

**Estudio del modo de transmisión de la  
Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia  
sepium* causada por un fitoplasma**

Gladys Karina Andino Bautista

**Honduras**  
Diciembre, 2002

**ZAMORANO**  
**CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

**Estudio del modo de transmisión de la  
Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia*  
*sepium* causada por un fitoplasma**

Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Gladys Karina Andino Bautista**

**Honduras**  
Diciembre, 2002

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Gladys Karina Andino Bautista

**Honduras**  
Diciembre, 2002

**Estudio del modo de transmisión de la Enfermedad de la Hoja  
Pequeña de *Gliricidia sepium* causada por un fitoplasma**

presentado por:

Gladys Karina Andino Bautista

Aprobada:

---

María Mercedes Doyle, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.  
Coordinador de la Carrera de  
Ciencia y Producción Agropecuaria

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph.D.  
Decano Académico

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Coordinador de Área Temática  
Fitotecnia

---

Mario Contreras, Ph.D.  
Director General

## **DEDICATORIA**

A mi papá Dios todo poderoso  
A mi mamá por su gran sacrificio  
A mis hermanos  
A mi familia  
A mis amigos

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco con todo mi corazón a Dios por ser mi refugio, por su amor incondicional, por su apoyo, por nunca dejarme sola y por haber forjado en mí un carácter fuerte.

A mi mamá por su enorme sacrificio, por su amor inigualable y su apoyo incondicional.

A mi segunda mamá, mi hermana Silvia por sus cuidados y dedicación, Gracias por ser un ejemplo y creer en mí.

A mi hermano Fredy por su amor y creer en mí.

A Clarissa, Katherine, Luis y Marcela por ser personitas especiales.

A toda mi familia por su apoyo y cariño, especialmente a mi Tío Tulio y mi primo Alexander.

A mis Asesores por creer en mí, por su apoyo y su guía.

A Estela por su ayuda incondicional y amistad sincera.

Al personal de CPA del área de fitotecnia por su ayuda incondicional, especialmente a Chimino, Doña Rosa, Silvia, Don Gregorio y Doña María.

A Camilo por su amistad sincera, por su apoyo por creer en mí, por su paciencia y por estar en los buenos y malos momentos.

A Damaris, Noe y Chester por su amistad incondicional y porque desde la distancia siempre estuvieron conmigo.

A Yeimi, Karla, Medardo, Dennis y Yaleni por creer en mí.

A Siby, Viky y Rose, por que más que mis amigas fueron mis hermanas, Gracias por apoyarme, por darme siempre ánimos, por escucharme y por estar en los buenos y malos momentos.

A todos mis amigos en Zamorano, con los que compartí buenos y malos momentos, fueron pacientes y supieron escucharme en especial a Wendy, Eda, Guillermo, Luis, Rodolfo y Juan .

A Marco, porque durante nuestro tiempo juntos fue un apoyo e inspiración.

A todas la personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de esta tesis y la culminación de mi carrera. A todos de todo corazón gracias.

## **AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**

Al International Science Foundation por el apoyo financiero necesario para la realización de este proyecto.

Al fondo Food for Progress y a la Secretaria de Agricultura y Ganadería (SAG) de Honduras por el apoyo financiero otorgado en la realización de mis estudios.

## RESUMEN

Andino, Gladys. 2002. Estudio del modo de transmisión de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia sepium* causada por un fitoplasma. Proyecto especial de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 61 p.

Cada vez se descubren más enfermedades causadas por fitoplasmas que antes eran atribuidas a virus o de etiología desconocida; estas enfermedades pueden causar considerables pérdidas económicas en los cultivos y en especies forestales. La enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia* (EHPG), descubierta en Honduras en 1992, es causada por un fitoplasma. Los fitoplasmas no pueden ser transmitidos por semilla y las prácticas de manejo no consideran este tipo de transmisión. Los síntomas de la EHPG muestran una marcada reducción de los folíolos y una muerte regresiva y lenta del árbol. Para la transmisión por insecto se trabajó con la especie *Empoasca hastosa* (Homoptera: Cicadellidae) que es la especie más predominante en *G. sepium* en Zamorano. En insectos no se logró detectar el ADN del fitoplasma con pruebas moleculares (nested PCR). También se estudió la transmisión del fitoplasma por *Empoasca hastosa* con bioensayos. Se trasladaron insectos, previamente expuestos al patógeno en un árbol enfermo, a plántulas sanas puestas en una jaula con malla anti-insectos. El 10% de las plántulas expuestas a *Empoasca hastosa* resultaron positivas, lo que sugiere que esta especie es capaz de transmitir el fitoplasma a un hospedero sano. También se estudió la transmisión por semilla. Se seleccionaron nueve árboles y se clasificaron en tres diferentes niveles de infección de la enfermedad dentro del campus de Zamorano (sanos, leves y moderadamente enfermos; no se incluyeron los árboles severamente enfermos ya que no produjeron semillas). Se confirmó la transmisión del fitoplasma detectando ADN del patógeno por nested PCR, en 15% de las plántulas provenientes de árboles moderadamente enfermos. Se observó que las plántulas positivas al fitoplasma tenían menos hojas que las plántulas sin fitoplasma ( $P < 0.03$ ). También para comprobar la transmisión del fitoplasma por semilla se realizó un análisis con marcadores moleculares (RFLP's) utilizando ocho enzimas de restricción. Se observaron perfiles idénticos de restricción entre un árbol progenitor y una plántula hija con las enzimas (*Eco RI*, *Hind III* y *Rsa I*), lo que sugiere que la secuencia de ADN encontrada en ambos casos es la misma. Estos resultados confirman la transmisión del fitoplasma de la EHPG por semilla y constituyen el primer reporte de transmisión por semilla de un fitoplasma.

**Palabras clave:** ADN, *Empoasca hastosa*, madreado, PCR, RFLP's, técnicas moleculares, transmisión por insecto, transmisión por semilla.

## NOTA DE PRENSA

### SE DESCUBRE QUE FITOPLASMAS PUEDE SER TRANSMITIDOS POR SEMILLA

En el Laboratorio Molecular de Zamorano se descubrió por primera vez, que un tipo de patógeno de plantas conocido como fitoplasma, puede ser transmitido por semilla. Este descubrimiento, contradice lo que cita la literatura hasta la fecha.

Los fitoplasmas son organismos parecidos a las bacterias que carecen de pared celular y no pueden ser cultivados en medios sintéticos, por lo que requieren de técnicas moleculares para su detección y estudio. El fitoplasma mas conocido en Honduras es el patógeno causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

El fitoplasma estudiado en esta investigación, causa la enfermedad conocida como la Hoja Pequeña de Gliricidia (EHPG) que ataca al madreño, una especie forestal de múltiples usos y ampliamente cultivada en Centro América.

Los síntomas incluyen amarillamiento y reducción de las hojas, muerte regresiva de las ramas y eventualmente la muerte del árbol. Por mucho tiempo, este tipo de síntomas se relacionaron con los producidos por virus. En la actualidad se conocen más de 600 enfermedades causadas por fitoplasmas.

En Zamorano se han estudiado, hasta la fecha, varios aspectos de esta enfermedad, como su distribución y su forma de transmisión utilizando técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN, complementadas con experimentos de campo.

En 1997 se comenzó con la evaluación de una plantación de madreño establecida en Zamorano a inicios de esa década, en donde se evaluaron procedencias tolerantes a esta enfermedad. En 1999, se estableció un laboratorio molecular en Zamorano donde se optimizó el método de detección del patógeno desarrollado por la Universidad de la Florida.

En el 2000, se realizaron estudios posteriores que identificaron a 5 especies de insectos como posibles vectores de la enfermedad. Una especie de chicharrita (*Empoasca hastosa*), fue capaz de transmitir el fitoplasma a un hospedero sano, confirmando como uno de los vectores de la enfermedad.

Aunque esta enfermedad no representa un problema serio actualmente, podría causar pérdidas económicas cuantiosas si llegara a convertirse en una epidemia, como la

observada con el Amarillamiento Letal del Cocotero. El estudio de la EHPG ha servido de modelo para estudiar varios aspectos de la epidemiología de la enfermedad del cocotero.

---

Lic. Sobeyda Álvarez

## CONTENIDO

|         |  |      |
|---------|--|------|
|         | Portadilla.....  | i    |
|         | Autoría.....   | ii   |
|         | Páginas de firmas.....   | iii  |
|         | Dedicatoria.....   | iv   |
|         | Agradecimientos.....   | v    |
|         | Agradecimientos a patrocinadores.....                                    | vi   |
|         | Resumen.....   | vii  |
|         | Nota de prensa.....  | viii |
|         | Contenido.....   | x    |
|         | Índice de cuadros.....   | xiii |
|         | Índice de figuras.....   | xiv  |
|         | Índice de anexos.....  | xvi  |
| 1.      | <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1    |
| 1.1     | OBJETIVOS.....   | 2    |
| 1.1.1   | Objetivos generales.....   | 2    |
| 1.1.2   | Objetivos específicos.....   | 2    |
| 2.      | <b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....                                      | 3    |
| 2.1     | <b>CARACTERÍSTICAS GENERALES Y USOS DEL MADREADO</b> .....               | 3    |
| 2.1.1   | Descripción.....   | 3    |
| 2.1.2   | Usos agroforestales.....   | 3    |
| 2.1.3   | Distribución.....  | 8    |
| 2.1.4   | Ecología.....  | 8    |
| 2.1.5   | Silvicultura.....  | 8    |
| 2.1.6   | Propagación.....   | 8    |
| 2.1.6.1 | Propagación sexual.....  | 8    |
| 2.1.6.2 | Recolección de semillas.....   | 9    |
| 2.1.6.3 | Propagación asexual.....   | 9    |
| 2.1.7   | Importancia socio-económica de <i>Gliricidia sepium</i> en Honduras..... | 10   |
| 2.2     | <b>AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE LA EHPG: UN FITOPLASMA</b> .....    | 10   |
| 2.2.1   | Historia en importancia económica.....                                   | 10   |
| 2.2.2   | Morfología.....  | 11   |
| 2.1.3   | Sensibilidad a antibióticos.....   | 11   |
| 2.2.4   | Características de crecimiento.....                                      | 12   |
| 2.2.5   | Sintomatología.....  | 13   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.2.6   | Taxonomía.....   | 13 |
| 2.2.7   | Conocimiento actual sobre la Enfermedad de la Hoja Pequeña de Gliricidia.....  | 15 |
| 2.3     | DETECCIÓN DEL FITOPLASMA POR PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....   | 15 |
| 2.3.1   | Descripción de la técnica.....   | 15 |
| 2.3.2   | Utilidad de la técnica.....  | 16 |
| 2.3.3   | Uso de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de la hoja pequeña de Gliricidia.....  | 16 |
| 2.4     | TRANSMISIÓN DE LOS FITOPLAMAS POR INSECTOS VECTORES  | 17 |
| 2.4.1   | Historia.....  | 17 |
| 2.4.2   | Adquisición e incubación del fitoplasma en el insecto vector.....  | 17 |
| 2.4.3   | Transmisión.....   | 18 |
| 2.4.4   | Ejemplo de enfermedades causadas por fitoplasmas.....  | 18 |
| 2.4.4.1 | Amarillamiento letal del cocotero (ALC).....   | 18 |
| 2.4.4.2 | Enfermedad de la caña.....   | 19 |
| 2.4.4.3 | Enfermedad de la papa.....   | 19 |
| 3.      | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 23 |
| 3.1     | COMPROBACIÓN DE LA TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE LA EHPG.....   | 23 |
| 3.1.1   | Extracción de ADN.....   | 23 |
| 3.1.2   | Selección de árboles.....  | 24 |
| 3.1.3   | Germinación de semillas.....   | 25 |
| 3.1.4   | Análisis molecular para la detección de ADN del patógeno.....  | 25 |
| 3.1.5   | Nomenclatura utilizada para las muestras de árboles para cada nivel de severidad.....  | 25 |
| 3.2     | ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA COMPARAR EL ADN ASILADO DE FITOPLASMAS DE ÁRBOLES PROGENITORES Y PLÁNTULAS HIJAS..... | 27 |
| 3.2.1   | Nomenclatura de las muestras.....  | 27 |
| 3.2.2   | Extracción de ADN.....   | 28 |
| 3.2.3   | Amplificación de ADN.....  | 28 |
| 3.2.4   | Electroforesis horizontal de ADN.....  | 28 |
| 3.2.5   | Análisis de RFLP.....  | 29 |
| 3.2.6   | Digestión de las muestras. ....  | 30 |
| 3.2.7   | Comparación de los perfiles de restricción en geles de poliacrilamida al 8% .....  | 31 |
| 3.3     | IDENTIFICACIÓN DEL INSECTO VECTOR.....   | 31 |
| 3.3.1   | Recolección de insectos.....   | 32 |
| 3.3.2   | Análisis molecular por PCR insectos.....   | 32 |
| 4.      | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | 35 |
| 4.1     | CONFIRMACIÓN DE LA TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE LA EHPG.....   | 35 |
| 4.1.1   | Análisis de los árboles progenitores para la detección del fitoplasma.....   | 35 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.1.2 | Análisis molecular de plántulas de semillas obtenidas de árboles enfermos  | 36 |
| 4.1.3 | Análisis fenotípico.....   | 38 |
| 4.2   | COMPARACION DE LOS PERFILES DE RESTRICCIÓN<br>OBTENIDOS POR RFLP DEL ADN DE FITOPLASMAS DE ÁBOLES<br>PROGENITORES Y PLÁNTULAS HIJAS..... | 39 |
| 4.3   | IDENTIFICACIÓN DEL INSECTO VECTOR.....   | 40 |
| 5.    | <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 43 |
| 6.    | <b>RECOMENDACIONES</b> .....   | 44 |
| 7.    | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 45 |
| 8.    | <b>ANEXOS</b> .....  | 52 |

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Secuencia de primers universales y específicos utilizados en la detección de genes 16S ARN y 23 ARN de fitoplasmas.....                     | 24 |
| 2. | Enzimas de restricción utilizadas en los análisis de RFLP del fitoplasma causante de la enfermedad de la Hoja Pequeña de Gliricidia .....   | 30 |
| 3. | Nested PCR y % de transmisión realizada a las plántulas germinadas de semillas recolectadas de árboles con distinto nivel de infección..... | 37 |
| 4. | Número de hojas de plántulas germinadas a partir de semillas.....<br>provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos.....             | 38 |
| 5. | Altura en (cm) de plántulas germinadas a partir de semillas provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos.....                      | 39 |
| 6. | Diámetro en (mm) de plántulas germinadas a partir de semillas provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos.....                    | 39 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.  | Caracterización de las hojas, flores y frutos de <i>G. sepium</i> .....  | 5  |
| 2.  | Inflorescencia de <i>Gliricidia sepium</i> .....   | 6  |
| 3.  | Hojas maduras de <i>Gliricidia sepium</i> .....  | 6  |
| 4.  | Cerca viva de <i>Gliricidia. sepium</i> (uno de los principales usos de esta especie).....   | 6  |
| 5.  | <i>Gliricidia sepium</i> utilizada como forraje para ovejas en pastoreo.....   | 7  |
| 6.  | <i>Gliricidia sepium</i> utilizada como forraje para búfalos de agua.....  | 7  |
| 7.  | Plántulas de <i>Gliricia sepium</i> producidas bajo invernadero.....   | 9  |
| 8.  | Fotografía electrónica de cuerpos de fitoplasmas en el floema de una planta .....  | 11 |
| 9.  | Árbol filogenético de 62 fitoplasmas, representando a los 15 grupos filogenéticos.....   | 14 |
| 10. | Exceso de ramificación en <i>Euphorbia pulcherrima</i> causado por fitoplasmas.....  | 20 |
| 11. | Escoba de bruja en zanahoria causado por fitoplasmas.....  | 21 |
| 12. | Mal formación de raíces adventicias en zanahoria causada por fitoplasmas   | 21 |
| 13. | Filodia en fresa causada por fitoplasmas.....  | 22 |
| 14. | Flujo de proceso para el ensayo de transmisión por semilla.....  | 25 |
| 15. | Diagrama del flujo de proceso seguido para realizar la técnica RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) obtenidos por medio de la digestión del ADN aislado de fitoplasmas de árboles progenitores y plántulas..... | 31 |
| 16. | Flujo de proceso para el ensayo de transmisión por <i>Empoasca hastosa</i>   | 33 |
| 17. | Jaula de malla fina en ramas de árbol enfermo (a) y jaula de malla fina para plántulas germinadas a partir de árboles sano, leve y moderadamente enfermos.....   | 33 |
| 18. | Ensayo de evaluación de transmisión por semilla de la EHPG (las plántulas fueron obtenidas de árboles progenitores enfermos y serán mantenidas para su evaluación en una ambiente protegido contra insectos).....                              | 34 |
| 19. | Gel de agarosa al 1% mostrando la detección de ADN del fitoplasma causante de la EHPG en árboles progenitores enfermos que resultaron (+) por PCR directo utilizando los primers P1 y P7.....  | 35 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 20. | Gel de agarosa al 1% mostrando la detección del fitoplasma causante de la EHPG en árboles progenitores enfermos que resultaron (+) por nested PCR utilizando los primers PP/GLLF y PP/GLLR.....   | 36 |
| 21. | Gel de agarosa al 1% mostrando la detección del fitoplasma causante de la EHPG en árboles progenitores enfermos y plántulas hijas confirmando la transmisión por semilla de la EHPG utilizando los primers PP/GLLF y PP/GLLR.....                                 | 36 |
| 22. | Geles de poliacrilamida al 8% mostrando los perfiles de restricción obtenidos de la digestión de los productos de reamplificación con los primers (PP/GLLF y PP/GLLR) específicos para la EHPG con las enzimas <i>Hind I</i> , <i>Eco RI</i> y <i>Rsa I</i> ..... | 40 |
| 23. | Gel de agarosa al 1% mostrando resultados al finalizar los 15 días de la fase de exposición y adquisición del fitoplasma en tejidos del follaje y tejidos de <i>Empoasca hastosa</i> . .....  | 41 |
| 24. | Gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de la fase de transmisión e incubación del fitoplasma por <i>Empoasca hastosa</i> a plántulas sanas.....  | 42 |

