

ARTÍCULO ORIGINAL

Primer informe de Typhlocybae como vectores potenciales de fitoplasmas en *Cnidoscolus chayamansa* (Miller) I.M. Johnst. (chaya) en Cuba

**Adayakni Sánchez Castro, Madelaine L. Quiñones Pantoja, Berta E. Piñol Pérez,
Basilia Miriam Fernández Argudín**

Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas.
Provincia Mayabeque. Cuba. Correo electrónico: ada@censa.edu.cu; madepq@censa.edu.cu.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue identificar los saltahojas presentes en plantas de chaya (*Cnidoscolus chayamansa* (Miller) I.M. Johnst.) e indicar la presencia de fitoplasmas en los insectos y las hojas con síntomas. Se recolectaron 40 saltahojas adultos y 50 hojas de tres plantas con síntomas asociados a fitoplasmas en el municipio 10 de Octubre, provincia La Habana, Cuba, durante el periodo de febrero a abril de 2015. Para la identificación de los saltahojas se utilizaron claves dicotómicas, luego de realizar montajes de estos insectos en portaobjetos planos, bajo un microscopio estereoscópico Stemi DV4 y analizarlos en Microscopio AxioLab. A1 con monitor y cámara fotográfica acoplada. Los fitoplasmas se detectaron mediante la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) por el método de CTAB 2%, con cebadores universales para la amplificación genérica de la región ADN_r 16S (R16mF2/R16mR1, R16F2n/R16R2). Para la primera amplificación se empleó la combinación de los iniciadores universales R16mF2 y R16mR1 y para la reacción anidada R16F2n/ R16R2. Para confirmar los resultados alcanzados, los productos de la digestión se analizaron en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa (1%) y se compararon con los controles positivos de fitoplasmas, obtenidos de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Los saltahojas identificados fueron *Empoasca canavalia* DeLong y *Empoasca papayae* Oman. Se encontró la presencia de fitoplasmas en hojas sintomáticas y en los insectos. La determinación de las dos especies de saltahojas y de fitoplasma en chaya y en insectos constituyen los primeros informes en Cuba.

Palabras clave: *Cnidoscolus chayamansa*, Typhlocybae, *Empoasca*, fitoplasmas.

First report of Typhlocybae as potential vectors of phytoplasmas in *Cnidoscolus chayamansa* (chaya) in Cuba

ABSTRACT: With the aim of identifying the presence of phytoplasmas in insects and leaves, forty leafhopper adults and 50 leaves of three plants with symptoms associated with phytoplasmas, were collected at the municipality of 10 de Octubre, Havana, from February to April 2015. For leafhopper taxonomical identification by using dichotomic keys, they were mounted on flat slides under a Stemi DV4 stereo microscope and observed under an AxioLab. A1 microscope with a monitor and camera attached. Phytoplasmas were detected by extracting the DNA by the 2% CTAB method and using universal primers for the generic amplification of the region ADN_r 16S (R16mF2/R16mR1, R16F2n/R16R2). For the first amplification, the combination R16mF2 and R16mR1 was used, and R16F2n/ R16R2 for the nested reaction. The products of amplification were analyzed by electrophoresis on agarose gel (1%). The profiles obtained were compared with phytoplasma positive controls from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. plants. The leafhoppers identified were *Empoasca canavalia* DeLong and *Empoasca papayae* Oman, and the presence of phytoplasma was found in leaves with symptoms as well as in the insects. The presence of these two leafhopper species and phytoplasmas in chaya and insects are the first reports in Cuba.

Key words: *Cnidoscolus chayamansa*, Typhlocybae, *Empoasca*, phytoplasmas.

INTRODUCCIÓN

Cnidoscolus chayamansa o *Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnst., conocido comúnmente en Cuba como «chaya», es un arbusto robusto de hojas perennes, trifoliadas, perteneciente a Euphorbaceae (1). Se introdujo en Cuba desde México; es de origen maya y se consume por esas comunidades. En México y Centroamérica se señala como el árbol espinaca, pepinillo, frutabomba de jardín y papallina; se utiliza además para garantizar, a bajo costo, la alimentación de peces y aves (2, 3, 4).

A la chaya se le atribuyen innumerables propiedades que favorecen la cura o mejoría de enfermedades como son la perturbación en la presión arterial, circulación sanguínea, colesterol y ácido úrico altos, diabetes y cáncer. La planta motivó interés científico y existe una detallada compilación realizada por científicos, de diferentes especialidades, que ponen de manifiesto el potencial de la planta con fines antidietético y medicinal en la prevención, el tratamiento y el control de la diabetes y de las patologías que la acompañan (5,6). En Reino Unido, se comprobó que el extracto acuoso, suministrado intraperitonealmente a ratas masculinas Wistar con diabetes dependiente de insulina, provocó cambios favorables en el peso corporal, glucosa en sangre y sueros lipídicos, propuesta por sus autores como planta eficaz para el tratamiento de esta enfermedad (6). Del mismo modo se aisló del extracto ceroso de sus hojas triterpenoides (7). En Nigeria se determinaron constituyentes fitoquímicos en el extracto de las hojas y no encontraron efectos tóxicos sobre las células del hígado (8). En Cuba se considera, popularmente, como una planta medicinal.

En la literatura consultada se hace referencia a la presencia en las plantas de *Meloidogyne incognita* raza 2 (9), del mosaico potexvirus de la yuca (10) y del fitoplasma amarillo de la chaya (11). En el desarrollo del presente trabajo, durante las revisiones periódicas realizadas, se observaron ácaros, pulgones, chinches de encaje y, esencialmente, colonias de saltahojas.

