

TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS POR EL VECTOR *Circulifer tenellus* EN DIFERENTES HOSPEDEROS VEGETALES

Phytoplasma transmission by the vector *Circulifer tenellus* in different plant hosts

Griselda López-Romo¹, Luis Roberto Reveles-Torres¹, Rodolfo Velásquez-Valle¹, Silvia Salas-Muñoz¹ y Jorge Armando Mauricio-Castillo²

¹ Campo Experimental Zacatecas – INIFAP, Km. 24.5 Carr. Zacatecas – Fresnillo, Calera de V. R., Zacatecas, México, CP 98500. ² Unidad Académica de Agronomía – Universidad Autónoma de Zacatecas. e-mail: glr_185@hotmail.com

RESUMEN

Los datos publicados sobre fitoplasmas y sus insectos vectores presentes en la mayoría de las entidades federativas de México son escasos. Durante los últimos años se ha reportado la presencia de poblaciones de *Circulifer tenellus* en cultivos de interés económico que son afectados por sintomatologías asociadas con la presencia de fitoplasmas en el estado de Zacatecas. El objetivo del presente trabajo fue determinar si *Circulifer tenellus* es capaz de transmitir fitoplasmas a plantas de betabel, rábano, tomate y chile como hospederas. Semillas de estas especies fueron germinadas para desarrollar plantas sanas. Individuos de *C. tenellus* fueron capturados y puestos sobre plantas ya desarrolladas de las especies mencionadas, para ser infectadas por este vector. Pruebas de PCR anidada se realizaron para determinar la presencia de fitoplasmas a insectos después de 10 días de infestación y a las plantas hospederas después de 30 días del inóculo con los vectores. Los resultados arrojaron que 7 de 27 chicharritas eran portadoras de fitoplasmas y estos fueron transmitidos a plantas de betabel (*Beta vulgaris*), rábano (*Raphanus sativus*) y a dos variedades de *Capsicum annuum* (chile ancho y mirasol). No se detectaron fitoplasmas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Palabras clave: Fitoplasmosis, infestación, *Beta vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Capsicum annuum*.

SUMMARY

Published data on phytoplasmas and their insect vectors present in most of the states in Mexico are scarce. In recent years it has been reported the presence of large populations of *Circulifer tenellus* crops of economic interest that is affected by symptomatology associated with the presence of phytoplasmas in the state of Zacatecas. The aim of this study was to deter-

mine whether *C. tenellus* can transmit phytoplasmas to beet, radish, tomato and pepper as hosts. Seeds of these species were germinated to develop healthy plants. Individuals of *C. tenellus* were captured and put on already developed plants of the species mentioned, to be infected by this vector. Nested PCR tests were performed to determine the presence of phytoplasma to 10 days after insect infestation and on host plants after 30 days of exposure to the vectors. The results indicated that 7 out of 27 leafhoppers were vectors of phytoplasmas and these were transmitted to beet (*Beta vulgaris*), radish (*Raphanus sativus*), and two varieties of *Capsicum annuum* (ancho and mirasol types). Phytoplasma were not detected at tomato plants (*Solanum lycopersicum*).

Key words: Phytoplasms Infestation, *Beta vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Capsicum annuum*.

INTRODUCCIÓN

La chicharrita del betabel (*Circulifer tenellus* Baker); presente en Norte América es un insecto pequeño que mide de 3.1 a 3.5 mm de largo y menos de 1 mm de ancho. Los organismos de esta especie son muy activos en climas áridos y semiáridos, son polípagos que se alimentan de la savia contenida en las plantas. La razón por la cual las chicharritas se han convertido en una limitante en la producción de cultivos de interés económico, es su alta capacidad para transmitir agentes fitopatógenos a malezas y cultivos de interés económico, entre los que destacan los fitoplasmas. La distribución geográfica de este vector se ha establecido en casi toda la zona Occidental de los Estados Unidos (Creamer *et al.*, 2003), regiones del desierto Chihuahuense en México (Velásquez *et al.*, 2008) así como parte del Mediterráneo y Medio Oriente en el Viejo Mundo (Bennett, 1971). Los fitoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, viven en el floema de las plantas infectadas y que

requieren para su diseminación de un insecto vector que debe alimentarse de la savia contenida en el floema de las plantas infectadas (Alfaro-Fernández *et al.*, 2011).