**ÍNDICE DE ANEXOS**

|  | Anexo |
|--|-------|
| 1. Lista de plantas hospederas de fitoplasmas en Venezuela.....            | 53    |
| 2. Protocolo de extracción de ADN utilizados en el estudio.....            | 54    |
| 3. Rehidratación de las PCR vedas.....                                     | 57    |
| 4. Protocolos para Reacción en Cadena de la Polimerasa.....                | 57    |
| 5. Preparación de reacciones de digestión con enzimas de restricción ..... | 60    |
| 6. Protocolos para la preparación de geles de poliacrilamida al 8%.....    | 61    |

## 1. INTRODUCCIÓN

*Gliricidia sepium* (Jacquin) es localmente conocido como madreado. Perteneció a la familia de las leguminosas (papilionoideae), es una especie forestal nativa de México y América Central adaptada a una estación seca bien definida. Por su buena adaptación, ha sido introducida en muchas zonas tropicales y naturalizada en varios países (CATIE, 1991). Se han reportado alrededor de treinta patógenos fungosos (Boa y Lenné, 1996) relacionados con *G. sepium*. También se han reportado otras plagas que incluyen termitas del suelo, escamas harinosas y áfidos. En 1993, Boa y Lenné (1993) reportaron en la Soledad, Honduras por primera vez una nueva enfermedad de etiología desconocida y potencialmente letal para la especie. Los síntomas característicos de esta enfermedad son amarillamiento, reducción y distorsión de los folíolos, caída prematura, proliferación de brotes, entrenudos reducidos y en algunos casos los síntomas avanzan resultando en una muerte regresiva de los brotes o de las ramas y a veces muerte de los árboles jóvenes. A esta enfermedad se le dio el nombre de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia* (EHPG), (Boa y Lenné, 1993). Estudios realizados por Kenyon *et al.*, (1997) establecieron a un fitoplasma como el agente causal de la enfermedad. Las enfermedades causadas por fitoplasmas son cada vez más reconocidas y han tomado mucha importancia económica en los últimos años. En principio se creía que la EHPG podría causar serias pérdidas económicas como lo ha sido la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero. Si embargo aunque la sintomatología de la EHPG no es tan rápida representa una fuerte amenaza, ya que en el futuro podrían verse mermados los miles de kilómetros de cercas vivas y bosques nativos de *G. sepium* existentes. Por esta razón la importancia de realizar estudios que nos ayuden a entender la epidemiología de la enfermedad con fin de contribuir al desarrollo de estrategias apropiadas de manejo. Aún no se ha confirmado el vector principal de la enfermedad pero estudios realizados en Zamorano sugieren cinco posibles agentes: *Empoasca hastosa*, *Ollarianus sp.*, *Alconeura sp.*, *Hydatothrips gliricidiae* y *Lopidea murray* (Saballos, 1999). *Ollarianus sp.* es conocido como el vector de la enfermedad escoba de bruja en *Cajanus cajan*. Según Campaña (2000) la especie *Empoasca hastosa* es capaz de transmitir el fitoplasma a un hospedero sano de *G. sepium*.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

Estudiar el modo de transmisión de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia sepium* causada por un fitoplasma a través de bioensayos y pruebas moleculares con el fin de contribuir al desarrollo de estrategias apropiadas de manejo de dicha enfermedad.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

1. Confirmar si el fitoplasma causante de la EHPG se puede transmitir a partir de semillas.
2. Realizar un análisis utilizando marcadores moleculares (RFLP's) de los aislamientos de ADN extraídos de los árboles progenitores y plántulas hijas para confirmar la transmisión por semilla.
3. Continuar con los estudios de transmisión de la EHPG por insectos vectores.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES Y USOS DEL MADREADO

**Nombres científico:** *Gliricidia sepium*

**Nombres comunes:** A esta especie se le conoce comúnmente como "madreado" en Honduras, "madre negro" en Costa Rica, "madrecacao" en Guatemala, "mata ratón" en Colombia y "cocoite" en México.

#### 2.1.1 Descripción

Según Keay (1989), *Gliricidia* viene del Latin "veneno de ratón" ya que las semillas son venenosas para perros, ratas y caballos. Es una especie de tamaño pequeño a mediano que alcanza alturas de 2 a 15 metros, puede ser de tallo sencillo o tallos múltiples, con troncos de diámetros de 30cm. La corteza es entre gris-café y blanquecino y puede ser profundamente corrugada en los árboles viejos de grandes diámetros (Lavin, 1996). Las hojas son opuestas en su composición y alternas de 20 a 30 cm de largo. Las hojas tiernas son generalmente opuestas de forma oblonga y puntiaguda. En algunos especímenes las hojas pueden ser elípticas con puntas redondeadas. Hay de 7 a 25 retoños en cada hoja y el tamaño aumenta hacia la punta. Los retoños tienen de 40 a 80 mm de ancho (Lavin, 1996).

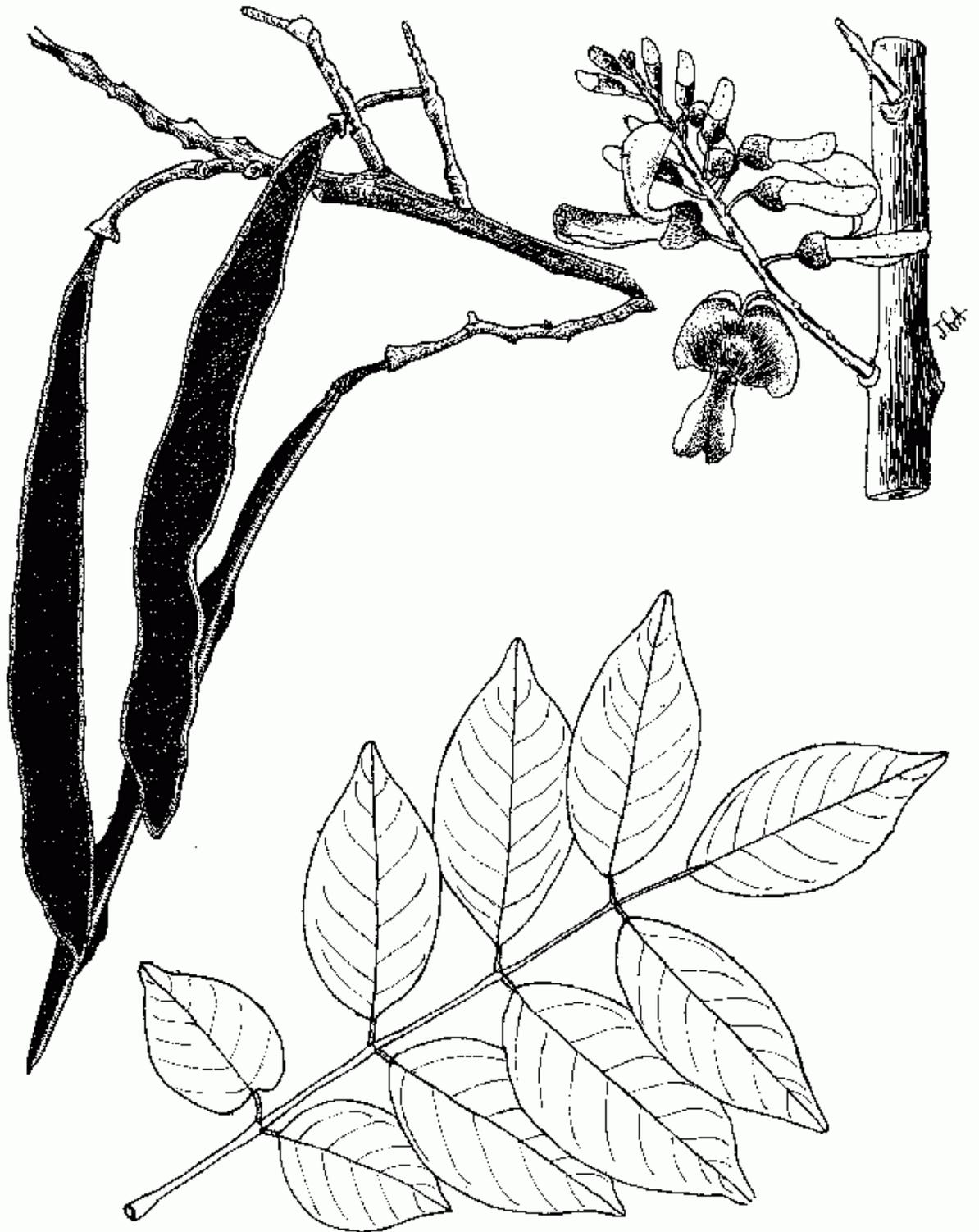
La floración corresponde al comienzo de la estación seca cuando los árboles han perdido sus hojas. En su medio natural la floración ocurre de noviembre a marzo. En áreas sin una estación seca pronunciada, la floración puede ocurrir todo el año pero se forman pocas vainas (Lavin 1996, Simons 1996). Las flores son de color rosado a rosado pálido, desvaneciéndose a blanco con manchas café o púrpura desvanecido con la edad (Lavin 1996). Las flores son polinizadas por las abejas solitarias más grandes *Xylocopa fimbriata* y las especies *Centris* en el medio natural del árbol (Simons 1996).

#### 2.1.2 Usos agroforestales

- **Cercas vivas.** *G. sepium* es probablemente la especie para cerca viva más común en los trópicos americanos. La modalidad del cultivo de árboles en cercas vivas les permite a los propietarios de pequeñas fincas, incorporar el componente forestal en

sus propiedades sin tener que reducir el área dedicada a los cultivos alimenticios y pastos. Los postes para cercas se establecen con estacas grandes. Pueden plantarse de 1 a 2 m de espaciado y unirse con alambres de púas o bambú. Alternativamente pueden plantarse de 10 a 20 cm de distancia como una empalizada y sus ramas entretejidas (Stewart *et al.*, 1996).

- **Madera.** La madera es dura y pesada, con la albura (parte externa de la corteza) y el duramen (que es la parte interna de la corteza) bien definidos. El duramen varía de color desde amarillo a café oscuro con marcas finas. Tiene textura moderadamente fina y gran entrelazado en forma irregular (Gonzales, 1978). Tradicionalmente se le utiliza como madera para construcciones rústicas como horcones, marcos de puertas, bases de puertas y ventanas, etc. Los troncos gruesos se usan como postes de teléfonos. Se usa como durmientes de ferrocarril y estacas o postes muertos para corrales y cercas (Internacional Institute of Tropical Agriculture, 1979)
- **Sombra y abono verde.** Debido a que tiene ramas largas y muchas hojas, es una especie ideal para sombra. Se usa para proporcionar sombra a las plantas de cacao, café, vainilla y té. Pero en sitios con estación seca marcada *G. sepium* pierde su follaje perdiendo su valor de árbol de sombra. El follaje es rico en nitrógeno, por lo tanto, las hojas que caen enriquecen el suelo bajo los árboles. Su follaje se puede cortar con el fin de fertilizar lo cultivos cercanos (CATIE, 1984).
- **Leña.** Donde quiera que crece *G. sepium*, su madera dura y pesada se utiliza como combustible. Aunque no es un árbol alto, sus ramas producen mucha madera y rebrota fácilmente. Su valor calorífico es de 4900 kcal/kg (CATIE, 1984).
- **Forraje.** Respondiendo bien a las podas frecuentes, el madreado produce cantidades abundantes de forraje nutritivo que contiene de 18 a 30% de proteína cruda. El ganado responde bien a la alimentación con madreado. Algunos animales se rehusan a comer madreado, pero ofrecerlo regularmente puede superar este problema. Una vez que el madreado es aceptado, las crías subsiguientes se aprestan a consumirlo. Se reportan problemas de toxicidad con animales que no son rumiantes. Podar los árboles antes de la estación seca permite que el rebrote crezca para ser guardado como alimento en la estación seca. Las plantaciones para forraje varían desde filas para linderos con 10 a 50 cm de espacio en la fila y 1 a 4 m espaciado entre las filas, hasta plantaciones en bloques de 50 x 50 cm a 1 x 3 m. La producción de forraje varía de 2 a 20 t/ha/año (Glover, 1989).



**Figura 1.** Caracterización de las hojas, flores y frutos de *Gliricidia sepium*.  
Fuente: CATIE, 1991.



**Figura 2.** Inflorescencia de *Gliricidia sepium*  
Foto: Rinehart, 2000



**Figura 3.** Hojas maduras de *G.sepium*  
Foto: Mudge, 1995



**Figura 4.** Cerca viva de *Gliricidia sepium* (uno de los principales usos de esta especie).  
Foto: Shelton, 2002



**Figura 5.** *Gliricidia sepium* utilizada como forraje para ovejas en pastoreo.  
Foto: Sheldon, 2002



**Figura 6.** *Gliricidia sepium* utilizada como forraje para búfalos de agua.  
Foto: Sheldon, 2002

### 2.1.3 Distribución

Es uno de los árboles más comunes y mejor conocidos en América Central, se introdujo en Las Antillas y las Filipinas donde se está convirtiendo en una especie naturalizada, también se ha introducido en África, Asia y Nigeria. Se ha plantado en el sur de la Florida y en América del sur, hasta Brasil (CATIE, 1984). Las introducciones más recientes se han llevado a cabo en los últimos 20 años, por el potencial de la especie como componente de sistemas agroforestales. Este interés resultó en esfuerzos de recolección de semillas del madreado en América tropical que fueron introducidas en 55 países de regiones tropicales, lo que ha causado una alta demanda por semillas (Stewart *et al.* 1996).

### 2.1.4 Ecología

El rango de lluvia óptimo requerido para su desarrollo generalmente es de 900 a 1,500 mm/año, pero puede ser tan bajo como de 600 mm o tan alto como de 3,500 mm (Simons, 1996). El madreado sobrevive a estaciones secas de 9 meses en Indonesia. Crece bien en suelos húmedos o secos, incluso en suelos que tienen una gran concertación calcárea (CATIE, 1984). Tolerancia los suelos ácidos, pero no la acidez severa (pH menor a 4.5). Es un pionero agresivo, pronto coloniza los suelos infértiles y recupera las praderas maltratadas (MacDicken *et al.*, 1997) y por eso ha sido usada ampliamente en programas de reforestación en suelos pobres.