Los saltahojas pertenecen a Hemiptera y representan un grupo ampliamente distribuido en el mundo. Dentro de los hemípteros se encuentra Membracoidea, familia monofilética en la cual está Cicadellidae (12), que atesora un grupo numeroso de insectos de gran importancia para la agricultura. Muchas de sus especies pueden ser abundantes y causar considerables daños a los cultivos, tanto directamente por la producción de secreciones salivales y la acción mecánica de los estiletes bucales y el ovipositoro, como transmisores de patógenos de plantas (13, 14). Typhlocybinæ

merece gran atención por ser una subfamilia de Cicadellidae (12), que presenta ambas funciones en la planta (15, 16); es cosmopolita, particularmente las especies del género *Empoasca* Walsh, donde la mayoría tienen notable importancia por ser capaces de producir daño directo en los cultivos y como vectores de enfermedades (17, 18).

Los fitoplasmas son patógenos de plantas limitados al floema, identificados por primera vez en 1967, a través de secciones ultrafinas del floema de plantas con síntomas de amarillamiento, atribuidos, presuntamente, a virosis (19). Su estudio morfológico demostró que son bacterias que carecen de pared celular y su identificación se basa en la detección del ARN ribosomal 16Sr en plantas e insectos infectados, para los cuales los cebadores universales amplifican la mayoría de los fitoplasmas de ese grupo (19). Los fitoplasmas se transmiten por diferentes vías, preferentemente por insectos de las superfamilias Membracoidea, Fulgoroidea y Psylloidea; la transferencia se produce durante la alimentación, de forma persistente y propagativa sobre una planta infectada a plantas aparentemente sanas después de un periodo de latencia, durante el cual los fitoplasmas se mueven y multiplican en el interior del cuerpo del vector (15, 16, 17).

A pesar de esta relación, Bosco y D'Amelio (20) indicaron que solamente las especies selectivas pueden actuar como vectores, y el traspaso por insectos involucra algunos aspectos a tener en cuenta. Los saltahojas donadores pueden ser polífagos, oligófagos o estrictamente monófagos; los fitoplasmas, monófagos o generalistas, que infectan una o más plantas y pueden ser transferidos a una o más direcciones o por un estrecho margen de insectos. Este hecho trae como consecuencia la necesidad de abordar esta temática como un sistema complejo de interacciones donde, necesariamente, se tenga en cuenta la correcta identificación de los insectos, la presencia de fitoplasmas, los mecanismos de transmisión y el entorno.

Es por ello que los objetivos del presente trabajo fueron identificar los saltahojas presentes y detectar la presencia de fitoplasmas en las hojas con síntomas e insectos recolectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos se realizaron en plantas de chaya ubicadas en jardines domésticos en el municipio 10 de Octubre, provincia La Habana, Cuba, en el periodo de febrero a abril de 2015. Con un exhaustor se recolectaron 40 adultos de saltahojas y 50 hojas, de tres

plantas con síntomas asociados a la presencia de fitoplasmas. Se documentaron los síntomas con una cámara semiprofesional marca Polo D3200 (16X-21X zoom) con lentes: F3.2, 2.85mm; WAL-83E 0.5X Ø 42mm; OSTL «-0.25m/0.82FT Ø 42mm.

I) Identificación de saltahojas

Los insectos se trasladaron al laboratorio de Entomología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) donde se sexaron y se separaron los machos que se utilizaron en la identificación. Los especímenes se midieron con una regla milimetrada, desde la parte más alta de la corona hasta el extremo distal de las tegminas en posición dorsal. Posteriormente, se conservaron en frascos de cristal en alcohol al 70 %. Para el montaje en portaobjetos planos, se utilizó la metodología de Caldwell y Martorell (21) con modificaciones. Para ello se separó el abdomen completo del resto del cuerpo con la ayuda de dos agujas entomológicas, bajo un microscopio estereoscópico Stemi DV4, se maceraron en solución de KOH (10 %) y calentaron durante 3 minutos; luego se enjuagaron con agua destilada en vidrio reloj y se montaron en preparaciones fijas con líquido de Hoyer; se secaron en una incubadora a 30°C durante 72 horas y se sellaron con Bálsamo de Canadá. Las preparaciones se observaron al Microscopio Axiolab. A1, con monitor y cámara fotográfica acoplada utilizando los lentes de 10X, 20X y 40X.

Para la identificación de los ejemplares se consideraron la coloración, el tamaño, las características generales y genitalia. Se emplearon diferentes claves dicotómicas (21, 22, 23, 24).

II) Detección molecular de fitoplasmas en los insectos y muestras foliares

Se extrajo, de las hojas con síntomas asociados a la presencia de fitoplasmas, el ácido desoxirribonucleico (ADN) por el método de CTAB 2%(25). Para la detección de fitoplasmas se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (nPCR) con los cebadores universales para la amplificación genérica de la región ADNr 16S (R16mF2/R16mR1, R16F2n/R16R2) (25). Se empleó la combinación de los iniciadores universales R16mF2 y R16mR1 para la primera amplificación y R16F2n/R16R2 para la reacción anidada (26) de acuerdo a lo descrito por Arocha *et al.* (27).