Toda estrategia de control y prevención de infecciones causadas por fitoplasmas, depende del conocimiento del mecanismo de transmisión y de la dispersión de estos. Con ello, se constituyen los mecanismos clave para implementar las medidas que puedan atenuar o evitar, de manera efectiva, los daños a los cultivos amenazados por la enfermedad que ellos ocasionan. A nivel mundial se ha reportado que existe asociación de los síntomas entre diferentes grupos de fitoplasmas y se han diagnosticado mediante técnicas moleculares en España (Castro y Romero, 2002); Cuba (Arocha *et al.*, 2007) y México (Santos *et al.*, 2008) que afectan el cultivo de chile.

Cada fitoplasma puede tener uno o varios vectores específicos, que en su mayoría, pertenecen a los cicadelidos del orden hemíptera (Weintraub y Beanland, 2006). Entre estos, la especie *Circulifer tenellus* ha sido reportada en todos los continentes como el vector de fitoplasmas más importante, y sin embargo, se desconoce el potencial de infección hacia cultivos de

importancia económica en la región del estado de Zacatecas. Por ello, en este trabajo se propuso confirmar la capacidad de transmisión de fitoplasmas por parte de chicharritas *Circulifer tenellus* a diferentes hospederos de interés económico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la transmisión de los fitoplasmas a los hospederos, en charolas de germinación se sembraron semillas de *Raphanus sativus* (rábano), *Beta vulgaris* (betabel), *Solanum lycopersicum* (tomate) y dos tipos de *Capsicum annuum* (chile ancho y mirasol) para utilizarlas como plantas hospederas. Cuando las plantas de cada especie desarrollaron las primeras hojas verdaderas, se tomó una muestra foliar para comprobar por PCR anidada, la sanidad de estas ante la presencia de fitoplasmas. Estas plantas se aislaron dentro de jaulas hechas con malla de gallinero y cubiertas por tela de organza para evitar la entrada de cualquier vector (Figura 1) y allí mismo continuaron su desarrollo. Individuos de *C. tenellus* fueron capturados mediante una red entomológica en parcelas de chile y en manchones de maleza, dentro de las instalaciones del Campo Experimental Zacatecas (INIFAP).



Figura 1. Aspecto de las jaulas y plantas utilizadas para la infestación con *C. tenellus*.

Al mismo tiempo que se capturaron los insectos, fueron separados todos los individuos de *C. tenellus*, mediante un tubo de succión bajo microscopio estereoscópico; además se registró el sexo de los adultos capturados. De estos, entre 5 y 15 individuos (dependiendo del número capturado en los redeos) fueron puestos dentro de las jaulas con los diferentes hospederos permaneciendo por un periodo de 10 días para asegurar la transmisión de fitoplasmas por alimentación del insecto. Las jaulas junto con los vectores se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada de entre 18 y 20°C. Después de los 10 días de infestación, las chicharritas se retiraron para llevar a cabo la extracción de ADN e identificar la presencia de los fitoplasmas en los insectos mediante PCR anidada. Las plantas hospederas se mantuvieron durante un mes dentro de las jau-

las para observar el desarrollo de los síntomas causados por los fitoplasmas para su posterior determinación molecular.

Extracción de ADN de insectos y plantas

Para detectar la presencia de fitoplasmas en insectos, se utilizó el método propuesto por Ceñis *et al.* (1993) con algunas modificaciones para realizarlo de forma individual por insecto. El método consistió en macerar individualmente los adultos capturados en un tubo eppendorf que contenía 50 µL de una solución Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM, NaCl: 25 mM EDTA, 0.5% SDS). En seguida se le agregaron 25 µL de acetato de sodio (3M, pH 5.2) incubando a -20°C durante 20 minutos y centrifugados por 10 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 500 µL de isopropanol

frio 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.

En el caso de las muestras de tejido vegetal se utilizó el protocolo propuesto por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones. El tejido foliar de las plantas se maceró con nitrógeno líquido, en un mortero frío. Después se introdujo la muestra pulverizada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregó 750 µL de buffer de extracción (2 % CTAB, 1.4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl pH 8.0, 1 % de b-mercaptoetanol), enseguida la mezcla se homogenizó en el vortex, y se incubó por 15 minutos a 65°C, agitándose cada 3 minutos, después de la incubación se agregó 650 µL de PCI 25:24:1 (Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico). Posteriormente, se mezcló en vortex para homogenizar y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, y para precipitar el ADN, se agregó 700 µL de isopropanol frío, dejando reposar durante 10 minutos a -20°C. Para obtener las pastillas, se centrifugó por 25 minutos a 13,000 rpm, y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50 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