### 2.1.5 Silvicultura

El madreado es una de las especies que tiene mayor versatilidad en Honduras a raíz de sus diversas formas de reproducción como por sus múltiples usos. El método más común de reproducción es a través de estacas, cuyas dimensiones varían dependiendo del objetivo. (CATIE, 1997).

### 2.1.6 Propagación

**2.1.6.1 Propagación sexual.** La semilla es de color amarillo a café. Bajo condiciones óptimas de almacenaje, 6 a 10 % del contenido de humedad a 4°C, la semilla permanece buena durante más de 10 años (Steward *et al.*, 1996). A un contenido de 50% de humedad y 17°C la semilla puede ser almacenada por un año. La semilla se planta sin tratamiento previo directamente en contenedores de invernadero. Se recomienda prácticas normales de manejo de invernadero. Las plántulas están listas para transplantar después de 2 a 3 meses en el invernadero, a una altura de 30 cm. La siembra directa es posible de 2 a 3 semillas por postura a una profundidad de 1 a 2 cm. se requiere la preparación del

sitio para reducir la competencia. La siembra directa y las operaciones de transplante deben coincidir con la época lluviosa. Las plántulas son sensibles a la competencia. El control regular de la maleza debe practicarse hasta que los árboles se hayan establecido bien (Ramírez, 2000).



**Figura 7.** Plántulas de *Gliricidia sepium* producidas bajo invernadero.  
Foto: Mudge, 1995

**2.1.6.2 Recolección de semillas.** En su ambiente de distribución natural, la floración y fructificación es relativamente uniforme. En la zona sur de Honduras este proceso se inicia en diciembre y se extiende hasta marzo y abril. En la zona del litoral Atlántico existe el problema de la baja producción de semillas, debido probablemente a las condiciones de más alta precipitación por un tiempo más prolongado; lo que interrumpe el ciclo normal de reproducción (CATIE, 1997).

**2.1.6.3 Propagación asexual.** El madreado se propaga por medio de semillas y estacas. Cuando se va a plantar en cercas vivas se recomienda utilizar estacas de 1 a 2.5 m de largo y los mejores resultados se obtienen con estacas de 6 a 7 cm de diámetro y una edad entre 18 y 22 meses. Además, debe tener yemas visibles sin desgarramientos ni rajaduras. El corte apical debe ser inclinado para favorecer el escurrimiento de agua y evitar posibles ataques de plagas o enfermedades. La cáscara en la porción de abajo del corte debe ser raspada con un cuchillo afilado para estimular el crecimiento de raíces. Según Kenyon *et al.*, (1996) las estacas deben ser plantadas, espaciadas a 1-2 m entre estaca y estaca y 10- 20 cm (en algunos casos 30cm) de profundidad a lo largo de la barrera viva. Las estacas son siempre sembradas en la época seca; ya que existe el riesgo de que la planta durante la época lluviosa resultara en una pudrición de las mismas. Una de las principales razones por la cual es tan popular el madreado es por su fácil establecimiento, usualmente con menos del 10% de mortalidad en el primer año (Kenyon *et al.*, 1996).

### **2.1.7 Importancia Socio- económica de *Gliricidia sepium* en Honduras**

Según Kenyon *et al.*, (1996) *G. sepium* es una especie forestal de considerable importancia social y económica en Honduras la cual está aumentando internacionalmente. Su pérdida se vería reflejada fuertemente en el sector agrícola/rural. Es una especie de fundamental importancia en la parte noreste del país, debido a la predominancia de la misma y al casi exclusivo uso como cerca viva, por lo que se ha estimado que el remplazo de estas, tiene un costo de aproximadamente \$358 por km de cerca viva (Kenyon *et al.*, 1996). Además la gran variedad de usos del madreaje confirma su popularidad y significancia, a pesar de que existen varios sustitutos (*Bursera simarouba*, *Erythrina sp.* y *Cordia dentata*) es muy difícil encontrar un solo árbol que compita con *G. sepium* en cuanto al gran rango de usos y productos que esta especie provee.

Cada vez se reportan más enfermedades que son causadas por fitoplasmas que pueden causar considerables pérdidas económicas. Boa y Lenné (1993), reportaron por primera vez en Honduras una enfermedad de etiología desconocida que afecta al madreaje, que fue denominada Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia* (EHPG) y es causada por un fitoplasma. En un principio se creía que dicha enfermedad presentaría una sintomatología tan rápida y devastadora como lo ha sido el caso de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (Castillo, 2001). Sin embargo esta enfermedad representa una amenaza potencial para el madreaje. Por estas razones es que se debe continuar estudiando la epidemiología de la EHPG con el fin de contribuir al desarrollo de estrategias apropiadas de manejo de la enfermedad.

## **2.2 AGENTE CAUSAL DE LA EHPG: UN FITOPLASMA**

### **2.2.1 Historia e importancia económica**

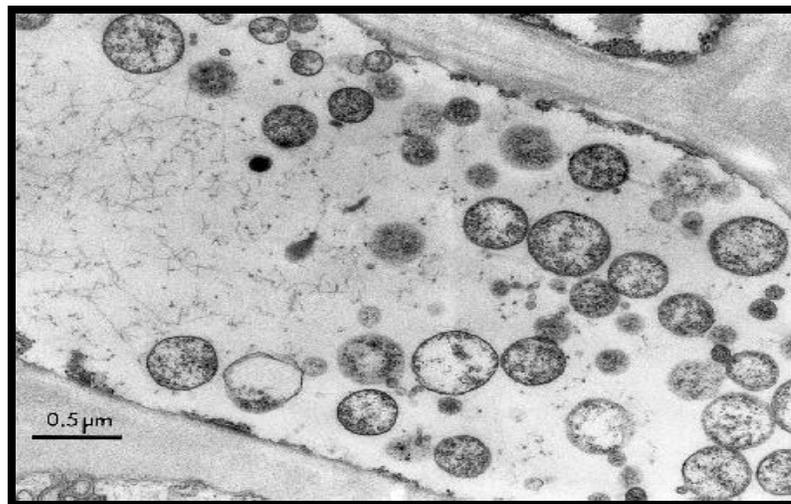
En 1967 Doi *et al.* (1967) demostraron la presencia de organismos tipo micoplasmas (MLO) actualmente conocidos como fitoplasmas, en el floema de plantas infectadas con enfermedades que hasta la fecha eran atribuidas a virus, ya que en muchos casos pueden presentar una sintomatología parecida.

Según Cousin, (1995) los fitoplasmas conllevan a una alteración de los cultivos y en algunos casos a la destrucción total de los mismos. Son perjudiciales en países templados y desastrosos en países tropicales a causa de los ciclos continuos de las plantas adventicias y los insectos vectores. En climas templados afectan principalmente las viñeras, los árboles frutales y las especies leñosas aromáticas utilizadas en medios urbanos, peri urbanos y forestales (anexo 1). Las enfermedades causadas por fitoplasmas se han diseminado en 40 especies leñosas aromáticas.

### 2.2.2 Morfología

Los fitoplasmas son organismos pequeños capaces de replicación autónoma (Salazar, 1996), parecidos a las bacterias que carecen de pared celular y presentan algunas características similares a los micoplasmas: estructura celular procariótica, morfología pleomórfica, dimensiones celulares de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$  y genoma muy pequeño (600 Kb), por lo que han sido agrupados en la clase *Mollicutes*. Pero todavía se diferencian de estos últimos en algunas características importantes: los fitoplasmas viven dentro de las células floemáticas de las plantas mientras que los micoplasmas patogénicos a animales y humanos tienen la capacidad de desarrollarse dentro de los espacios intercelulares de los tejidos que colonizan. Además, los fitoplasmas a diferencia de los micoplasmas no pueden ser cultivados sobre substratos artificiales debido a que carecen de los genes necesarios para la síntesis de algunos aminoácidos, ácidos grasos y lípidos esenciales para el desarrollo fuera del hospedero (Freundt, 1974).

Los cuerpos de los fitoplasmas contienen un enrejado fibrilar de hebras que posiblemente son ADN, y áreas con gránulos semejantes a ribosomas. Estos organismos aparentemente se propagan por fisión binaria, gemación o fragmentación (Salazar, 1996). En secciones ultra delgadas las células de los fitoplasmas tienen formas ovoides, oblongas o filamentosas en plantas e insectos hospederos (Doi *et al.*, 1967 y Hearon *et al.*, 1976).



**Figura 8.** Fotografía electrónica de cuerpos de fitoplasmas en el floema de una planta. Fuente: Universidad de Wisconsin. s.f.

### 2.2.3 Sensibilidad a antibióticos

Los organismos degeneran y pierden su contenido celular después de un tratamiento a plantas infectadas con antibióticos del grupo de las tetraciclinas (Sinha y Peterson, 1972). La sensibilidad a la tetraciclina y la falta de pared celular, por lo que no pueden ser sensibles a los antibióticos del grupo de las penicilinas (Ishii *et al.*, 1967) hacen que estos organismos estén incluidos dentro del grupo de los *Mollicutes*.

Tratamientos preventivos y terapéuticos para el control de enfermedades de fitoplasmas han sido extendidos a plantas como: cocoteros para el control de amarillamiento letal y enfermedad X en cerezas y melocotones (McCoy, 1982, Nyland, 1971; Raju y Nyland, 1988). Aplicados por inyección al tronco, el tratamiento de cada árbol con 1 g. (dosis preventiva) ó 3 g. (dosis terapéutica) tres veces por año es suficiente para el control de amarillamiento letal en cocoteros (McCoy, 1982).

#### **2.2.4 Características de crecimiento**

Los fitoplasmas son únicamente observados en los elementos del floema (McCoy *et al.*, 1989; Oshima *et al.*, 2001b; Weeb *et al.*, 1999) y ocasionalmente en las células del parénquima de plantas infectadas (Sears and Klompants, 1989). Los elementos de la savia son células vivas especializadas que transportan fotosintatos de las hojas, no solo a tejidos de crecimiento, sino a otros tejidos incapaces de fotosintetizar. Eso se aplica particularmente a raíces, las cuales requieren considerable energía para tomar o absorber agua y nutrientes. La savia del floema es única por que contiene de 12 a 30% de sucrosa y tiene alta presión hidrostática (Evert, 1977). Las paredes laterales tienen áreas de la savia que son perforadas, permitiendo el pasaje de fotosintatos a los miembros de los tubos adyacentes. El tamaño de los poros los cuales tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.2  $\mu\text{m}$  son lo suficientemente grandes para permitir el pasaje de células del fitoplasma esféricas o filamentosas de un elemento a otro (McCoy, 1979). La composición química de la red de savia es compleja conteniendo azúcares, minerales, aminoácidos libres, proteínas y ATP (Van Helden *et al.*, 1994). Este medio el cual tiene alta presión osmótica e hidrostática sirve para soportar la multiplicación extensiva de fitoplasmas *in planta*.

Los fitoplasmas también se multiplican en los órganos y tejidos internos de sus insectos vectores (Nasu *et al.*, 1970; Kirkpatrick *et al.*, 1987) los cuales son principalmente saltahojas, saltamontes y psilidos (D'Arcy y Nault, 1982). La hemolinfa del insecto es similar al floema de la planta (Saglio and Whitcomb, 1979) por contener altos niveles de compuestos orgánicos simples y complejos. El insecto vector se infecta cuando ingiere fitoplasmas del floema de plantas infectadas. Después de un periodo de incubación que puede durar de una a varias semanas, el fitoplasma se multiplica en las glándulas salivares y luego el insecto es capaz de infectar el floema de las plantas sanas de las cuales se alimenta (Kunkel, 1926; Nasu *et al.*, 1970; Lee *et al.*, 1998 ).

Aunque los mecanismos que inducen la enfermedad no están bien entendidos, la infección del fitoplasma de plantas hospederas es usualmente marcada por una disfunción del floema y reducción de la capacidad fotosintética. Alteraciones en las funciones del floema han sido correlacionadas con la degeneración estructural de los elementos de la savia debido posiblemente al bloqueo físico por fitoplasmas colonizando o por la acción de una fitotoxina. (Guthrie *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 1998) La aparición de los síntomas pueden estar acompañados por un debilitamiento sustancial del rango fotosintético de las hojas maduras y por fluctuaciones en la fuente de niveles de carbohidratos y aminoácidos versus hojas pequeñas (Lepka *et al.*, 1999).

El amarillamiento de la hoja está asociado con el decremento del contenido de clorofila, carotenoides y proteínas solubles (Bertamini y Nedunchezian, 2001), función estomatal anormal (Martínez *et al.*, 2000) y cambios histopatológicos como son: incrementos en la cantidad de polifenoles totales y pérdida de la integridad celular (Musetti *et al.*, 2000). Estos cambios adversos son acompañados por regulación de genes que codifican proteínas implicadas en la fotosíntesis, transporte de azúcar, respuesta al estrés o pasos de la síntesis de fitoesterol (Jagoueix-Eveillard *et al.*, 2001).

### 2.2.5 Sintomatología

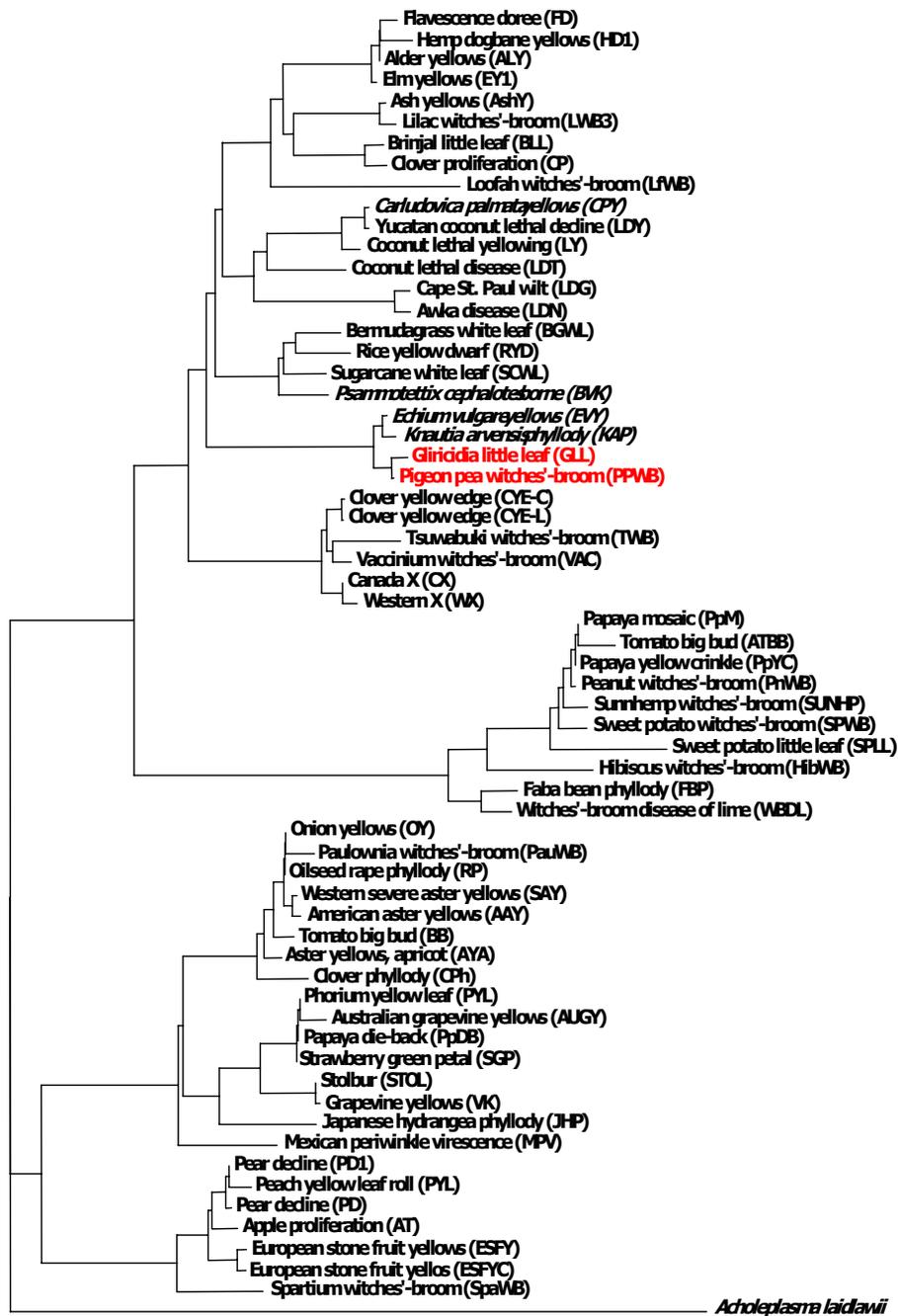
Una gran cantidad de síntomas característicos son asociados con la infección de fitoplasmas en cientos de especies de plantas en todo el mundo. Los síntomas varían de acuerdo con la particularidad de la especie hospedera, el grado de infección del hospedero y de la virulencia del fitoplasma asociado (Davis y Lee, 1992). Algunos síntomas son indicativos de desordenes en el balance normal de reguladores de crecimiento en las plantas incluyendo enverdecimiento de los pétalos, filodia (conversión de los órganos florales a estructuras de hojas), proliferación floral, esterilidad de las flores, proliferación de brotes axilares y adventicios, elongación internodal, etiolación, reducción generalizada de frutos, hojas y entrenudos, decoloración fuera de estación de hojas y brotes (amarilla hasta púrpura), enrollamiento de las hojas, ahuecamiento o arrugamiento, escoba de bruja, aclaración y elongación de las venas, decoloración del floema y detrimento general de la planta como muerte regresiva de ramitas, ramas y tronco (Harrison *et al.*, 2002)

### 2.2.6 Taxonomía

Actualmente, existen 15 grupos clasificados en la taxonomía de fitoplasmas (Harrison *et al.*, 2000) (Figura 9) y por lo menos cuatro criterios moleculares que pueden servir de base para verificar la hipótesis que sostiene que los MLO pertenecen a la clase *Mollicutes*.

