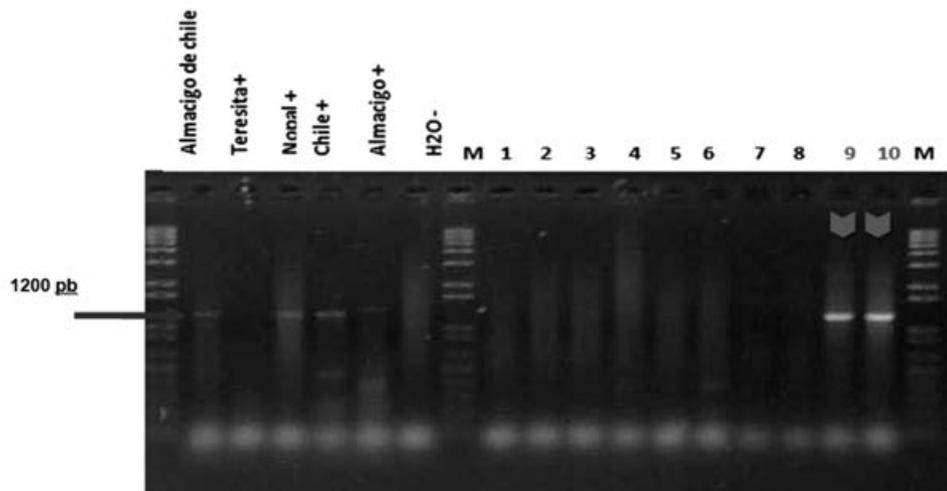
Entre mayo y septiembre del 2014, se colectaron por medio de una red entomológica un total de 93 insectos pertenecientes a la especie *Circulifer tenellus*, en diferentes tipos de malezas. Estos organismos fueron analizados de forma individual para presencia de fitoplasma, encontrando un 13% de estos como

positivos. En cuanto a distinción sexual, se encontró que el 7.5% eran hembras y el 5.5% machos (Cuadro 2.). En trabajos similares (Munyanza *et al.*, 2010) con *C. tenellus* capturados en el cultivo de la papa, se reporta que por pruebas de PCR, estos estaban infectados con el fitoplasma, con un promedio de 20.8, 34.8, y 9.2% en conteos realizados en los años 2005, 2006, y 2007, respectivamente.

**Cuadro 2. Análisis de fitoplasmas por PCR anidada, de Chicharritas pertenecientes a la especie *Circulifer tenellus* spp.**

Especie	Mes de colecta 2014	No. de muestras analizadas	No. de muestras positivas.	Macho ?	Hembra ?
<i>Circulifer</i>	Mayo	2	1	-	1
<i>tenellus</i>	Junio	31	3	1	2
	Julio	18	-	-	-
	Agosto	13	-	-	-
	Septiembre	30	8	4	4
<b>TOTAL</b>		<b>93</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>7</b>

Del análisis por PCR anidada, en la Figura 1. se señalan los resultados obtenidos de 10 individuos de chicharritas, donde los carriles 9 y 10 reflejaron presencia de fitoplasmas.



**Figura 1.** Gel de agarosa al 1% teñido en bromuro de etidio, para determinación de fitoplasmas en *Circulifer tenellus*. Carril 1–4 machos, Carril 5-10 hembras. M (marcador de peso molecular).

Se ha reportado que *Circulifer tenellus* experimentalmente ha transmitido el fitoplasma BLTVA (16SrXI-A) a 48 especies de plantas (Golino *et al.*, 1989; McCoy *et al.*, 1989). Por otra parte Lee y colaboradores (1998b) mencionan que este vector puede transmitir más de una especie de fitoplasma, dando por hecho que no es de sorprender que este vector pueda transmitir múltiples fitoplasmas.