Para la detección de los fitoplasmas en las plantas hospederas y en el insecto vector, se realizó por la amplificación del gen 16S rRNA. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos universales, P1/Tint y R16F2n/R16R2, para PCR anidada, (Alme-

ya, 1997; Deng y Hiruki, 1991; Gundersen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; 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 MgCl₂, 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 de 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⁻¹) y visualizados bajo luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección de fitoplasmas en todos los hospederos resultó negativa al no encontrar ningún bandedo amplificado por el análisis de PCR. Con ello se confirmó que los hospederos no se encontraban infectados por fitoplasmas y se procedió a la infestación con los insectos vectores.

Se introdujeron 38 chicharritas de la especie *C. tenellus* a cuatro jaulas con los hospederos, teniendo una jaula con betabel (jaula A), otra con tomate y rábano (jaula B), otra con rábano y chile ancho (jaula C) y una cuarta con tomate y chile mirasol (jaula D), con un número de 10, 8, 5, y 15 individuos de chicharritas respectivamente. Todos los adultos introducidos en las jaulas A, B y D eran hembras mientras que los introducidos en la jaula C eran machos. Después de los 10 días de infestación, se recuperaron seis chicharritas de la jaula A, dos de la jaula B, cuatro de la jaula C; de la jaula D se recuperaron las 15 hembras que se introdujeron originalmente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número y sexo de vectores al inicio y fin del periodo de exposición de diferentes hospederos en condiciones restringidas.

Jaula	Plantas hospederas	Número de vectores iniciales	Número de vectores recuperados después del periodo de infestación
A	Betabel	10 (Hembras)	6
B	Tomate y Rábano	8 (Hembras)	2
C	Rábano y Chile ancho	5 (machos)	4
D	Tomate y Chile mirasol	15 (Hembras)	15
	Total	38	27

De los 27 insectos vectores recuperados después de la infestación, se realizó el diagnóstico para fitoplasmas, encontrando siete insectos positivos para fitoplasmas, de los cuales, uno

provenía de la jaula A, uno de la jaula C, y cinco de la jaula D (Figura 1).