En la mezcla de la primera amplificación se utilizó la solución amortiguadora de PCR 1X (Invitrogen, Brasil); MgCl₂ 2,0 mM; dNTPs 0,2 mM; iniciadores a 0,4 μM cada uno; 2U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Bra-

sil); agua desionizada estéril y 50 ng de ADN totales para un volumen final de 50 μl. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C (2 min), 35 ciclos de desnaturalización de 94°C (1 min), alineamiento a 60°C (2 min) y prolongación a 72°C (3 min), seguido de una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

En la reacción anidada se preparó una mezcla de reactivos de solución amortiguadora PCR 1X (Invitrogen, Brasil), MgCl₂ 2,0 mM, dNTPs 0,2 mM, iniciadores a 0,5 μM cada uno, 2U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil), agua desionizada estéril hasta un volumen final de 24 μl y se adicionó 1 μl de ADN de la mezcla resultante de la primera reacción. Luego se sometieron a desnaturalización inicial de 95°C (cuatro minutos), 35 ciclos de desnaturalización de 95°C (un minuto), alineamiento a 55°C (un minuto) y prolongación a 72°C (dos minutos), para finalizar con 10 minutos de extensión a 72°C. Para ambas amplificaciones se usó un termociclador programable (MJ Research, RU).

Para confirmar los resultados obtenidos, los productos de la digestión se analizaron en una cámara electroforética en un gel de agarosa (1%) durante 45 minutos a 70 voltios. Los perfiles obtenidos se observaron en transiluminador (UV) SyngeneInGenius L (Syngene, EE.UU) (28) y se compararon con los controles positivos de los fitoplasmas obtenidos de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Vicaria). Para el tratamiento de las fotos se empleó el programa Adobe Photoshop CC.

RESULTADOS

I) Identificación de saltahojas

Las colonias de saltahojas se desarrollaron por el envés de las hojas asintomáticas maduras de *C. chayamansa*. Una colonia (especie del tipo 1) presentó adultos y ninfas de diferentes edades, de estas, las más jóvenes eran verde claro, las mayores de verde más intenso y la otra (especie del tipo 2) presentó ninfas amarillas de todas las edades y los adultos, amarillo-verdosos. En ambos casos con numerosas exuvias.

Especie del tipo 1. Esta especie pertenece al complejo *Empoasca solana*, explicado por Ross (22) y que se caracteriza por ser un grupo de especies que comparten aspectos morfológicos similares entre sí.

Coloración: Todo el cuerpo es verde pálido, tegminas subhialinas con mácula pardo-claro en posición distal. Cuando están vivos, los ojos compuestos

son blancos con una mancha circular pardo oscuro. Cabeza con vértex producido presenta en la corona una banda longitudinal blanca y dos más cortas paralelas a la central, en el pronoto dorsalmente se destacan dos máculas blancas y en el escuto dos bandas blancas y una central formando como una solapa. Son especies frágiles.

Tamaño: Promedio de 3,2 mm.

Genitalia: En la región anterior del abdomen del macho presentan el terguito 9, que consiste en una banda esclerosada que se extiende entre las porciones laterales del pigofer y una banda dorsal media, que va desde el margen posterior de la banda a la antecosta del noveno segmento, formando un patrón en forma de H. La banda transversa da origen a dos apodemas (2S), separados entre sí, paralelos lateralmente y que cubren los tres primeros esternitos abdominales; los extremos distales (ápices) son redondeados, muy esclerosados y separados entre sí. Los

apodemas 3T son más cortos que los 2S, con los extremos distales redondeados. No se observan el apodema tergal (1S) (Figura 1 a).

La espina media dorsal del segmento 10 es moderadamente grande, forma un plato redondeado sin espuelas, solamente ligeramente esclerosadas e inconspicuas. El aedeago, en aspecto lateral, tiene una columna (preatrio) robusta con 3 procesos que salen del atrio y se extienden hacia el dorso. Las espinas del aedeago continúan la columna, pero van hacia afuera; estas son ligeramente más pequeñas que la columna, anchas y separadas entre sí, ambas de igual tamaño (Figura 1 b, c). El aedeago constituye una parte del conectivo (Figura 1 d); es una estructura muy esclerosada y formada por dos arcos cóncavos que confluyen en una quilla costal. Los estilos son ligeramente más anchos en la base con largos apodemas, se estrechan y forman un ápice fino, dirigidos hacia afuera, que sostienen 10 dientecillos ubicados ventralmente y se encuentran a cada lado del conectivo