- 1) El contenido genómico G+C es del 25-30%.
- 2) La secuencia de los genes que codifican para el ARNr 16S, una porción del genoma vital para estos organismos y por lo tanto muy conservada es similar a la de *Acholeplasma* y *Anaeroplasma*
- 3) Las dimensiones de sus genomas, los cuales varían de 450 a 1180 Kb.
- 4) La secuencia de numerosos genes de proteínas ribosomales que mantienen una relación filogenética con las de los *Acholeplasma* (Sears y Kirkpatrick, 1994).

Figura 9. Árbol filogenético de 62 fitoplasmas, representando a los 15 grupos filogenéticos.



La EHPG está clasificada en el grupo de la Pigeon Pea Witches Broom y no está relacionada con el ALC.

Fuente: Nigel Harrison, editado y alineado con SeqEd y PileUp (Wisconsin Package Version 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA).

### 2.2.7 Conocimiento actual sobre la Enfermedad de la Hoja Pequeña de Gliricidia

Los estudios de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de Gliricidia dieron inicio en 1992 con el descubrimiento de la enfermedad en La Soledad, departamento de Choluteca Honduras (Boa y Lenné, 1993). Luego estudios posteriores reportaron la distribución de la enfermedad en otros sitios de Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y México (Kenyon *et al.*, 1996). De 1995 a 1997 fue realizada una investigación con la finalidad de conocer el agente causal de enfermedad, los síntomas y el impacto socioeconómico de la misma. La investigación fue realizada por L. Kenyon, R. Black, P. Doyle, y E. Boa. Los resultados obtenidos fueron la determinación de un fitoplasma similar al causante de la enfermedad de escoba de bruja en *Cajanus cajan* (Figura 9). Este fitoplasma fue determinado por medio de tres métodos indirectos: 1) observación de fitoplasmas en el floema de plantas sintomáticas a través de microscopía fluorescente, 2) remisión de síntomas en árboles sintomáticos mediante inyecciones de oxitetraciclina y 3) detección de ADN del fitoplasma a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fitoplasma de la EHPG aun no ha sido reconocido como una especie propia sino que esta bajo la denominación de *candidatus Phytoplasma gliricidiora* (Harrison *et al.*, 2002). Luego, a partir de 1997 en Zamorano, que ha sido uno de los líderes en el estudio de esta enfermedad, se han realizado estudios para entender la epidemiología de la enfermedad. Uno de ellos fue el realizado por T. Jordan y consistió en la evaluación de 10 procedencias de madreando en una colección de germoplasma de *G. sepium* de aproximadamente 30 procedencias establecidas por el Oxford Forestry Institute en Zamorano en los 90's. El estudio encontró que las procedencias Guayabillas (Honduras), Vaho hondo (Guatemala) y Managua (Nicaragua) son tolerantes a la EHPG. Saballos (1999) optimizó el método desarrollado por el Dr. Nigel Harrison de la Universidad de la Florida para el diagnóstico molecular de *candidatus Phytoplasma gliricidiora* e identificó cinco posibles candidatos como vectores de la enfermedad. Campaña (2000) realizó estudios que demuestran que los fitoplasmas se transmiten por medio del material vegetativo (estacas), por medio de semilla y que *Empoasca hastosa* es capaz de transmitir el patógeno a un hospedero sano. El estudio más reciente es la comprobación de la transmisión por semilla, el cual se realiza por tercer año consecutivo. También se evaluaron la transmisión del patógeno a un hospedero sano, por medio de *Empoasca hastosa* y análisis con marcadores moleculares (RFLP's) para comprobar la transmisión del patógeno por medio de semillas.

## 2.3 DETECCIÓN DE FITOPLASMAS POR PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

### 2.3.1 Descripción de la técnica

PCR (Por su sigla en inglés: Polymerase Chain Reaction) es una técnica molecular usada para amplificar una región específica de ADN con el objetivo de producir una

concentración suficientemente alta para ser visualizada en una gel de electroforesis (Saballos, 1999).

### **2.3.2 Utilidad de la técnica**

Una aplicación importante de la técnica de PCR es en el diagnóstico de enfermedades de plantas tales como las infecciones virales causadas por geminivirus y las causadas por fitoplasmas como la EHPG y el Amarillamiento Letal del Cocotero.

El empleo de tecnologías moleculares como las sondas genómicas y PCR, ha permitido dar inicio y conocer de manera profunda el ADN de algunos de los fitoplasmas fitopatógenos más difundidos en las plantas (Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993). El uso de ácidos nucleicos específicos y la tecnología del PCR han suplantado grandemente los métodos tradicionales del microscopía electrónica, el criterio biológico de detección sensitiva, identificación y la caracterización genética de los fitoplasmas (Harrison *et al.*, 2002)

La amplificación *in vitro* de ADN de fitoplasmas por PCR ha resultado ser una técnica sensitiva para la detección de fitoplasmas de plantas infectadas. Los primers para PCR han sido construidos de porciones del ARN ribosomal del gen operon de todos los fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1995; Gundersen *et al.*, 1996) o de grupos y subgrupos cercanamente relacionados a los fitoplasmas. El par de oligonucleótidos más utilizado se obtuvo desde la región del gen 16S rRNA y sus secuencias son 5'-ACGAAAGCGTGG GGAGCAA-3' y 5'-GAAGTCGAGTTGCAGA CTTC-3', las cuales han sido testadas con ADN obtenido a partir de tejidos infectados (Harrison *et al.*, 2002)

Existe una segunda técnica de detección de fitoplasmas conocida como nested PCR o PCR anidado. En esta prueba el producto de la amplificación por PCR directo, es reamplificado con otro par de primers específicos que reconocen parte de la secuencia de ADN del primer par de primers. Según Lee *et al.*, (1994) el reciente empleo de nested PCR ha permitido aumentar la detección de enfermedades causadas por fitoplasmas. Ya que en la mayoría de estas enfermedades la concentración del patógeno es muy baja para ser detectada utilizando solamente PCR directo.

### **2.3.3 Uso de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de la hoja pequeña de Gliricidia**

La enfermedad se detectó por primera vez utilizando ADN de tejidos de hojas de madre infectadas y asintomáticas que fueron analizadas inicialmente por PCR (Kenyon *et al.*, 1998), utilizando los pares de primers P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Smart *et al.*, 1996). Estos primers amplifican un producto de 1.8 kb los productos de

rARN a partir de los genes 16S rARN, 16-23S espaciador y una porción final del gen 5' de 23S rARN de fitoplasmas.

También en estudios realizados por Saballos (1999) en Zamorano para optimizar una técnica de detección para la EHPG, se utilizó la prueba de PCR con los primers P1 y P7 mencionados anteriormente además, de los primers específicos PP/GLLF y PP/GLLR. Estos últimos son utilizados en las pruebas de nested PCR para incrementar la sensibilidad de la prueba. Con estas pruebas se obtuvieron resultados positivos en árboles con variaciones de síntomas, partes asintomáticas de los árboles enfermos y de plántulas de semillas las cuales habían estado expuestas a infección natural pero que aún no presentaban síntomas. Los protocolos utilizados en este estudio fueron desarrollados por Nigel Harrison, de la Universidad de Florida (Kenyon *et al.*, 1996).

## 2.4 TRANSMISIÓN DE LOS FITOPLASMAS POR INSECTOS VECTORES

### 2.4.1 Historia

En la naturaleza, la transmisión de los fitoplasmas ha sido detectada en insectos vectores pertenecientes al orden homóptera. Particularmente son notablemente conocidos como insectos vectores miembros de la familia *Cicadellidae* y *Psyllida* (Whitcomb, 1973). Y según Castaño (1994), también insectos de la familia *Fulgoridae* y *Cercopidae* pueden transmitir fitoplasmas. Además se puede transmitir por injertos, por propagación de partes enfermas de las plantas y por la cuscuta (*Cuscuta* spp); que es una planta fanerógama y la transmisión se da cuando en los vasos vasculares de la planta infectada es adquirido el fitoplasma por medio de los haustorios de la cuscuta. Luego el fitoplasma pasa al floema de la planta parásita y de nuevo es introducido en la planta sana mediante los haustorios que se ponen en contacto con el sistema vascular de la planta inoculada (Campaña, 2000). Aquí se forma un puente biológico que se puede utilizar para realizar reservorios de cualquier fitoplasma en plantas susceptibles ya que los reservorios son de gran utilidad para la investigación y caracterización de enfermedades causadas por fitoplasmas.

### 2.4.2 Adquisición e incubación del fitoplasma en el insecto vector

Según Castaño (1994), los insectos vectores adquieren este patógeno después de varias horas o días de alimentarse de plantas infectadas. Generalmente estos vectores no transmiten el patógeno inmediatamente si no que necesitan de un período de incubación que esta alrededor de 10 a 45 días y dependiendo de algunos factores como la temperatura, a 30°C el período de incubación es más corto y a 10°C es más largo, también factores como la genética de los insectos pueden influir. Este período de incubación es requerido para la multiplicación y distribución del fitoplasma dentro del insecto. Si este es adquirido directamente de la planta se multiplica primero dentro de las

Células internas del insecto; luego pasa a la hemolinfa e infecta al resto de los órganos internos incluyendo el "cerebro" y las glándulas salivares (Castaño, 1994).

### 2.4.3 Transmisión

La transmisión a plantas sanas se inicia cuando el fitoplasma alcanza un nivel de concentración determinado en las glándulas salivares y continua haciéndolo más o menos eficientemente durante el resto de su vida. Generalmente los vectores no son afectados negativamente por el patógeno pero en algunos casos muestran efectos patológicos severos. Los fitoplasmas son adquiridos más rápidamente por las ninfas que por los adultos y sobreviven durante las mudas del insecto pero no pasan de los adultos a los huevecillos en la siguiente generación, por lo que estos al eclosionar deben alimentarse de plantas infectadas para que se vuelvan infecciosos (Agrios, 1995). Aunque Nault y Rodríguez (1985), reportan que es rara la transmisión transovárica de los fitoplasmas en los vectores, esto va a depender mucho del vector mismo, pues la transmisión en cada caso específico es diferente. Sin embargo se han dado casos de la transmisión transovárica de los fitoplasmas y el resultado ha sido reducción en el número de la prole de las hembras infectadas. Mount y Lacy (1982), reportan que el periodo de vida de un insecto sano es mayor y que el de un insecto infectado es menor y que el 30% de las hembras infectivas serán estériles. Los fitoplasmas además de necesitar a los insectos para transportarse de una planta a otra, los necesitan para poder penetrar el hospedero y son inyectados al floema por la herida que es creada por el insecto mismo. No todos los saltahojas que se alimentan del floema son vectores de enfermedades causadas por fitoplasmas ya que la eficiencia de transmisión del organismo varía dentro de las distintas especies de saltahojas. Debido a que este proceso de transmisión mediante insectos vectores es una adaptación en los organismos involucrados en el mismo y muchas veces implica un proceso de evolución independiente tanto del microorganismo transmitido como del insecto vector y la tendencia evolutiva de este proceso es hacia la reducción de la competencia microbial dentro del hospedero.

### 2.4.4 Ejemplos de enfermedades causadas por fitoplasmas:

**2.4.4.1 Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC).** El Amarillamiento Letal es una enfermedad causada por un fitoplasma y posiblemente transmitida por un insecto vector (*Myndus crudus*), que afecta a más de 30 especies de palmas, dentro de las cuales se encuentra el cocotero (*Cocos nucifera*). Sus síntomas en orden progresivo son: Caída prematura de la mayoría de los frutos, necrosis de la inflorescencia que ha emergido y esta por emerger, Amarillamiento de las hojas bajas hasta la parte apical del cocotero y finalmente caída de todas las frondas dejando solamente a la palma con un aspecto de poste telefónico. Dada su capacidad de rápida expansión y alta susceptibilidad de la mayoría de las variedades de cocotero, el ALC es considerada como una de las mayores amenazas a la producción de coco. Solamente en Jamaica más de cinco millones de

palmas "Altas de Jamaica" fueron destruidas en los 20 años después de la aparición de la enfermedad en las regiones productoras de coco. En Honduras se reportó por primera vez en 1994 y ha causado el declinamiento de las poblaciones de *Cocos nucifera* var. Según Castillo (2001), la opción de manejo más viable para esta enfermedad es la replantación con variedades resistentes entre las cuales se encuentran, enanos malayos, altos del pacífico e híbridos provenientes de Jamaica y Costa Rica<sup>1</sup>.

**2.4.4.2 Enfermedad de la caña.** El amarillamiento foliar de la caña de azúcar constituye una de las enfermedades que más daño causa a este cultivo, al provocar pérdidas en los rendimientos agrícolas y en la industria por la presencia de carbohidratos que afectan la cristalización. Esta afección, también llamada YLS, fue detectada en 1990 en Hawái, en 1992 en Brasil, y prácticamente se ha extendido a casi todas las naciones productoras de caña, por lo que el Ministerio del Azúcar (MINAZ) de Cuba convocó a los científicos del país a estudiarla, con el fin de impedir su diseminación en la Isla ( Vázquez, 2001)

**2.4.4.3 Enfermedades en papa.** En la papa se han reportado varias enfermedades producidas por fitoplasmas, tales como enrollamiento púrpura del ápice (PTR), flavescencia marginal (MF), escoba de brujas (WB), filodia de la papa (PP), marchitez de la punta morada (PTW) y "stolbur". Las varias características comunes entre estas enfermedades en rango de huéspedes, síntomas en papa, tipo de vectores (especies de Fam. Cicadellidae) y eficiencia de transmisión sugieren que son causadas por fitoplasmas relacionados.

Un síntoma común de todas estas enfermedades es la clorosis de los folíolos, usualmente a lo largo de los márgenes en las plantas infectadas. PTR causa enrollamiento de la parte basal de los folíolos de las hojas jóvenes del brote. Los tubérculos de plantas afectadas usualmente son pequeños y producen brotes ahilados. El PTW origina brotes erectos y las hojas se enrollan hacia arriba con el progreso de la enfermedad. Se produce una pigmentación púrpura se produce en la base de los folíolos y los tallos se marchitan debido a necrosis del floema interno de los tallos. Las plantas jóvenes afectadas producen tubérculos aéreos y engrosamiento de los nudos del tallo.

Los tubérculos producidos por las plantas infectadas pueden ser flácidos y producen brotes ahilados cuando se rompe la dormancia. WB produce una detención severa del crecimiento de las plantas debido al acortamiento de los entrenudos, y también induce clorosis marginal de los folíolos. Las plantas no producen tubérculos o sólo algunos pequeños con brotes ahilados. PP causa achatamiento de los tallos y el desarrollo de hojas cloróticas con folíolos pequeños.