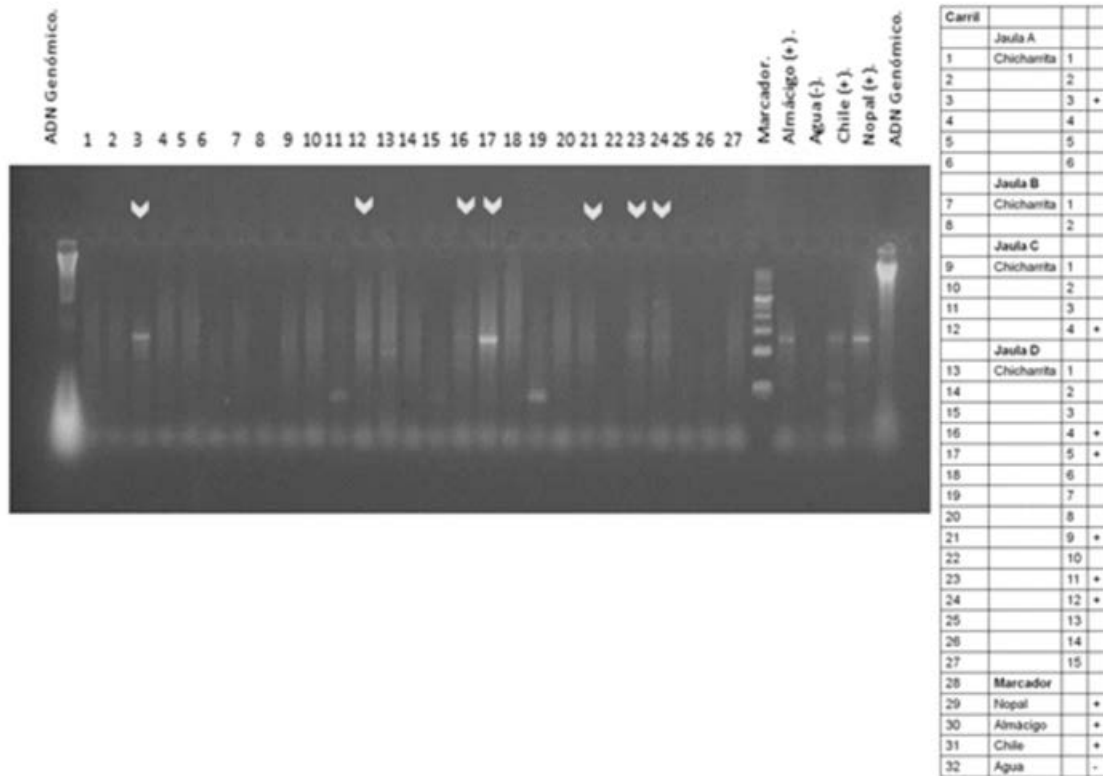


Figura 1. Gel de agarosa de la PCR de fitoplasma de los insectos vectores *Circulifer tenellus*. Muestras positivas para fitoplasma Carril 3: Insecto de la Jaula A; Carril 12: Insecto de la Jaula C; Carril 16, 17, 21, 23 y 24: Insectos de la Jaula D.

En cuanto a los hospederos vegetales, después de un mes de haber estado en contacto con los insectos vectores, todas las plantas de las cuatro especies utilizadas como hospederos (rábano, tomate, betabel y chile) desarrollaron síntomas visuales de fitoplasmósis (con excepción de las plantas en jaula B), como lo son amarillamientos en general, enanismo y clorosis. Estos hospederos igualmente se analizaron para diagnóstico

de fitoplasmas, resultando solo una planta de betabel, una de rábano, 3 de chile ancho y dos de chile mirasol, positivas para la presencia de fitoplasmas (Figura 2). Aunque las plantas de jitomate mostraron síntomas de infección por fitoplasmas, su presencia no fue detectada mediante técnicas moleculares; una posible explicación es la baja concentración del patógeno en los tejidos muestreados.

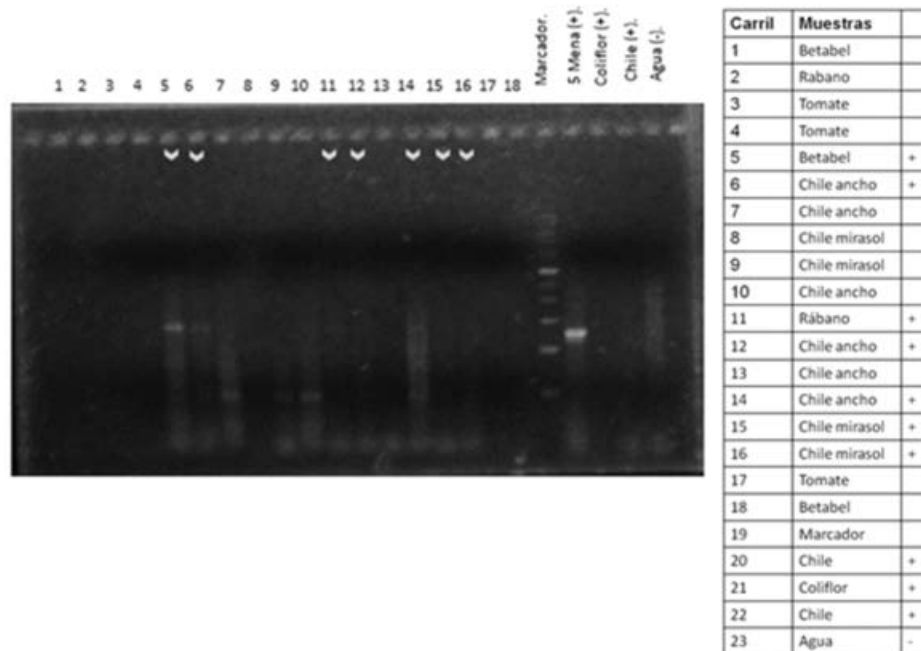


Figura 2. PCR de fitoplasma de los diferentes hospederos después de la trasmisión. Tabla de la muestras de las plantas de betabel, rábano, tomate y chile. Muestras positivas para fitoplasma Carril 5: Betabel; Carril 6, 12, 14: Chile ancho; Carril 11: Rábano; Carril 15, 16: Chile mirasol.

Los resultados muestran una congruencia entre las plantas que desarrollaron síntomas y fueron positivas a la presencia de fitoplasmas con la detección positiva de esos patógenos en al menos uno de los vectores en cada jaula; son igualmente coincidentes los resultados en la jaula B donde ni las chicharritas ni las plantas resultaron positivas a fitoplasmas. Los síntomas de la infección por fitoplasmas en una planta, suelen tomar algún tiempo para desarrollarse, por lo que el tiempo de la asociación de los insectos con el hospedero puede ser irrelevante ya que el vector puede ya no estar asociado con este (Hogenhout y Bos, 2011); de acuerdo con los resultados obtenidos, las plantas de betabel, chile Mirasol y Ancho así como rábano mostraron síntomas antes de alcanzar 30 días después de la infestación con adultos de *C. tenellus*.