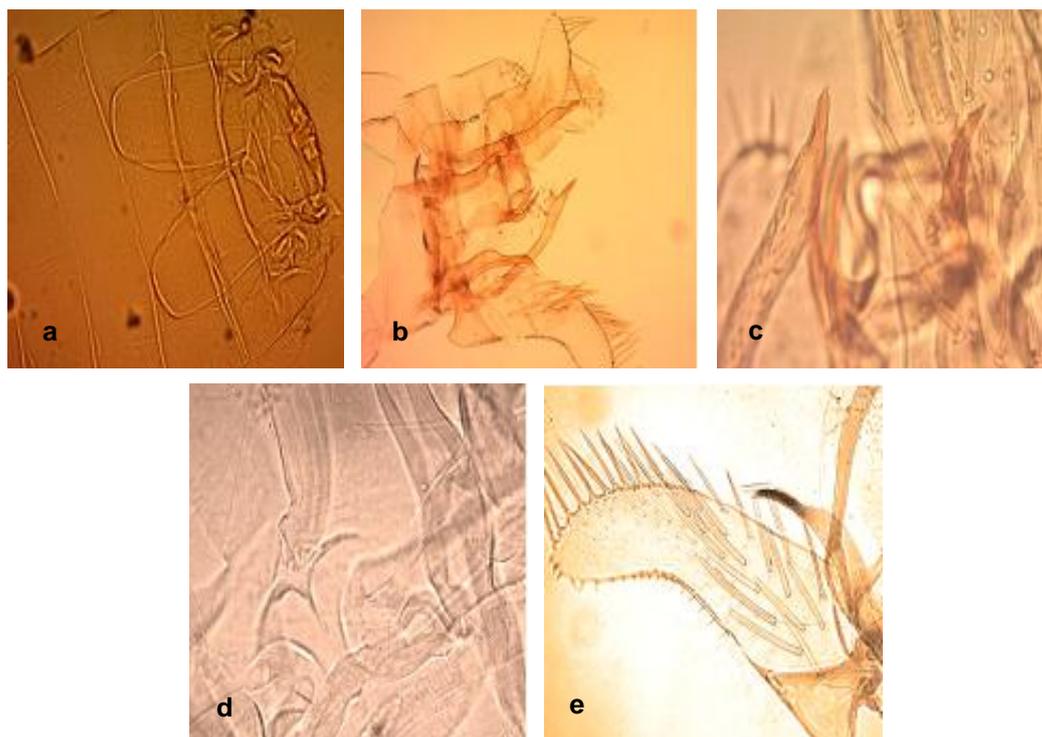


FIGURA 1. Genitalia *Empoasca canavalia* DeLong a) Apodemas 2S, 3T, tergite 9. b) Vista ventral de las piezas que conforman la genitalia del macho. c) Vista ventral del ápice del proceso lateral del pigofer, ápice del estilo con los dientes en posición ventral y vista aumentada de las espinas y procesos del aedeago. d) Conectivo e inicio del aedeago. e) Placa subgenital./ *Genitalia Empoasca canavalia* DeLong a) Apodemas 2S, 3T, tergite 9. b) Ventral view of the pieces forming the male genitalia. c) Ventral view of the apex of the lateral process of the pigofer, apex of the stile with the teeth in ventral position and magnified view of the spines and processes of the aedeagus. d) Connective and beginning of the aedeagus. e) Subgenital plate.

(Figura 1 b, c, d). Los procesos laterales del pigofer (paráfisis o bracones) se ubican a los lados de los estilos que, en vista lateral, son más largos que el pigofer, delgados, ligeramente inflados antes del ápice, este es puntiagudo con dos oquedades en el ápice. Los procesos, a partir de la zona media, están cubiertos de pequeñísimos pelos (Figura 1 b, c). Las placas subgenitales (Figura 1 e) son anchas en la base y separadas desde ahí, lameliforme; en la mitad del margen dorsal y en vista lateral se dobla abruptamente hacia arriba. Las placas subgenitales presentan numerosas setas que se han clasificado en grupos. Las setas subgenitales del grupo C presentan 19 macrosetas dispersas en la base, y prácticamente alcanzan al ápice del plato; no se observan las setas subgenitales del grupo A (setas basales marginales). Las setas subgenitales del grupo B (setas marginales distales), bien diferenciadas en número de 10, son continuas desde la mitad hasta el ápice. Las setas subgenitales del grupo D (largas y finas), superan en longitud a las del grupo C, muy numerosas y dispersas a través de todo el plato. En la superficie dorso medial presentan pequeñas setas en número de 20.

La especie del tipo 1 guarda relación con *Empoasca plebeia* DeLong y Davidson (29), pero también con *Empoasca canavalia* DeLong (21). Empoascini es una tribu de compleja taxonomía, agrupa la mayoría de las especies de pequeño tamaño y fragilidad; son muy parecidas externamente, por lo que solamente acudiendo a la genitalia del macho es factible la identificación hasta especie. Aun así, las estructuras genitales presentan gran variabilidad (21, 22, 23, 24, 29). Las características de esta especie la ubican como *Empoasca canavalia* DeLong.

Las diferencias con *E. plebeia* consisten en que la columna del aedeago de la especie del tipo 1 no corre caudalmente sino dorsalmente hacia el ano (Figura 2 b). Diversos autores describen que parten del aedeago dos procesos (21, 29). En realidad se observan 3, tal como se indica en *E. canavalia* (21) (Figura 1 c). Esta especie se describió por primera vez en Haití sobre *Canavalia ensiformis* (L) CD (21). En Puerto Rico, es común que aparezca en las áreas costeras de todas las islas que incluye St. Thomas; en otras localidades del mismo país, sobre lirio de mar (*Pancratium maritimum* L.), yerba mariposa [*Jarania guaranitica* (A. St. Hil)], higuera (*Ricinus communis* L.) y en *Volkameria aculeata* L. (21).

Especie del tipo 2: Las características de la especie del tipo 2 se corresponden con *Empoasca papayae* Oman 1937 (21, 23).

Coloración: Amarillo verdoso; la corona, el pronoto y el escudo con manchas poco conspicuas. Vértex poco producido.

Tamaño: Promedio de 2,9-3 mm. Caldwell y Martorell (21) y Neilson (23) dan un tamaño entre 3-3,3 mm.

Genitalia masculina: En la región anterior del abdomen los apodemas esternales (2S) son cortos y despuntados. El terguito 9 es una banda transversa de donde parten 2 apodemas en forma de V. Presenta el apodema (1S) similar a los de las especies del complejo *Empoasca fabae* (Harris) (Figura 2 a, e). Los procesos laterales del pigofer se originan desde la base, se curvan dorsalmente a lo largo del margen caudal, ápice bifurcado, la bifurcación posterior dos veces mayor que la anterior (Figura 2 b, d); el aedeago, en vista lateral, con la columna larga, estrecho en la base y ancha la parte distal, ligeramente curvado; con el gonoporo apical (Figura 2 b, c, d); el aedeago parte de la quilla central del conectivo, formado por un apodema esclerosado triangular; estilos, en vista dorsal, con 2/3 de largo, estilizado y atenuado apicalmente, con 7 u 8 dientes ventrales y 5 setas antes del ápice (Figura 2 b).