---

<sup>1</sup>Doyle, M. 2002. Enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

Flores con filodia pueden proliferar y producir brotes vegetativos. También se pueden producir tubérculos aéreos. Las plantas afectadas por "stolbur" muestran clorosis y enrollamiento de los folíolos tipo cuchara. Las plantas generalmente se secan y marchitan. Los tubérculos son blandos y pueden desarrollar brotes delgados y aislados. En algunas plantas se puede presentar una sobre ramificación (Salazar, 2002).



**Figura 10** . Exceso de ramificación en *Euphorbia pulcherrima* causado por fitoplasma.  
Foto: Lee, 2000



**Figura 11.** Escoba de bruja en zanahoria causado por fitoplasmas.  
Foto: Weintraub, 2001



**Figura 12.** Mal formación de raíces adventicias en zanahoria causada por fitoplasmas.  
Foto: Weintraub, 2001



**Figura 13.** Filodia en fresa causada por fitoplasmas.  
Foto: Mass, 2002

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 COMPROBACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SEMILLAS.

Históricamente ha sido difícil estudiar este importante aspecto de la epidemiología de las enfermedades causadas por fitoplasmas, ya que en muchos casos los síntomas de la enfermedad solo se manifiestan en plantas adultas. Tal es el caso con la sintomatología del Amarillamiento Letal del Cocotero, donde solo las plantas mayores de tres años manifiestan signos de la enfermedad<sup>2</sup>. Sin técnicas moleculares que permitan establecer si el patógeno está o no presente en plantas asintomáticas, ha sido imposible, hasta hace solo algunos años, determinar si el desarrollo posterior de síntomas es causado por la eventual exposición de la planta al insecto vector o si el patógeno ha permanecido latente por un periodo prolongado.

Se estudió la posibilidad de que el fitoplasma de la EHPG pueda ser transmitido por semilla, contrario a lo que cita la literatura de que los fitoplasmas no se transmiten por semilla. Este aspecto de la epidemiología fue realizado por Saballos (1999) y Campaña (2000) y se repitió con la siguiente metodología.

##### 3.1.1 Extracción de ADN

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo utilizando el método de extracción de ADN con CTAB (Doyle and Doyle) modificado por el Dr. Nigel Harrison de la Universidad de Florida. (Anexo 2). La mayoría de las reacciones de PCR se realizaron utilizando el producto comercial "PCR Beads Ready To Go"<sup>®</sup> del la casa comercial (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)<sup>3</sup> las que se diluyeron de acuerdo al protocolo presentado (anexo 3). Se utilizó 1 µl de ADN de cada muestra. Para la prueba de PCR directo se utilizaron los primers universales P1 y P7 que amplifican la región del gen 16S ARNr, la región espaciadora del gen 16S ARN y el gen 23S ARN presentes en todos los fitoplasmas (cuadro 1).

---

<sup>2</sup>DOYLE, M. 2002. Enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

<sup>3</sup>PCR beads: Perla que contiene *Taq* polimerasa liofilizada, Cloruro de magnesio, Cloruro de potasio, Tris HCl, pH 9 y Nucleótidos para el PC

Para la identificación específica del fitoplasma de la EHPG se utilizó la prueba de nested PCR ya que es una prueba más sensible y se utilizaron los primers específicos PP/GLLF y PP/GLLR que amplifican una región interna del gen 16S ARNr, por lo que puede ser usado para nested PCR de producto de la amplificación con los iniciadores P1 y P7 (Saballos, 1999). Dependiendo de la intensidad de la banda obtenida con la prueba de PCR directo, se realizaron las siguientes diluciones del producto de PCR directo en agua estéril. Muestra sin banda, 1:40; banda débil 1:100.

El procedimiento de amplificación del ADN se llevó a cabo con el termociclador Perkin Elmer 480, Norwalk, CT, USA. Cada reacción de PCR fue sometida a un primer ciclo para su desnaturalización a 94°C por dos minutos, seguido por la fase de ligamiento a 54°C por 50 segundos y por último en la fase de extensión la temperatura a 72°C por 2 minutos. A este primer ciclo le siguieron 28 ciclos de 94°C por un minuto, 54°C por 50 segundos y 72°C por 2 minutos. Para finalizar el último ciclo, fue de 94°C por un minuto, 54°C por 50 segundos y 72°C por 5 minutos. Para visualizar los resultados, la electroforesis se realizó en una gel de agarosa al 1% y se corrió a 80 v por 45 minutos, luego fue teñida en una solución de bromuro de etidio por 15 minutos y desteñida con agua de la llave por 15 minutos, para luego ser expuesta a luz ultravioleta con un transluminador.

**Cuadro 1.** Secuencia de primers universales y específicos utilizados en la detección de genes 16S ARN y 23S ARN de fitoplasmas.

| Primer  | Tamaño de producto de PCR (Kb) | Secuencia(5' - 3') | Autores                   |
|---------|--------------------------------|--------------------|---------------------------|
| P1      | AAGAGTTTGATCCTGGCTAGGATT       | 1.8                | Deng y Hiruki             |
| P7      | GCTCCTTCATCGGCTCTT             | 1.8                | Schneider <i>et al.</i> , |
| PP/GLLf | GTCGAACGGAAACCTTA              | 1.4                | Harrison                  |
| PP/GLLr | ACGGCTCCTCTTCTAAC              | 1.4                | Harrison                  |

Fuente: Schneider, 1995

### 3.1.2 Selección de los árboles

Se realizaron tres muestreos entre los meses de febrero y octubre del 2002 donde se seleccionaron 39 árboles que se encontraban en los terrenos de Zamorano, bajo diferentes niveles de infección de la enfermedad. Se clasificaron en árboles sanos (testigo), levemente enfermos y moderadamente enfermos (no se incluyeron los árboles con una

infección severa de la enfermedad, ya que no florecen ni producen semillas) utilizando el sistema de evaluación descrito por Boa, 1996. Para asegurar la presencia del fitoplasma todas en los árboles padres escogidos se les realizó la prueba de PCR directo con los primers universales, P1 y P7 seguida de la prueba de nested PCR con los primers específicos a fitoplasmas de la EHPG, PP/GLLF y PP/GLLR.

### 3.1.3 Germinación de las semillas

De los árboles clasificados positivos a la EHPG se seleccionaron 3 árboles para cada nivel de infección. La recolección de la semilla se llevó a cabo a finales de abril y se almacenó a 4°C. Las semillas fueron germinadas en maceteros de 3'' de diámetro con medio pasteurizado, obteniendo una germinación del 100%. Se sembraron 3 repeticiones por cada nivel de severidad, con 25 maceteros por repetición y dos semillas por postura. A los 15 días después de germinadas las plántulas se les realizó un raleo para trabajar con una plántula por macetero haciendo un total de 75 plántulas por cada nivel de infección. Para evitar la transmisión por vectores de la EHPG, se colocaron los maceteros en jaulas de malla fina para prevenir la entrada de insectos.

### 3.1.4 Análisis molecular para la detección de ADN del patógeno

La toma de muestras para la extracción de ADN se realizó a los 30 días de germinadas las plántulas, luego se llevó a cabo la aplicación de la prueba de PCR directo con los primers universales P1 Y P7, y nested PCR con los primers específicos a fitoplasmas de la EHPG, PP/GLLF y PP/GLLR para evaluar la presencia o ausencia del patógeno. (ver flujo de proceso en la Figura 14). Los productos de la amplificación visualizaron por electroforesis en una gel de agarosa al 1% a 80 voltios por 45 minutos.

Tres meses después se evaluaron los siguientes parámetros: altura de las plántulas, desde la base hasta el brote apical (cm), diámetro de la base de la planta (cm) y el # de hojas. Con el fin de establecer si existían diferencias en el desarrollo de las plántulas germinadas a partir de árboles enfermos. Los datos fueron evaluados usando el programa MINITAB® y se realizó una ANDEVA con la prueba Tukey 95% para la separación de medias.

### 3.1.5 Nomenclatura utilizada para las muestras de árboles para cada nivel de infección

Para rotular las muestras se usó la siguiente nomenclatura:

Lugar de muestreo: **MY** (Residencial Maya), **CMR** (Camino a monte redondo), **F** (Florencia)

Enfermedad: **HPG** (hoja pequeña de gliricidia)

Número de muestra: **101**

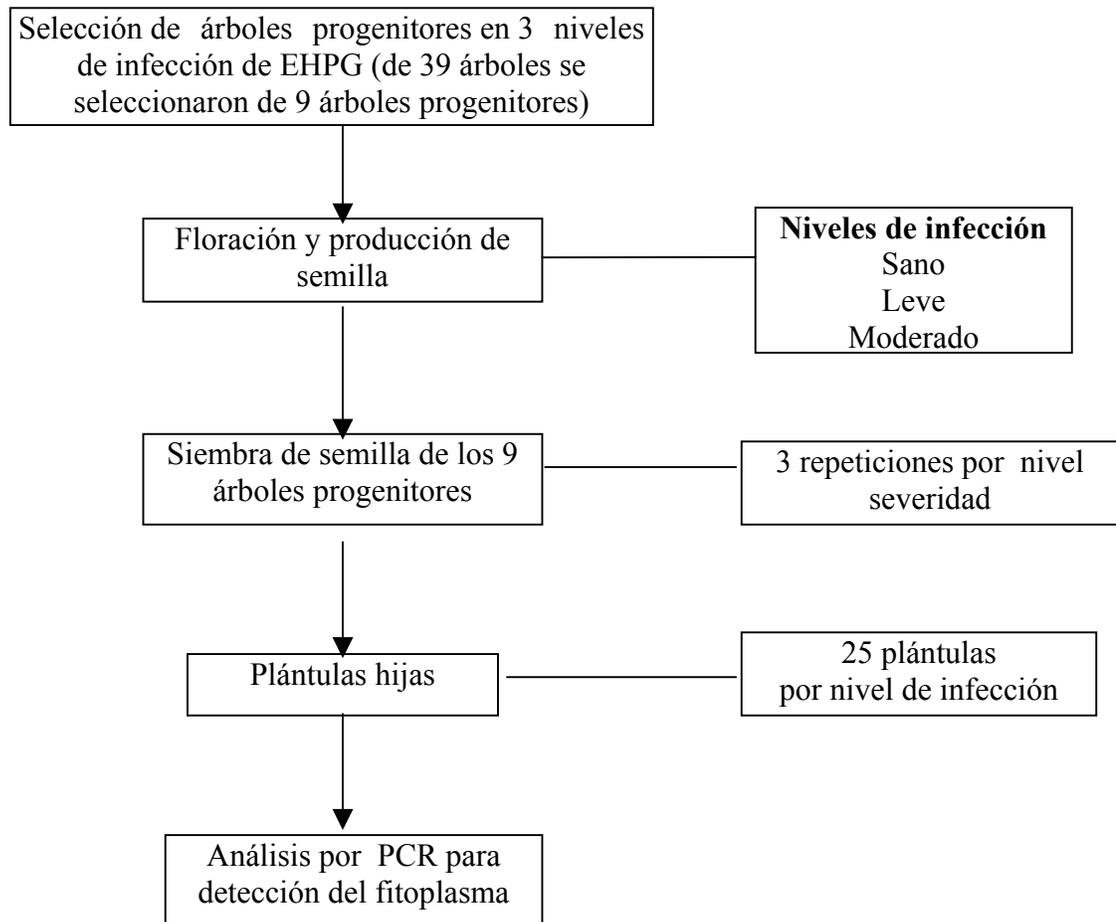
Nivel de severidad: **Sano, Leve Moderado**

**Repetición: I, II, III**

En resumen **MYHPG – 101 (I Leve)** fue la muestra 101, recolectada en la Residencia Maya, clasificada como levemente enferma, para el análisis de la hoja pequeña de Gliricidia y pertenece a la primera repetición.

Nomenclatura de los árboles padres que fueron marcados en el campo para estudios posteriores:

- CMRHPG – 126 (I Sano)
- CMRHPG – 127 (II Sano)
- CMRHPG – 139 (III Sano)
- FHPG – 102 (I Leve)
- MYHPG – 114 (II Leve)
- MYHPG – 116 (III Leve)
- FHPG – 102 (I Moderado)
- FHPG– 103 (II Moderado)
- FHPG – 136 (III Moderado)



**Figura 14.** Flujo de proceso para el ensayo de transmisión por semilla

### 3.2 ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA COMPARAR EL ADN AISLADO DE FITOPLASMAS DE ÁRBOLES PROGENITORES Y PLÁNTULAS HIJAS.

#### 3.2.1 Nomenclatura de las muestras

Para nombrar las muestras se usó la siguiente nomenclatura:

Lugar de muestreo: **MY** (Maya), **CMR** (Camino a monte redondo), **F** (Florencia).

Enfermedad: **HPG** (hoja pequeña de gliricidia)

Número de muestra: **101**

Plántula proveniente de semilla: **S**

Número de plántula: **25**

En resumen esta muestra, **MYHPG – 101**, fue la muestra del árbol 101 progenitor recolectada en Maya, para el análisis de la hoja pequeña de gliricidia y **SMYHPG – 101. 25**, fue la muestra 25 proveniente de una plántula germinada a partir de una semilla obtenida del progenitor 101, que fue recolectado en Maya par el análisis de la enfermedad de la hoja pequeña de gliricidia.

### **3.2.2 Extracción de ADN**

Para realizar la extracción del ADN se siguió el método de Doyle and Doyle (1990), modificado por Harrison (2000), para la extracción de ADN de fitoplasma.

### **3.2.3 Amplificación del ADN**

Las amplificaciones de ADN por PCR usadas para la digestión de las enzimas se realizó utilizando el protocolo de Innis y Gelfand, (1990). El agua utilizada para diluir la reacción, fue destilada y estéril, la cual se refrigera a 4°C, los dideoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) de la casa comercial Promega® se usaron diluidos en agua destilada estéril a una concentración de 100 mM y un pH de 7.0. Los primers utilizados para la amplificación fueron P1 y P7, que se encontraban a una concentración de 25ng/μl. Posteriormente se agregó el buffer B de PCR a una concentración de 10X, luego se agregó el cloruro de magnesio y la *Taq polimerasa* de la casa comercial Promega® se añadió a una concentración de 5 U/μl y finalmente se completo la reacción con el ADN muestra (anexo 4). Una vez preparadas las reacciones se le agrega una gota de aceite estéril, para evitar la evaporación durante el tiempo de amplificación. Se centrifugan por 5 segundos a 10,000 rpm y luego se amplificaron colocaron en el termociclador Perkin Elmer 480, Norwalk, CT, USA.

Debido a que no se observó ninguna banda con la amplificación directa, se decidió realizar una reamplificación con PCR nested haciendo usó de los primeros específicos PP/GLLF y PP/GLLR diluidos a 1:40.

### **3.2.4 Electroforesis horizontal de ADN**

Del producto de amplificación del ADN se utilizaron 5 μl, más 2μl de buffer de corrida, los que fueron sometidos a electroforesis a 80 v en una gel de agarosa al 1.0% preparada con TBE 0.5 X, el buffer de corrida fue TE 0.5X. Y como escalera molecular se utilizó 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL®).

La gel se tiñó a una solución 1mg/ml de bromuro de etidio durante 15 minutos y se destiñó en agua de la llave durante 15 minutos. Finalmente, se observó en el transiluminador de luz ultravioleta y posteriormente se fotografió con una cámara polaroid.

Esto se realizó para observar los productos de amplificación y definir el volumen de este producto que se utilizaría en la reacción de digestión, el cual se determina de acuerdo con la intensidad de la banda observada en la gel. Este volumen varía de 4 a 10  $\mu$ l.

### 3.2.5 Análisis de RFLP

Los marcadores moleculares son una herramienta para el análisis genómico, con los cuales se busca identificar y medir la variabilidad genética de un organismo (Aranda, 2000)

**RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism).** Las variaciones en el arreglo de los fragmentos, generados por la digestión de un producto de amplificación, por una enzima específica se llaman Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP); estas variaciones pueden ser causadas por cambios en la secuencia, inserciones o desapariciones de segmentos de ADN o sustituciones de bases en el sitio de restricción de la enzima (Razin y Yogev, 1995; Moctezuma y Kahl, 2000).