Sin embargo, según Munyaneza y colaboradores (2010) la infectividad promedio de estas chicharritas, se determina a partir de las muestras obtenidas de las poblaciones iniciales de la migración de especie. Caso que no sucede en el estado de Zacatecas, ya que esta especie esta permanente, por lo que la infectividad es siempre latente. En el medio Oeste de Estados Unidos, la línea de base para el desarrollo del umbral de acción, es tan solo del dos por ciento de infectividad para *C. tenellus*; por lo que si tomamos esta medida, el estado de Zacatecas se encuentra muy por encima del implemento de medidas de prevención. Por otro lado, cabe mencionar que esta chicharrita completa su ciclo de vida en numerosas plantas, gracias a ciertos mecanismos que presenta por ser un insecto polífago. Con ello, nuevos nichos ecológicos latentes se abren como ámbitos propicios para dispersión de estos organismos.

## CONCLUSIONES

Durante los meses de mayo a septiembre del 2014, se encontró que el 13% (7.5% hembras y 5.5% machos) de los individuos de *Circulifer tenellus* son portadores de fitoplasmas.

De acuerdo a los umbrales de acción para las medidas de prevención a la infectividad de *Circulifer tenellus*, algunos cultivos del estado de Zacatecas se encuentran en peligro latente de fitoplasmosis.

## LITERATURA CITADA

- Alfaro-Fernández, A.; Del Carmen Cebrián, M.; Villaescusa, F.J.; Font-San-Ambrosio, M. 2011. Detection and identification of aster yellows and stolbur phytoplasmas in various crops in Spain, Bulletin of Insectology. Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies, pp. S63-S64.
- Almeyda, L.I.H. 1997. Detección molecular de fitoplasmas y su uso en el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, N.L., México, p. 88.
- Arismendi, N.; Carrillo L. L.; R., Andrade, N. 2010. Molicutes fitopatógenos transmitidos por insectos: Interacciones y efectos en sus vectores. Agro sur 38:55-67.
- Ceñís, J.L.; Pérez, P.; Fereres, A. 1993. Identification of various aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Annuals of the Entomological Society of America 86:545-550.
- Deng, S.; Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. Journal of Microbiological Methods 14:53-61.
- Golino, D.A.; Oldfield, G.N.; Gumpf, D.J. 1989. Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. Plant Disease 73:850-854.
- Gundersen, D.E.; Lee, I.M.; Schaff, D.A.; Harrison, N.A.; Chang, C.J.; Davis, R.E.; Kingsbury, D.T. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). International journal of systematic bacteriology 46:64-75.

- Lee, I.-M.; Hammond, R.; Davis, R.; Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842.
- Lee, I.-M.; Gundersen-Rindal, D.E.; Davis, R. E.; Bartoszyk, I.M. 1998a. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.
- Lee, M.; Gundersen, D.; Davis, R.; Bartoszy, I. 1998b. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.
- Lee, M.; Martini, M.; Bottner, K.; Dane, R.; Black, M.; Troxclair, N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93:368-1377.
- Martínez, J. P.; Ríos, M.; Zavala, R.; Almeyda, L.I.H. 1997. Detección de organismos tipo micoplasma, Congreso Nacional de Productores de Papa, Chihuahua, México., pp. 17-19.
- McCoy, R.; Caudwell, A.; Chang, C.; Chen, T.-A.; Chiykowski, L. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms, in: Tully, J. (Ed.), *The Mycoplasmas*. Academic, New York, pp. 545-560.
- Munyaneza, J.E.; Crosslin, J.M.; Upton, J.E.; Buchman, J.L. 2010. Incidence of the beet leafhopper-transmitted virescence agent phytoplasma in local populations of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus*, in Washington State. *Journal of Insect Science* 10.
- Smart, C.D.; Schneider, B.; Blomquist, C.L.; Guerra, L.J.; Harrison, N.A.; Ahrens, U.; Lorenz, K.H.; Seemuller, E.; 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.
- Weintraub, P.G.; Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91-111.