La espina media dorsal es elongada, recta, con el cuarto apical estrecho y doblado, muy esclerosada (Figura 2 b,c). Las placas subgenitales separadas desde la base, lameliformes. Las setas subgenitales del grupo C presentan aproximadamente 16 macrosetas dispersas en la base hasta cerca del ápice; no se observan las setas subgenitales del grupo A (setas basales marginales). Las setas subgenitales del grupo B (setas marginales distales) bien diferenciadas en número de 10, están continuas desde la mitad hasta el ápice. Las setas subgenitales del grupo D (largas y finas) superan en longitud las del grupo C, muy numerosas y dispersas a través de todo el plato. En la superficie dorso medial presentan pequeñas setas en número de 20, aproximadamente.

Esta especie está ampliamente distribuida en algunas islas del Caribe: Puerto Rico, Antillas, Santo Domingo, Haití, Jamaica y Cuba; no se conoce su distribución en Estados Unidos de América (21). Se señala que su único hospedante es *Carica papaya* (21, 23, 29, 30); no obstante, los resultados demuestran que la chaya es un hospedante de *E. papayae*.

En Puerto Rico, desde 1938, se sugirió la posibilidad de que *E. papayae* transmitiera Bunchy top a la frutabomba; en 1946 se comprobó, de manera experimental, en 71 de las 90 plantas evaluadas (23). Más recientemente, se informó que *E. papayae* es activo en frutabomba infectada (28, 30) y vector de BTS en Cuba (31, 32).

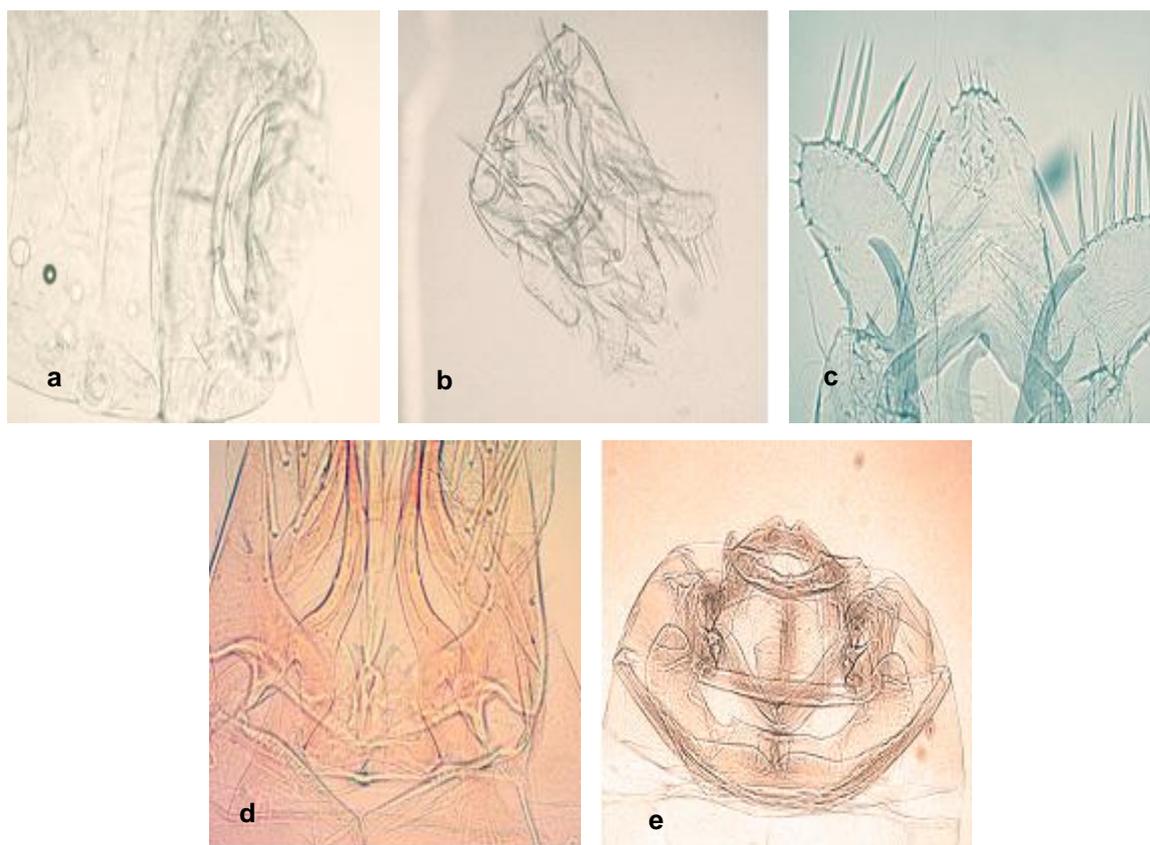


FIGURA 2. Genitalia de macho de *Empoasca papayae* Oman. a) Región anterior del abdomen apodemas esternales truncas y terguito 9. b) Genitalia completa con todas las piezas, aedeago en posición ventral. c) Extremo final del ano, placas subgenitales y procesos laterales (bifurcación) y gonoporo del aedeago. d) Ubicación del conectivo y los puntos de inserción del pigofer, estilos y procesos laterales. e) Región anterior del abdomen. / *Genitalia of the male of Empoasca papayae* Oman. Anterior region of the abdomen, blent sternal apodemas and tergite 9. b) Complete genitalia with all the pieces, aedeagus in ventral position. c) Final end of the anus, subgenital plates and lateral processes (bifurcation) and gonopore of the aedeagus. d) Position of the connective and the points of insertion of the pigofer, stiles and lateral processes. e) Anterior region of the abdomen