El análisis por RFLP, es una herramienta muy importante en la clasificación e identificación de aislamientos de fitoplasmas, además de evaluar la diversidad genética de las razas dentro de los grupos establecidos (Razin y Yogev, 1995). A pesar de que con RFLP, solo se evalúa un tipo de polimorfismo por ensayo, los resultados son muy precisos (Moctezuma y Kahl, 2000).

### Enzimas de restricción

Las enzimas o Endonucleasas de Restricción (ER) son miembros de una clase de endonucleasas, que tienen la propiedad de romper los enlaces que unen nucleótidos consecutivos en una cadena de ADN o ARN (Kreuzer y Massey, 1996).

Existen tres tipos de ER, los tipos I y tipo III presentan actividad de restricción (corte) y modificación del ADN muestra, mientras que las de tipo II solamente tienen actividad de restricción y además cortan en sitios específicos los ácidos nucleicos, por lo tanto son las usadas en estudios de restricción de ADN (Micklos y Freyer, 1990).

Para evitar confusiones, existe una nomenclatura para las ER. La primera letra (mayúscula) es la inicial del género del microorganismo del cual se extrajo la ER, la segunda y tercera letras provienen de la especie del microorganismo; por ser parte de un nombre científico se escriben en letras de tipo itálicas (Stryer, 1995). De existir una cuarta letra, esta indica una raza del microorganismo y finalmente un número romano indica el orden de descubrimiento y síntesis de la ER del mismo microorganismo (Stryer, 1995). Por ejemplo, *Eco* RI (*Escherichia coli* RY13, primera ER sintetizada).

Las enzimas utilizadas para este estudio fueron *Alu I*, *Msp*, *Hinf I*, *Hind III*, *Rsa I*, *Pst I*, *Eco RI*, *Dde*. (cuadro 2). Estas se usaron para digerir el producto reamplificado de nested

PCR con los primers PP/GLLF y PP/GLLR específicos para el grupo de los fitoplasmas que causan la enfermedad de la hoja pequeña de Gliricidia

**Cuadro 2.** Enzimas de restricción utilizadas en los análisis de RFPL del fitoplasma causante de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de Gliricidia.

| <b>Enzima de Restricción</b> | <b>Fabricante</b>   | <b>Secuencia de reconocimiento</b> | <b>Concentración (U/<math>\mu</math>)</b> | <b>Temperatura de incubación (<math>^{\circ}</math>C)</b> |
|------------------------------|---------------------|------------------------------------|---|---|
| <i>Alu I</i>                 | New England Biolabs | 5' AG/CT 3'<br>3' TC/GA 5'         | 10  | 37  |
| <i>Dde I</i>                 | New England Biolabs | 5' C/TNAG 3'<br>3' G ANT/C 5'      | 10  | 37  |
| <i>Eco RI</i>                | Promega             | 5' G/AATTC 3'<br>3' CTAA/G 3'      | 8 – 10                                    | 37  |
| <i>Hif I</i>                 | New England Biolabs | 5' G/ANT C 3'<br>3' C TNA/G 5'     | 10  | 37  |
| <i>Hind III</i>              | Promega             | 5' A/AGCTT 3'<br>3' TTCGA/A 3'     | 10  | 37  |
| <i>Msp I</i>                 | Promega             | 5' C/CGG 3'<br>3' GGC/C 5'         | 10  | 37  |
| <i>Pst I</i>                 | Promega             | 5' CTGCA/G 3'<br>3' G/ACGTC 5'     |   |   |
| <i>Rsa I</i>                 | Promega             | 5' GT/AC 3'<br>3' CTAA/G 5'        | 10  | 37  |

N: cualquier base, A,G,C,o T. Micklos y Freyer, 1990; Sigma, 2001

### 3.2.6 Digestión de las muestras

Se usaron 10  $\mu$ l del producto de nested PCR, para la digestión con las enzimas. Las digestiones se prepararon según el (anexo 5) Una vez preparadas, se mezclaron en el vortex y se centrifugaron por 5 s. Todas las digestiones se incubaron a 37  $^{\circ}$ C, por aproximadamente 24 h.

Después de la primera incubación se les agregó 5  $\mu$ l de mezcla de las digestiones luego se mezclaron y se centrifugaron y fueron nuevamente incubadas a 37  $^{\circ}$ C por 24h aproximadamente. Finalmente las muestras se colocaron en un baño maría a 65  $^{\circ}$ C, durante 5 minutos con el objetivo de inactivar la enzima y parar la reacción y luego fueron almacenadas a 4  $^{\circ}$ C.

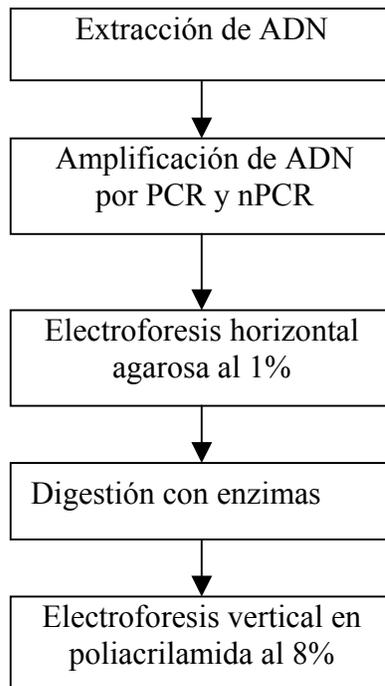
### 3.2.7 Comparación de los perfiles de restricción en geles de poliacrilamida al 8%

Las muestras que fueron digeridas con la enzimas de restricción, fueron corridas en geles de poliacrilamida al 8% preparadas según el (anexo 6). Y se utilizó la escalera molecular 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL®).

Se compararon los perfiles de restricción de las muestras obtenidos del producto de digestión y son las siguientes:

- MYHPG – 115
- FHPG –101, SFHPG – 101.25 Leve
- FHPG – 103, FHPG – 103.4 Moderado
- FHPG – 136, FHPG – 136.17 Moderado

Para resumir el procedimiento realizado se elaboró el flujo de proceso presentado en la Figura 15.



**Figura 15.** Diagrama del flujo de proceso seguida para realizar la técnica de RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) obtenidos por medio de la digestión del ADN aislado de fitoplasmas de árboles progenitores y plántulas hijas.

### 3.3 IDENTIFICACIÓN DEL INSECTO VECTOR

Debido a que los fitoplasmas no pueden cultivarse en un medio artificial, ya que carecen de los genes necesarios para la síntesis de algunos aminoácidos, ácidos grasos y lípidos esenciales para su desarrollo fuera de su hospedero, hacen difícil los estudios de

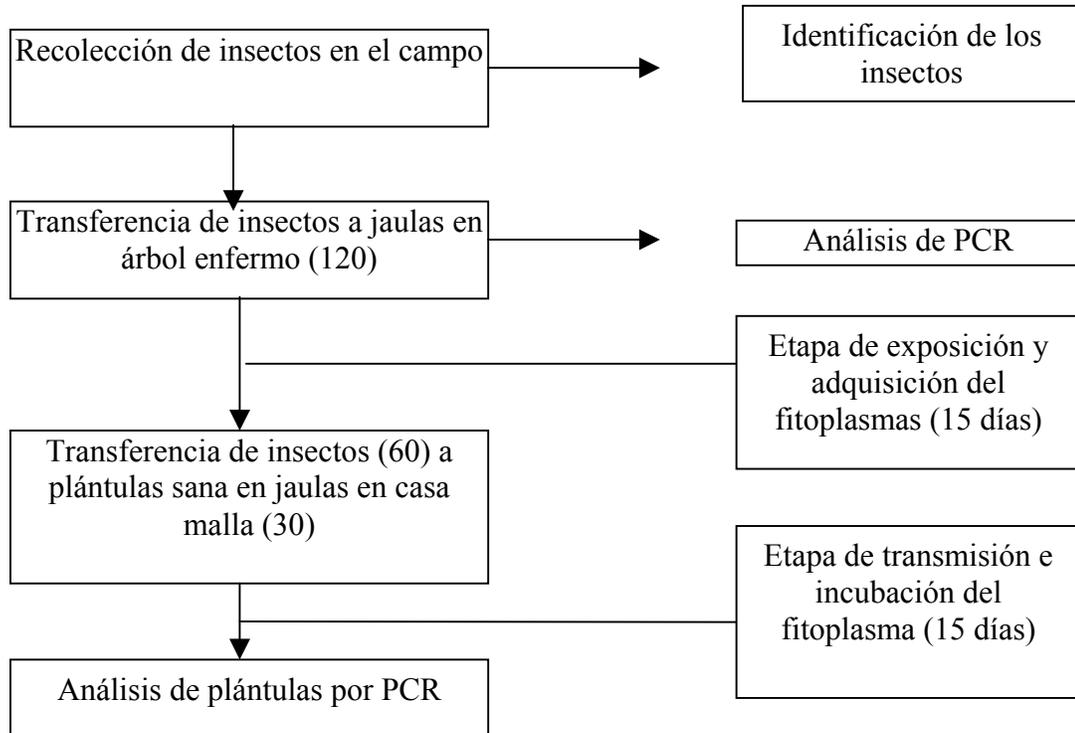
transmisión, por lo que es necesario realizar los estudios por medio de bioensayos y complementarlos con pruebas moleculares.

### **3.3.1 Recolección de insectos**

Este ensayo se realizó entre los meses de junio y septiembre. Se realizaron tres muestreos, donde se recolectaron individuos de la especie *Empoasca hastosa* homópteros que pertenecen a la familia de los Cicadellidos. A pesar de muchos esfuerzos no se logró capturar especímenes de otros grupos como *Ollarianus sp*, *Alconeura sp*, *Lopidea murray* y *Hydatothrips gliricidiae*; los cuales dieron resultados positivos a las pruebas de PCR que indicaron la presencia del fitoplasma en estas especies (Saballos, 1999). El lugar de recolección fue un ensayo de procedencias de Gliricidia, ubicado en la sección de cerdos de Zamorano, donde se presentaban plantas con los síntomas severos de la enfermedad. La recolección de los insectos se llevó a cabo utilizando bolsas plásticas transparentes, con las cuales se cubrieron las ramas y se golpearon para desprender los insectos. Luego con un aspirador de insectos (pajillas) se seleccionaron los especímenes de *Empoasca hastosa* y se trasladaron a nuevas bolsas.

### **3.3.2 Análisis molecular por PCR a insectos**

La prueba de PCR es una técnica que nos facilita los estudios de transmisión de patógenos como son los fitoplasmas, ya que nos permite determinar la presencia o ausencia del patógeno en los insectos vectores. El ensayo se dividió en dos fases. La primera consistió en un periodo de exposición y adquisición del fitoplasma por el posible insecto vector *Empoasca hastosa* se colocaron 4 jaulas con un tiempo de exposición y adquisición del fitoplasma de 15 días y dentro de cada jaula se colocaran 30 insectos. Luego se removieron las jaulas y se tomaron cinco insectos al azar para realizar pruebas de PCR y electroforesis. Para la extracción de ADN de los insectos se utilizó el método Doyle and Doyle, (1990) y para el PCR directo se usaron los primers universales, P1 y P7. También se utilizó la prueba de nested PCR con los primers específicos PP/GLLF y PP/GLLR para evaluar la presencia o ausencia del patógeno dentro del insecto.



**Figura 16.** Flujo de proceso para el ensayo de transmisión de *Empoasca hastosa*.



**Figura 17.** Jaula de malla fina en ramas de árbol enfermo (a) y jaula de malla fina para plántulas germinadas a partir d semilla de árboles sano, leve y moderadamente enfermos (b).

La segunda fase fue el periodo de transmisión e incubación del fitoplasma por medio del posible insecto vector a un hospedero sano. Se colocaron 60 insectos en dos jaulas de malla fina, cada una con 15 plántulas sanas a las cuales se les realizó la prueba de PCR directo con los primers universales, P1 y P7 y la prueba de nested PCR con los primers

específicos PP/GLLF y PP/GLLR para verificar que las plántulas se encontraban libres del patógeno. El tiempo de transmisión e incubación del patógeno fue de 15 días. Luego se realizó la toma de muestras (hojas jóvenes) de cada plántula para realizar la extracción de ADN con el método Dyole and Doyle, (1990) y luego la prueba de PCR directo con los primers universales, P1 y P7 y la prueba de nested PCR con los primers específicos PP/GLLF y PP/GLLR para evaluar la presencia o ausencia del patógeno. (ver flujo de proceso en la Figura 16).



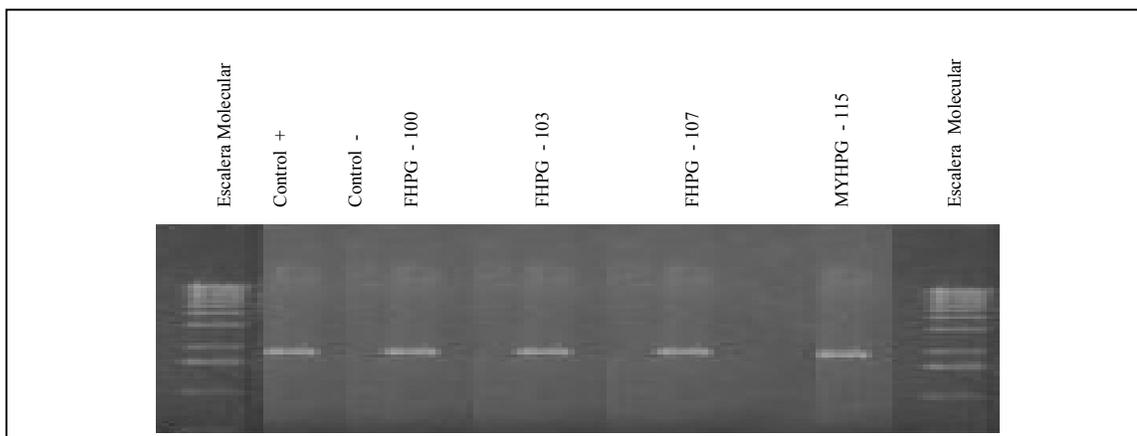
**Figura 18.** Ensayo de evaluación de transmisión por semilla de la EHPG (las plántulas fueron obtenidas de árboles progenitores enfermos y serán mantenidas para su evaluación en un ambiente protegido contra insectos).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CONFIRMACIÓN DE LA TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE LA EHPG

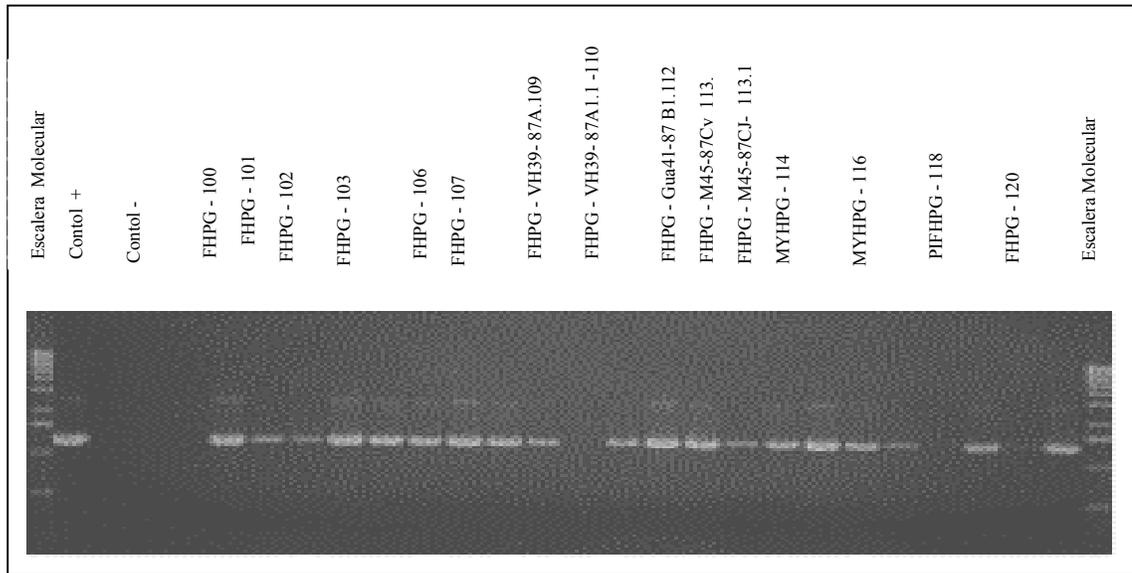
#### 4.1.1 Análisis de los árboles progenitores para detección del fitoplasma

De los 39 árboles progenitores muestreados, se pudo detectar el fitoplasma en 24 de ellos, de los cuales 4 resultaron positivos con PCR directo (Figura 19) y el resto solo con una segunda amplificación a través de nested PCR (Figura 20).