Un síntoma distintivo de la fitoplasmosis es el achaparramiento o enanismo de las plantas que son afectadas al inicio del desarrollo de la planta. Estas toman un aspecto arbustivo, con hojas alargadas, de consistencia gruesa; comúnmente no presentan botones, flores o frutos y usualmente mueren prematuramente (Goldberg, 1995); además se ha asociado el síntoma de hoja pequeña en chile y tomate en Guanajuato y Sinaloa (Santos *et al.*, 2008). Otros síntomas como la elongación y fusión de los sépalos de la flor y el aborto del resto de la estructura floral se ha reportado con el nombre de brote grande (Big bud en inglés) afectando chile y tomate en diversas áreas del mundo y ha estado asociada con la presencia de fitoplasmas transmitidos por esta chicharrita; este síntoma ha recibido el nombre de yema grande o farol chino en el norte centro de México (Vellious y Lioliopoulou, 2007; Randall *et al.*, 2009).

A pesar que se ha reportado que las plantas de preferencia para la alimentación de *C. tenellus*, es betabel, rábano y tomate (Munyanza *et al.*, 2010), los resultados de este trabajo, indican que también las plantas de chile son igualmente factibles de ser infectadas.

CONCLUSIONES

Adultos de la chicharrita del betabel (*Circulifer tenellus* Baker) transmitieron fitoplasmas a plantas de betabel (*Beta vulgaris*), rábano (*Raphanus sativus*) y a dos tipos de *Capsicum annuum* (chile ancho y mirasol).

Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) no fueron positivas a fitoplasmas por técnica molecular, pesar de que mostraron síntomas de fitoplasmosis.

LITERATURA CITADA

Alfaro-Fernández, A.; Cebrián, M. C.; Villaescusa, F. J.; Hermoso de Mendoza, A.; Ferrándiz, J. C.; Sanjuán, S.; Font, M. I. 2011. First report of 'Candidatus Liberibacter solanaceum' in carrot in mainland Spain. *Plant Disease* 96:582.

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.

- Arocha, Y.; Piño, I.B.; Picornell, B.; Almeida, R.; Jones, P. 2007. Broad bean and sweet pepper: two new hosts associated with *Candidatus Phytoplasma asteris* (16Srl phytoplasma group) in Cuba. *Plant Pathology* 56:345.
- Bennett, C. W. 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants. Monogr. No. 7. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Castro, S.; Romero, J. 2002. The Association of Clover Proliferation Phytoplasma with Stolbur Disease of Pepper in Spain. *J. Phytopathology* 150:25-29.
- Ceñís, J.L.; Pérez, P.; Fereres, A. 1993. Identification of various aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Annals of the Entomological Society of America* 86:545-550.
- Creamer, R.; Carpenter, J.; Rascon, J. 2003. Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico. *Southwestern Entomologist* 28:177-182.
- Dellaporta, S.L.; Wood, J.; Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Deng, S.; Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61.
- 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.
- Hogenhout, S.A.; Bos, J.I. 2011. Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current opinion in plant biology* 14:422-428.
- Lee, I.-M.; Gundersen-Rindal, D.E.; Davis, R.E.; Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.
- Lee, I.-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.
- Martínez, J.P.; Ríos, M.; Zavala, Robles, C.; Almeyda, L.I.H. 1997. Detección de organismos tipo micoplasma, Congreso Nacional de Productores de Papa, Chihuahua, México., pp. 17-19.
- 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, 18.
- Santos, C.; Chávez, M.; Méndez, L.; Leyva, L. 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with Pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 92:1007-1011.
- 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.
- Randall, J. J.; Bosland, P. W.; and Hanson, S. F. 2009. Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of chile peppers. *Plant Disease* 93:968.
- Velásquez-Valle R.; Medina-Aguilar M. M.; Creamer R. 2008. First report of *Beet mild curly top virus* infection of chile pepper in North-Central Mexico. *Plant Disease* 92:650.
- Vellios, E.; Lioliopoulou, F. 2007. Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletin of Insectology* 60:157-158.
- Weintraub, P.G.; Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91-111.