II) Detección de fitoplasmas en los insectos y muestras foliares

Las hojas presentaron síntomas de amarillamiento (Figura 3 a), moteado (Figura 3 b) y deformaciones (Figura 3 c), los cuales guardan relación con los descritos en plantas asociadas con fitoplasma por diferentes autores (19, 31, 32).

El 80% de las muestras con síntomas resultó positivo a fitoplasmas. De los insectos recolectados, en 10 de ellos se determinó la presencia de fitoplasmas. Los cebadores utilizados (28) y las condiciones de PCR empleadas permitieron la amplificación específica de un fragmento de 1250 pb en las plantas y los saltahojas, similar al tamaño de la banda correspondiente al control positivo utilizado (Figura 4). El control negativo em-

pleado no mostró amplificación de bandas visibles. Estos resultados ratificaron la presencia de fitoplasmas en plantas de chaya y en los insectos asociados a esta planta en las condiciones de Cuba.

En el país no existía conocimiento de *Cnidoscolus chayamansa* como hospedante de *E. canavalia* y *E. papayae*.

DISCUSIÓN

La correcta identificación de las especies de insectos involucradas en la transmisión de enfermedades es una condición indispensable para manejarlas con éxito. El estudio taxonómico requiere de habilidades y experiencia del investigador y de la existencia de mu-

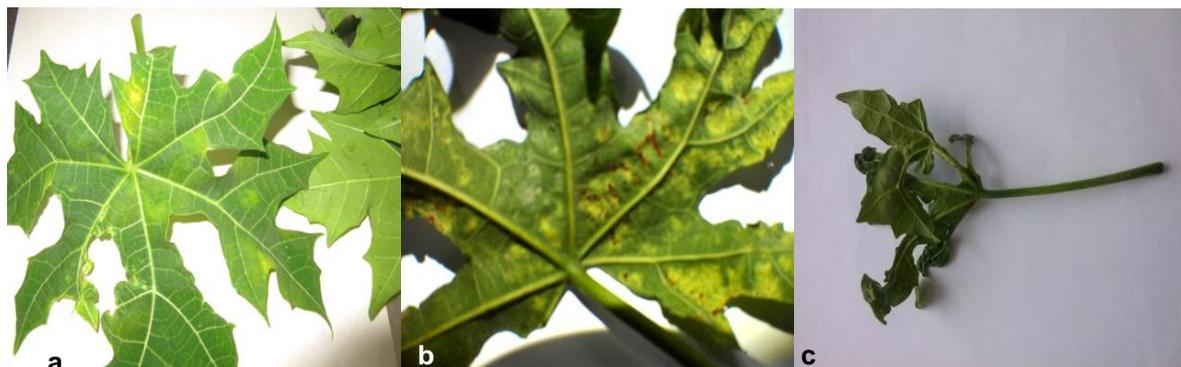


FIGURA 3. Síntomas observados en los folíolos de *C. chayamansa*. a) amarillamiento; b) moteado; c) deformación. / *Symptoms observed in folioles of C. chayamansa*. a) chlorosis; b) speckled leaves; c) deformation.

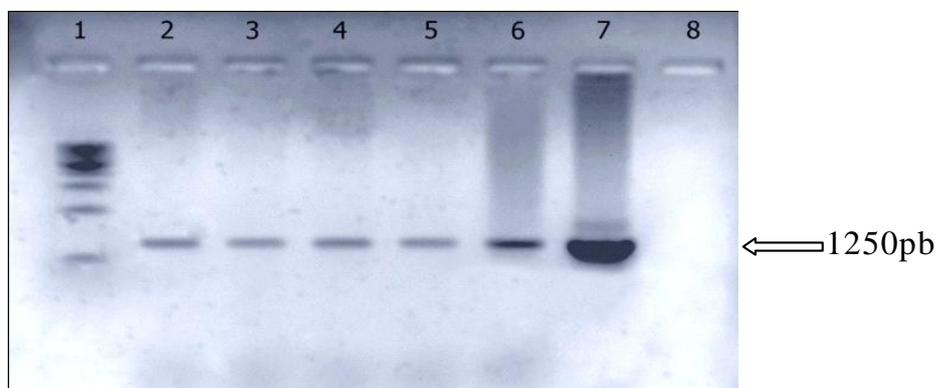


FIGURA 4. Detección de fitoplasmas en muestras foliares de chayamansa y en saltahojas con cebadores genéricos mediante PCR anidada. Línea 1, marcador de peso molecular 1kb (Promega EE.UU), línea 2-4, muestras foliares de chayamansa testadas por nPCR para fitoplasmas; líneas 5 y 6 muestras de insectos recolectados, línea 7: control positivo de fitoplasmas (*Ca. Phytoplasmas asteris*). / *Phytoplasma detection from chayamansa folioles and leafhoppers with generic primers by nested PCR*. Lane 1: 1 kb molecular weight marker (Promega USA); lanes 2-4: chayamansa leaf samples tested by nPCR for phytoplasmas; lanes 5 and 6: samples of insects collected; lane 7: phytoplasma positive control (*Ca. Phytoplasmas asteris*).

seos e instituciones científicas que poseen materiales de referencia. En Cuba no existen colecciones de especímenes o de las genitalias de los saltahojas que se han informado en el país para realizar consultas, lo que complejizó el trabajo de identificación de los insectos asociados a la chayamansa.