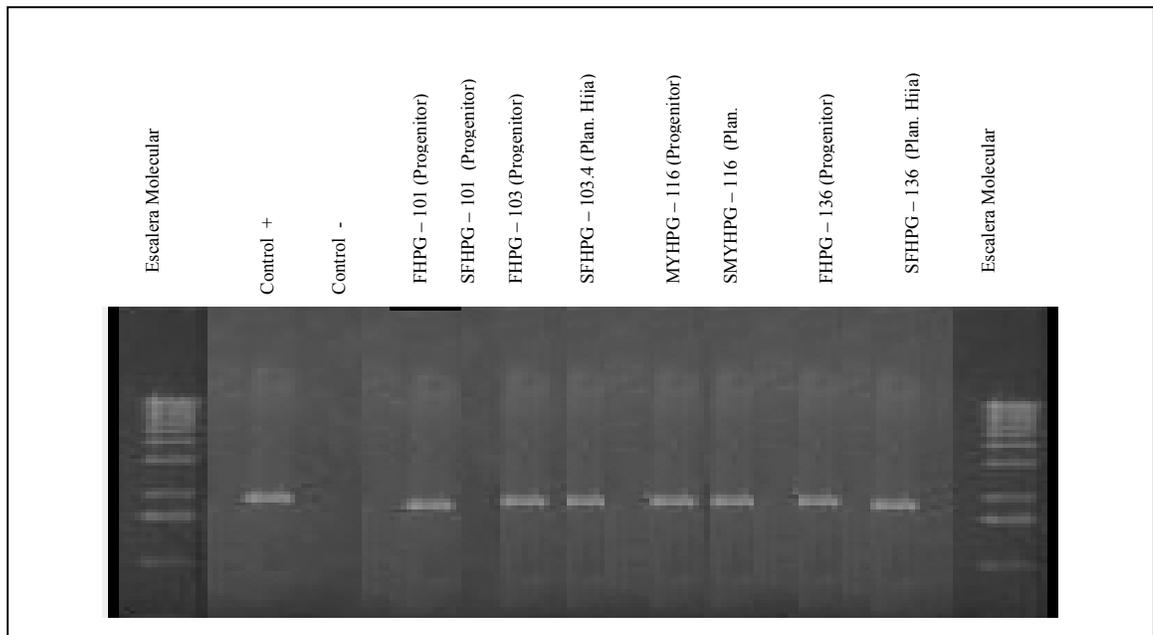


**Figura 19.** Gel de agarosa al 1% mostrando la detección de ADN del fitoplasma causante de la EHPG en árboles progenitores enfermos que resultaron (+) por PCR directo utilizando los primers P1 y P7.

De los árboles progenitores que resultaron positivos se escogieron seis: tres para el nivel de infección leve y 3 para los moderadamente enfermos. De los 15 que resultaron negativos a fitoplasmas se escogieron tres como progenitores sano. Durante la recolección de las semillas se observó que los árboles severamente enfermos no producían semillas ya que no presentaron floración y por lo tanto no se incluyeron en la evaluación.



**Figura 20.** Gel de agarosa al 1% mostrando la detección del fitoplasma causante de la EHPG en árboles progenitores enfermos que resultaron (+) por nested PCR utilizando los primers PP/GLLF y PP/GLLR.



**Figura 21.** Gel de agarosa al 1% mostrando la detección del fitoplasma causante de la EHPG en árboles progenitores enfermos y plántulas hijas confirmando la transmisión por semilla de la EHPG utilizando los primers PP/GLLF y PP/GLLR.

#### 4.1.2 Análisis molecular de plántulas de semillas obtenidas de árboles enfermos

En la primera etapa de este ensayo, de las 75 plántulas levemente enfermas que se evaluaron con la prueba de nested PCR, se pudo detectar el fitoplasma en 9 de ellas (cuadro 3 y figura 21), lo que significa un 12% de transmisión por semilla. Y de las 75 plántulas moderadamente enfermas que se muestrearon y se les hizo la prueba PCR nested, se presentaron 11 casos positivos, lo que significa un 15% de transmisión por semilla ( ver cuadro 4). En ninguna de las 75 plántulas de semillas de árboles sanos (control negativo) se detectó ADN del fitoplasma, por lo que se descarta una contaminación por insectos vectores en las jaulas. Se encontró diferencia significativa en el porcentaje de transmisión de plántulas sanas versus las plántulas leve y moderadamente enfermas ( $P < 0.03$ ). El obtener un 0% de transmisión del fitoplasma en las plántulas sanas nos indica que el ensayo fue bien llevado ya que no hubo contaminación por insectos vectores.

**Cuadro 3.** Nested PCR y % de transmisión realizada a las plántulas germinadas de semillas recolectadas de árboles con distinto nivel de infección.

| Niveles de severidad | Presencia del fitoplasma |                          |                  |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
|                      | Total de plántulas       | Positivos con nested PCR | % de transmisión |
| <b>Sano</b>          | 75                       | 0                        | 0.00 a           |
| <b>Leve</b>          | 75                       | 9                        | 12.00 b*         |
| <b>Moderado</b>      | 75                       | 11                       | 14.66 b          |

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba Tukey 95.0 %.

No se detectó ADN del patógeno en las plántulas, utilizando únicamente la prueba de PCR directo, lo que indica que las concentraciones de ADN del fitoplasma son muy bajas.

Los resultados confirman que el fitoplasma de la EHPG puede ser transmitido por semilla. Esto tiene un significado biológico muy importante, ya que aunque la cantidad de semillas que transmiten efectivamente la enfermedad no fue muy alta, el solo hecho de tener plántulas infectadas por el fitoplasma dentro de una población de plántulas susceptibles representa una fuente de inóculo que puede ser luego transmitido a través de insectos vectores.

La literatura cita que la semilla se desarrolla a partir de tejido meristemático sin conexión directa con los conductos vasculares (donde se hospeda el patógeno) y que existe una barrera fisiológica que impide el paso del fitoplasma hacia los tejidos de la semilla. Es por esa razón que hasta la fecha no se ha encontrado en la literatura ningún estudio que reporte que los fitoplasmas son transmitidos por semillas, más que los reportes de los estudios realizados en Zamorano por Saballos (1999) y Campaña(2000).

Sin embargo se tiene evidencia de la presencia de ADN del fitoplasma en el embrión de cocos afectados por el Amarillamiento Letal del Cocotero, pero las semillas no germinan<sup>4</sup>.

En este estudio realizado con semillas de *Gliricidia sepium* recolectadas de árboles sanos y enfermos, se obtuvo una germinación del 100% y se observó en general un buen desarrollo y crecimiento de las plántulas, incluyendo las que dieron resultados positivos a la presencia del fitoplasma, lo que nos permite inferir que el patógeno no interfiere en el desarrollo y germinación de la semilla.

#### 4.1.3 Análisis fenotípico

A pesar de que se ha logrado encontrar el fitoplasma en las plántulas germinadas, no se puede saber si éste se encuentra viable o en estado de latencia y que eventualmente las plántulas presentarán los síntomas de la EHPG. La única diferencia en desarrollo que se observó entre las plántulas positivas y las negativas fue en el número de hojas ( $P < 0.02$ ) (cuadro 4). Por lo que se ha decidido continuar con la evaluación de las plántulas que resultaron positivas para observar el desarrollo de los síntomas en el tiempo. Esto se realizará colocándolas en el campo, protegidas con una jaula de malla fina contra insectos por un tiempo indefinido.

**Cuadro 4.** Número de hojas de plántulas germinadas a partir de semillas provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos.

| Variable                  |          | Hojas (#) |
|---------------------------|----------|-----------|
| <b>Nivel de infección</b> | Leve     | 72.92 a*  |
|                           | Moderado | 71.20 a   |
| <b>Nested PCR</b>         | -        | 73.69 a   |
|                           | +        | 60.78 b   |

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba Tukey 95.0%

Se encontró diferencia significativa para la altura y el diámetro entre los niveles de severidad leve y moderado de las plántulas ( $P < 0.005$ ) y ( $P < 0.001$ ) respectivamente sin importar si las plántulas son PCR positivas o PCR negativas. (cuadro 5 y 6). Las plántulas levemente enfermas fueron las que presentaron mayor diámetro comparado con las plántulas moderadamente enfermas.

<sup>4</sup>DOYLE, M. 2002. Enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

**Cuadro 5.** Altura en (cm) de las plántulas germinadas a partir de semillas provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos.

| Nivel de infección de plántulas | Altura en (cm) |
|---------------------------------|----------------|
| Moderado                        | 41.67a*        |
| Leve                            | 36.88 b        |

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba Tukey 95.0%.

**Cuadro 6.** Diámetro en (mm) de las plántulas germinadas a partir de semillas provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos.

| Nivel de infección de plántulas | Diámetro en (mm) |
|---------------------------------|------------------|
| Leve                            | 5.76a*           |
| Moderado                        | 5.18 b           |

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba Tukey 95.0%.

#### 4.2 COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE RESTRICCIÓN OBTENIDOS POR RFLP DEL ADN AISLADO DE FITOPLASMAS DE ÁRBOLES PROGENITORES Y PLÁNTULAS HIJAS

Debido a que con los primer P1 y P7 universales a fitoplasma, no se pudieron observar bandas en la geles de agarosa al 1% lo suficientemente intensas como para ser sometidas a una digestión, se hizo una reamplificación de nested PCR con primers específicos.

Utilizando las enzimas de restricción y geles de poliacrilamida al 8%, fue posible comprar los perfiles de restricción de árboles progenitores y plántulas hijas, obtenidos de la digestión de los productos de reamplificación de nested PCR con los primers (PP/GLLF y PP/GLLR) específicos para la EHPG.

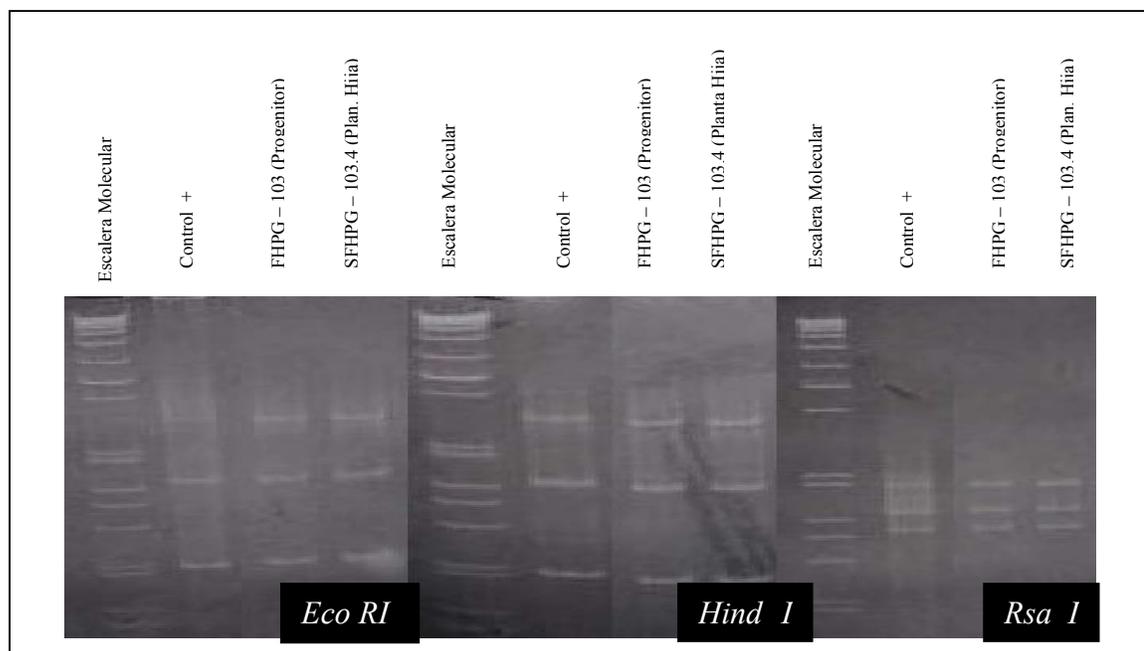
Los productos de la amplificación con nested PCR dieron bandas con concentraciones adecuadas para realizar el análisis de restricción por RFLP a las muestras provenientes de plántulas germinadas a partir de árboles moderadamente enfermos (Figura 21).

La muestras provenientes del árbol progenitor FHPG-103 y la plántula hija SHPG-103.4 presentaron perfiles idénticos al ser cortados con las enzimas *Hind I*, *Eco RI* y *Rsa I*. (Figura 22).

Los perfiles de restricción idénticos encontrados en árboles progenitores enfermos y plántulas hijas, sugieren que la secuencia del ADN encontrada en ambos casos es idéntica y por lo tanto confirma la transmisión por semilla. Las enzimas *Hinf I* y *Pst I* no generaron bandas que puede atribuirse a dos razones: a que estas enzimas han

permanecido mucho tiempo almacenadas y han perdido su actividad de restricción o debido a la baja concentración del producto de nested PCR utilizado al momento del corte.

Con las enzimas *Msp*, *Alu I* y *Dde* no se observaron perfiles de restricción bien definidos debido a la baja concentración de ADN del producto de nested PCR utilizado al momento del corte.



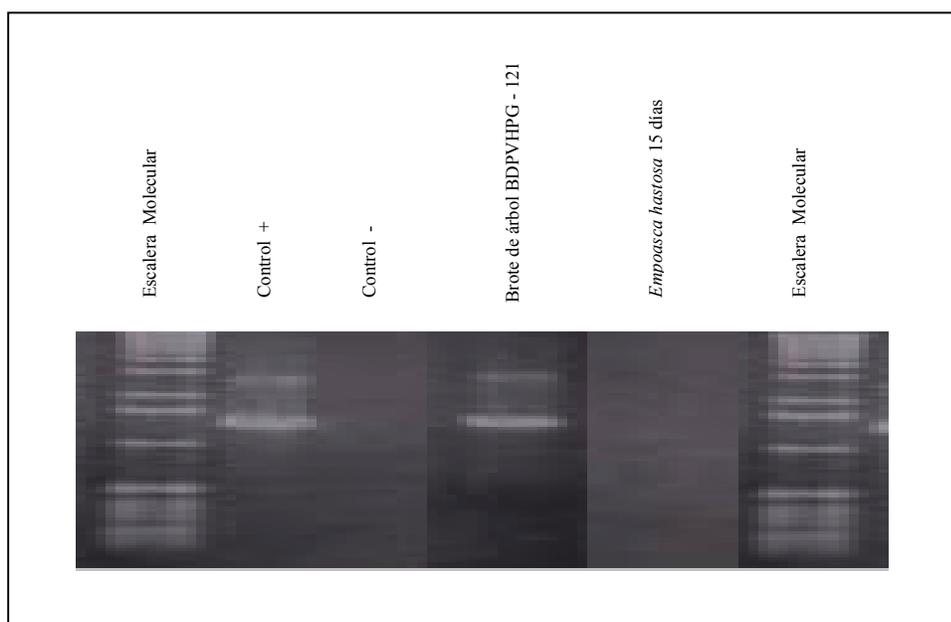
**Figura 22.** Geles de poliacrilamida al 8% mostrando los perfiles de restricción obtenidos de la digestión de los productos de reamplificación con los primers (PP/GLLF y PP/GLLR) específicos para la EHPG con las enzimas *Hind I*, *Eco RI* y *Rsa I*

### 4.3 IDENTIFICACIÓN DEL EL INSECTO VECTOR

El insecto vector con el que se trabajó en los bioensayos fue *Empoasca hastosa* el cual fue identificado utilizando un estereoscopio. Los resultados obtenidos de la prueba de PCR nested realizados a las muestras de tejidos de insectos y los tejidos de hojas del árbol que se utilizó para el período de exposición y adquisición del fitoplasma se pueden observar en la Figura 23.