La familia Cicadellidae incluye el mayor número de vectores confirmados de fitoplasmas: Deltocephalinae, Aphrodinae, Cicadellinae, Coelidiinae, Iassinae, Idiocerinae, Macropsinae, Scarinae y Typhlocybiinae (33). Sin embargo, el hecho de detectar fitoplasmas en los insectos recolectados en plantas con síntomas

no implica que estos insectos sean los vectores de la enfermedad, pero representa el punto de partida del camino a transitar en el estudio de esta interacción. Para la verificación de la transmisión es necesario poner en práctica ensayos de transmisión; por lo que resulta imprescindible establecer las crías de insectos; en este caso, si la identificación de los fitófagos involucrados no es correcta, se incurriría en sesgos.

Empoascini y, muy particularmente, *Empoasca* resultan grupos de especies de suma complejidad para su tipificación. Son especies endebles y de pequeño tamaño, con apariencia similar externa y variabilidad

en sus estructuras, incluso en la genitalia (23, 24, 25, 27). Estos elementos, así como la falta de uniformidad en la denominación de sus estructuras y en el manejo de los aspectos a tener en cuenta en las claves dicotómicas, dan al traste con la comprensión para la determinación; de tal manera que en el sitio que confecciona un connotado taxónomo Dmitriev de Hemiptera Auchenorrhyncha no aparecen concluidas las claves interactivas de Emposcini y Emposca (34).

Al considerar estos elementos antes mencionado, además de las consecuencias que sobre las comunidades puede ejercer el efecto del cambio climático (35, 36) en los requerimientos de alimentación (37), en el incremento sustancial de las poblaciones en diferentes cultivos, en la alta movilidad -hechos observados en el desarrollo del presente trabajo-, se deben abordar los estudios de la interacción entre los vectores y los fitoplasmas en su ambiente, profundizar en los estudios morfológicos y moleculares de los saltahojas y en los biológicos y ecológicos como un todo, para alcanzar resultados exitosos. Es por ello que no debe apelarse a la detección de fitoplasma basándose en los insectos capturados en trampas (38). Se recomienda profundizar en los estudios morfológicos, biológicos y la iniciación de los moleculares de los saltahojas implicados y los ensayos de transmisión como vía segura para conocer los mecanismos involucrados en la interacción del sistema. Estos resultados son de gran valor para el perfeccionamiento de esta línea de trabajo que contribuirá a su manejo del sistema.

AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Rosario Quindelán por permitir los muestreos y recolectas de hojas e insectos en sus plantas, a los Doctores Mayra G. Rodríguez y Eduardo Sistachs por la revisión del documento, al Lic. Carlos González por la confección de imágenes y a la MC. Teresita Ruiz del CRIM-UNAM por la bibliografía enviada.

REFERENCIAS

1. Austin, DF. Florida Ethnobotany. CRC Press. 2004. p. 355. ISBN 978-0-8493-2332-4.
2. Booth S, Bressani R, Johns T. Nutrient content of selected indigenous leafy vegetable consumed by Kekchi people of Alta Verapaz, Guatemala. J Food Compos Anal. 1992;5:25-34.
3. Poot-López GR, Gasca-Leyva E, Olvera-Novoa MA. Producción de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus* L.) utilizando hojas de chaya (*Cnidoscolus chayamansa* McVaugh) como sustituto parcial del alimento balanceado. Latin American Journal of Aquatic Research. 2012;40(4):835-846.
4. Donkoh A, Kese AG, Atuahene CC. Chemical composition of chaya leaf meal (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) Johnston) and availability of its amino acids to chicks. Animal Feed Science and Technology. 1990;30(1-2):155-162.
5. Vandebroek I. Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants (Traditional Herbal Medicines for Modern Times) Paperback Ed: Amaya Smouyanath. The New York Botanical Garden in Economic Botany. 2007;61(1):336.
6. Escalante F, Campos I, Parra V, Rodríguez L. Chemical Composition of the Epicuticular Wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. Journal of the Mexican Chemical Society. 2004;48(1):24-25.
7. Mordi JC. Antidiabetic Potential of the Aqueous Leaf Extract of *Cnidoscolus aconitifolius* on Streptozotocin (STZ) Induced Diabetes in Wistar Rat. Hepatocytes Current Research Journal of Biological Sciences. 2012;4(2):164-167.
8. Mordi JC, Akanji MA. Phytochemical Screening of the Dried Leaf Extract of *Cnidoscolus aconitifolius* and Associated Changes in Liver Enzymes Induced by its Administration in Wistar Rats. Current Research of Biological Sciences. 2012;4(2):153-158.
9. da Silva GS. Chaya, *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh, a new host of *Meloidogyne incognita* race 2. AGRIS. 1992;14:138-140.
10. Jones P, Devonshire J, Dabek A, Howells C. First Report of Cassava Common Mosaic Potexvirus Infecting Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) in Tuvalu. Plant Disease 05/. 1998;82(5):591-591.
11. Lee IM, Bottner KD, Navarrete-Yábur A, Moreno VO. Chaya yellows phytoplasma strain ChaY-MX20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic. Genbank, 2009; Accesion N° FJ376623.
12. Sorensen J, Campbell BC, Gill RJ, Steffen-Campbell JD. Non-monophyly of Auchenorrhyncha («Homoptera»), based upon 13SrDNA phylogeny: Eco-evolutionary and cladistic implications within pre-heteropteroidea Hemiptera (s.l.) and a proposal for a new monophyletic Suborders. Pan-Pacific Entomology. 1995;71(1):31-60.

13. Ishii Y, Matsuura Y, Kakizawa Sh, Nikoh N, Fukatsua T. Diversity of Bacterial Endosymbionts Associated with *Macrostelus* Leafhoppers Vectoring Phytopathogenic Phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(16): 5013-5022.
14. Sardinha de Souza B, Gabriel de Oliveira J, Oliveira T, Ribeiro Campos A, Boiça A Jr. Infestação de *Empoasca kraemeri* Ross & Moore e *Caliothrips phaseoli* (Hood) em Cultivares de Feijoeiro, na Época da Seca, em Selvíria-MS, e os Efeitos na Produtividade. *EntomoBrasilis*. 2012;5(3): 204-210.
15. Song Y, Li Z Four new species of the leafhopper genus *Kapsa* Dworakowska from China (Hemiptera, Cicadellidae, Typhlocybinae), with a key to Chinese species. *ZooKeys*. 2012;212:25-23.
16. Yu XF, Yang MF. Three new species of the leafhopper genus *Dayus* Mahmood from China (Hemiptera, Cicadellidae, Typhlocybinae, Empoascini). *ZooKeys*. 2013;355:1-8.
17. Backus EA, Serrano MS, Ranger CM. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. *Annu Rev Entomol*. 2005; 50: 125-151.
18. Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S, Contaldo N. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*. 2014;5:1763-1788.
19. Dickinson M, Hodgetts J. Phytoplasma: Methods in Molecular Biology. Chapter 1. 2013;938:14.
20. Bosco D, D'Amelio R. Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In: Weintraub PG, Jones P (Eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Wallingford, UK. 2013;293-308.
21. Caldwell JS, Martorell LF. Review of the Auchenorynchous Homoptera of Puerto Rico Part I Cicadellidae. *J Agr Univ Puerto Rico*. 1950;34: 1-132, I-VIII.
22. Ross HH, Cunningham HB. A Key to the *Empoasca solana* Complex with Descriptions of New Species. *The Ohio Journal of Science*. 1960;60(5):309-317.
23. Neilson MW. The leafhoppers vectors phytopathogenic viruses (Homoptera, Cicadellidae). *Taxonomy, Biology and Transmission*. Agricultural Research Services. Unites States Department of Agriculture, Washington DC. Technical Bulletin. 1968; No. 1382: 385 pp.
24. Langlitz HO. The Economic Species of *Empoasca* in the Coastal and Sierra, Regions of Perú. *Revista Peruana de Entomología*. 1968;7(1):54-70.
25. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12(1):13-15.
26. Gundersen D, Lee I-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*. 1996;35:144-151.
27. Arocha Y, Horta D, Roque A, Peralta EL. Molecular detection of phytoplasmas in papaya in Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 2005;20(1): 20-26.
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. Second Edition. Eds by: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; 324-362p.
29. DeLong D, Davidson R. Further Studies of the Genus *Empoasca* (Homoptera, Cicadellidae). Part III, Seventeen New Species of *Empoasca* from the United States and Canada. *The Ohio Journal of Science*. 1935;35(1):29-39.
30. Pérez L, Borges M, Luis M. Aspectos sobre biología, ecología y manejo de *Empoasca papayae* Oman (Homoptera: Cicadellidae). *Boletín Informativo NotiCitriFrut*. 2008;10:1-4.
31. Arocha Y, López M, Piñol B, Fernández M, Picornell B, Almeida R, et al. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55:2451-2463.
32. Acosta K, Piñol B, Arocha Y, Wilson M, Boa E, Lucas J. Transmission of Phytoplasma Associated with Bunchy Top Symptom of papaya by *Empoasca papayae* Oman. *J Phytopathol*. 2010;158:194-195.
33. Bosco D, Tedeschi R. Insect Vector Transmission Assays. Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts (Eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. 2013; © Springer Science+Business Media, LLC Chapter 7. 938: 73-84.

34. Dmitriev D. Leafhoppers (*Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadellidae*). 3I Interactive Keys and Taxonomic Databases 2014. <http://dmitriev.speciesfile.org/index.asp>. Consultado: 1/11/2014.
35. Bacon SJ, Aebi A, Pierluigi C, Bacher S. Ed: John Wiley & Sons Ltd. Quarantine arthropod invasions in Europe: the role of climate, hosts and propagule pressure. *Diversity and Distributions*. 2014;20:84-94.
36. Nooten SS, Andrew NR, Huges L. Potential Impacts of Climate Change on Insect Communities: A transplant Experiment. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e85987.
37. Trêbicki P, Tjallingii W, Harding R, Rodoni B, Powell K. EPG monitoring of the probing behaviour of the common brown leafhopper *Orosius orientalis* on artificial diet and selected host plants. *Arthropod-Plant Interactions*. 2012; 1-26.
38. Dakhil HA, Abou-Fakhr HE, El-Mohtar C, Abou-Jawdah Y. Survey of leafhopper species in almond infected with almond witches- broom phytoplasma in Lebanon. *Journal of insect Science* 2011;11:60.

Recibido: 8-6-2015.
Aceptado: 13-7-2015.