La muestra extraída del árbol utilizado en la fase de exposición y adquisición del fitoplasma, presentó una alta concentración de ADN (3026 ng/μl) y se pudo visualizar una banda muy clara, lo que sugiere la presencia del fitoplasma en el tejido vegetal. La muestras de los insectos de *Empoasca hastosa* resultaron negativas a la prueba de nested

PCR. No se logró detectar ADN del fitoplasma en los insectos. Estos resultados se pueden deber al tamaño tan pequeño de los insectos de *Empoasca hastosa* y a la cantidad de impurezas que degradan el ADN dificultan la extracción del mismo, por lo que es muy común que se obtengan cantidades muy bajas de ADN impidiendo así la visualización de las bandas en la gel de agarosa 1%, después de realizada la prueba de PCR directo. En algunos casos esto se puede solucionar realizando una segunda amplificación con la prueba de nested PCR. También se puede deber a la presencia de ADNasas en el momento de la extracción que causan la degradación del ADN. Agrios (1995), menciona que los insectos vectores necesitan de un periodo de incubación del fitoplasma dentro de sus organismos de por lo menos 10 a 45 días, desde el momento que es adquirido por el insecto hasta que invade el organismo del mismo y es capaz de transmitirlo y este proceso algunas veces se ve limitado por factores genéticos y condiciones climáticas.

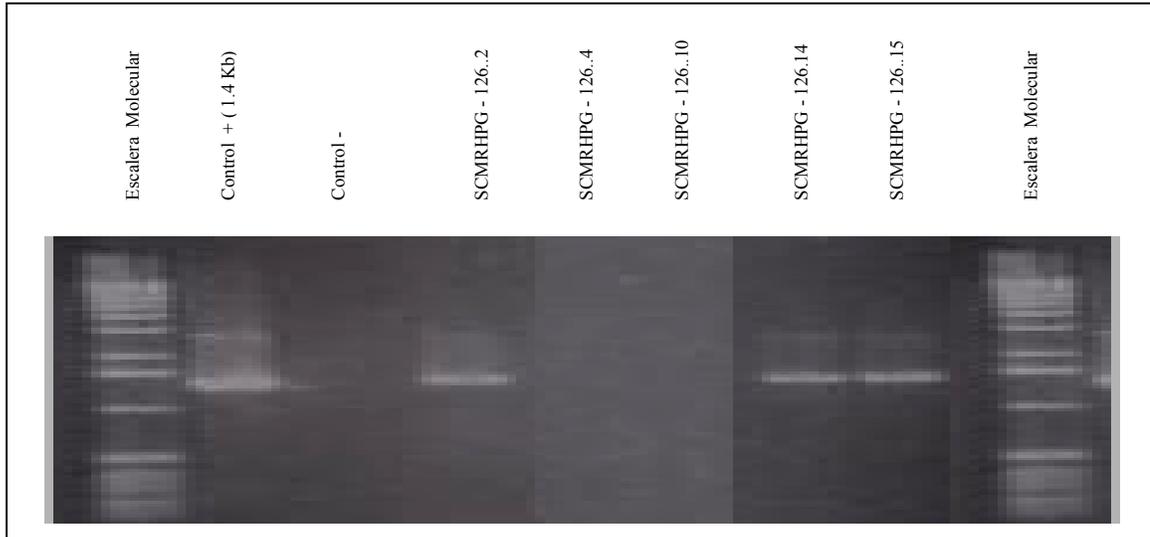


**Figura 23.** Gel de agarosa al 1% mostrando resultados al finalizar los 15 días de la fase de exposición y adquisición del fitoplasma en tejidos del follaje y tejidos de *Empoasca hastosa* .

*Empoasca hastosa* tuvo una etapa de cría previa a los ensayos de transmisión y se observó una baja mortalidad al momento de ser expuestos a ramas enfermas y al manipuleo en las jaulas. También se pudo observar que los insectos necesitan sombra para permanecer en los maceteros enjaulados para disminuir el estrés y que a medida que se van reproduciendo en el macetero van matando la plántula, por lo que se necesita estar sustituyendo con plántulas nuevas en las jaulas por lo menos cada 10 días. Los insectos requieren que las plántulas tengan una irrigación adecuada, que no estén expuestas al sol

directo ni a la lluvia para evitar la mortalidad. No se observó presencia de depredadores que dañaran de alguna manera la cría.

Treinta plántulas fueron analizadas por nested PCR, al finalizar la etapa de transmisión e incubación del fitoplasma, se pudo observar la presencia del fitoplasma y 3 de ellas resultaron positivas. (Figura 24)



**Figura 24.** Gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de la fase de transmisión e incubación del fitoplasma por *Empoasca hastosa* a plántulas sanas.

El ADN encontrado en estas plántulas es proveniente del vector "infectado" y esto significa un 10 % de transmisión del fitoplasma a plántulas sanas. Los resultados sugieren que *Empoasca hastosa* es capaz de transmitir el fitoplasma a un hospedero sano, pero que no es un vector eficiente en la transmisión de la EHPG ya que a esta especie se le encuentra en altas poblaciones en los bancos de proteína de *Gliricidia sepium* severamente enfermos en Zamorano. También se la encuentra en altas poblaciones en plantaciones y colecciones sanas de *G. sepium*.

## 5. CONCLUSIONES

Se comprobó que el fitoplasma causante de la enfermedad de la Hoja Pequeña de Gliricidia (EHPG) puede ser transmitido por semilla.

Se encontró que las plántulas germinadas a partir de semilla provenientes de árboles leve y moderadamente enfermos presentaron diferencias en el desarrollo por lo que se infiere que a mayor concentración del patógeno, hay mayores disturbios en el metabolismo del hospedero.

Se observaron perfiles idénticos de restricción entre un árbol progenitor y una plántula hija con las enzimas (*Eco RI*, *Hind III* y *Rsa I*), lo que sugiere que la secuencia de ADN encontrada en ambos casos es la misma, confirmando así también la transmisión por semilla.

Este estudio constituye el primer reporte de un fitoplasma transmitido por semilla en la literatura.

El 10% de las plántulas expuestas a *Empoasca hastosa* resultaron positivas, lo que sugiere que esta especie es capaz de transmitir el fitoplasma a un hospedero sano.

No se pudo detectar ADN del fitoplasma en los insectos de *Empoasca hastosa*, pero se sospecha que se trata de un falso negativo.

## 6. RECOMENDACIONES

Continuar con la evaluación del ensayo de transmisión por semilla con plántulas germinadas de árboles enfermos donde se detectó ADN del fitoplasma. Las plántulas deben permanecer aisladas de insectos para determinar si el fitoplasma puede causar daños. Esto podrá evaluarse por la sintomatología o midiendo si las concentraciones del fitoplasma aumentan y pueden ser detectado por PCR directo.

Se recomienda que para futuros análisis de RFLP's se utilicen enzimas nuevas, ya que se presentaron problemas con las enzimas *Hinf I* y *Pst I*.

Optimizar los protocolos de extracción de ADN de los insectos.

Realizar estudios de otros vectores en otras zonas del país.

Hacer una evaluación actual de la dispersión de la enfermedad de la Hoja pequeña de *Gliricidia* a nivel nacional.

Diseñar y validar un plan de manejo adecuado de la EHPG. Dentro del plan de manejo se debe hacer énfasis en:

Eliminación de árboles enfermos para disminuir las fuentes de inóculo de la enfermedad.

Propagación de las procedencias resistentes como Vado hondo, Managua y Guayabillas

Certificación de la semilla de *Gliricidia*, libre del patógeno por medio de las pruebas moleculares como PCR.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 1995 Fitopatología. 2 ed. Editorial Limusa. México. 838 p.
- ARANDA ROCHA, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/ Escuela Agrícola Panamericana. 78 p.
- BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N. 2001. Effects of phytoplasma [stolbur-subgroup (Bois noir-BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-biphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica* 39: 119-122.
- BOA, E.; LENNÉ, J. 1993. Final report R4852 pilot assesment of diseases of important woody legumes in Central America and Mexico. Reino Unido. Natural Resources Institute. 125p.
- BOA, E.; LENNÉ, J. 1996. Diseases and insect pests. p. 73-76. In: *Gliricidia sepium*, genetic resources for farmers. Ed. por Stewart, J.; Allison, G.; Simons, A. Tropical Forestry Papers no. 33. Oxford Forestry Intitute, Oxford, UK. 125 p.
- CAMPAÑA APOLO, M. 2000. Estudio epidemiológico a través de pruebas moleculares y bioensayos sobre las formas de transmisión de fitoplasmas de la hoja pequeña de Gliricidia. Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/ Escuela Agrícola Panamericana. 34 p.
- CASTAÑO, J. 1994. Principios Básicos de la Fitopatología. 2 ed. Zamorano, Honduras. Zamorano Academia Press. 518 p.
- CASTILLO, J. J. 1987. Contribución al conocimiento morfológico histológico y ultra estructural de plantas afectadas por filodia asociada a corpusculos micoplásmicos. Trabajo de ascenso Asociado. Maracay. Venezuela. Univ. Central de Venezuela. 196 pp. (En línea). Consultado el 13 de octubre del 2002. Disponible en: [http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13\\_4/v134z012.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13_4/v134z012.html)
- CASTILLO LIZARDO, M. 2001. Estudio básico de la variabilidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero. Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/Escuela Agrícola Panamericana. 79 p.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanzas). 1984. Especies Para Leña: arbustos y árboles para la producción de energía. Turrialba, Costa Rica. 343 p.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanzas). 1997. Resultados de 10 años de Investigación Silvicultural del Proyecto MADELEÑA en Honduras. Turrialba, Costa Rica. 160 p.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanzas). 1991. Madero Negro (*Gliricidia sepium* (Jacquin) Kunth ex Wapers) árbol de uso múltiple de América Central. Costa Rica. Editorial El País. 72 p.

COUSIN, M.T. 1995. Phytoplasmes et phytoplasmoses. *Agronomie*. 15, 245-264.

D'ARCY, C.J.; NAULT, L.R. 1982. Insect transmission of plant viruses and mycoplasmalike and rickettsialike organism. *Plant Disease* 66: 99-104.

DAVIS, R.E.; LEE, I.M. 1992. Mycoplasmalike organism as plant disease agents. *ATCC Quart. Newsl.* 4:8-11.

DENG, S.; HIRUKI, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14: 53-61.

DOI, Y.; TERAMAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 33:259-266.

EVERT, R. F. 1977. Phloem structure and histochemistry. *Annu. Rev. Plant Pathology* 83: 1279-1282.

FREUNDT, E. A. 1974. The Micoplasmas. Citado por: BUCHARAN, R.; GIBBONS, N. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Baltimore. Williams and Wilkins. p. 929-955.

GLOVER, N. 1989. *Gliricidia* production and use. Hawaii, EE.UU. Nitrogen Fixing Tree Association, Waimanalo, Hawaii, USA. 44 p. (En línea). Consultado el 31 de agosto del 2002. Disponible en: <http://www.winrock.org/forestry/factpub/FACTSH/gliricidia.htm>

GONZALES, M. R. 1978. Maderas de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General Forestal. Informe Divulgativo Nº 20- DIF.1978.26 p. Citado por: CATIE. 1997. Resultados de 10 años de Investigación Silvicultural del Proyecto MADELEÑA en Honduras. Turrialba, Costa Rica. 160 p.

- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology. Mediterr.* 35: 144-151
- GUTHRIE, J.N.; WALSH, K.B.; SCOTT, P.T.; RASMUSSEN, T.S. 2001. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 58: 23-30.
- HARRISON, N.; KIRKPATRICK, B.C.; DAWN, G.R. 2002. The Phytoplasmas - Wall-less mollicutes of plants and invertebrates. Universidad de la Florida, Fort Lauderdale, Fl. p. 31.
- HEARON, S.S.; LAWSON, R.H.; SMITH, F.F.; MCKENZIE, J.T.; ROSEN, J. 1976. Morphology of filamentous forms of a mycoplasma-like organism associated with hydrangea virescence. *Phytopathology.* 66:608- 616.
- INTERNACIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURA. Annual report. 1979; Farming systems program. Ibadan, 1980. Citado por: CATIE. 1997. Resultados de 10 años de Investigación Silvicultural del Proyecto MADELEÑA en Honduras. Turrialba, Costa Rica. 160 p.
- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. 1990. Optimization of PCRs. *In PCR protocols: Protocols A guide to methods and applications.* Ed. Por M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White. California, EE. UU. Academic Press. p. 3 -12.
- ISHII, T.; DOI, Y.; YORA, K.; ASUYAMA. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Annu. Phytopathology. Soc. Japan.* 33: 267-275.
- JAGOUÉIX-EVAILLARD, S.; TARENDEAU, F.; GUOLTER, K.; DANET, J-L.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. 2001. *Catharantus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 14: 225-233.
- KEAY, R. W. J. 1989. *Trees of Nigeria.* Clarendon Press Oxford. 476 p.
- KENYON, L.; HARRISON, N.; ASHBURNER, E.R.; BOA, E.; RICHARDSON, P.A. 1998. Detection of a witches' broom-related phytoplasma in trees of *Gliricidia sepium* affected by little-leaf disease in central America. *Plant Pathology* 47: 671-680.
- KENYON, L.; BLACK, R.; DOYLE, P. 1996. Diseases of *Gliricidia sepium* in Latin America. Reino Unido. Natural Resources Institute. 50 p.
- KIRKPATRICK, B.C.; STENGER, D.C.; MORRIS, T.J.; PURCELL, A.H. 1987. Cloning and detection of DNA from a monoculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238: 197-200.

KREUZER, H.; MASSEY, A. 1996. Recombinant DNA and Biotechnology. Washington, EE.UU., ASM Press. 552 p.

KUNKEL, L.O. 1926. Studies and aster yellows. Amer. J. Botany 13: 646-705.

LAVIN, M. 1996. Taxonomy. P. 3-17. In: STEWART, J.; ALLISON, G.; SIMONS, A. eds. *Gliricidia sepium*, genetic resources for farmers. Tropical Forestry Papers no. 33. Oxford Forestry Intitute, Oxford, UK. 125 p.

LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R.; 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 (G.B.) 48: 1153-1169.

LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R.D.; GUNDERSEN, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopathology (EE.UU.) 83 (8): 834 – 842.

LEE, I.M.; GUNDERSEN, D.E.; HAMMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) groups -especific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detected mixed- MLO infections in a single host plant. Phytopathology 84: 5559-566.

LEPKA, P.; STITT, M., MOLL.; SEEMÜLLER, E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. Physiol. Mol. Plant Pathology 55: 59- 68.

MACDICKEN, K; HAIRIAH, K. A; OTSAMO, B; DUGUMA, N; MAJID. 1997. Shade-based control of *Imperata cylindrica*: tree fallows and cover crops. Agroforestry Systems. no. 36:131-149. (En línea). Consultado el 31 de agosto del 2002. Disponible en:<http://www.winrock.org/forestry/factpub/FACTSH/gliricidia.htm>

MARTINEZ, S.; CORDOVA, I.; B.E.; MAUST, B.E.; TREJO, C.; OROPEZA, C.; SANTAMARIA, J.M. 2000. Is abscisic acid responsible for abnormal atomatal closure in coconout palms showing lethal yellowing J. Plant Physiol. 156: 319-322.

McCOY, R. E. 1982. Use of tetracycline antibiotics to control yellows diseases. Plants Disease. 66:539-542.

McCOY, R.E. 1979. Mycoplasmas and yellows diseases. In The Mycoplasmas. Ed. por Whitcomb. F.; Tully G. NY, EE.UU. Plants and Academic Press. p. 229-264.

McCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; CHEN, T.A.; CHIYLOWSKI, L.N.; COUSIN, M.T.; DALE, J.L.; deLEEuw, G.T.; GOLINO, D. A; HACKETTT, K.J.; KIRKPATRICK, B.C.; MARWITZ, R.; PETZOLD, H.; SINHA, R.C.; SUGUIRA, M.;

- WHITCOM, R.F.; YANG, I.L.; ZHU.; SEEMÜLLER, E. 1989. Plants diseases associated with mycoplasma- like organisms. *In* The Mycoplasmas. Ed. por Whitcomb, F; Tully..G. San Diego, EE.UU. Academic Press. p. 544-640.
- MICKLOS, D.; FREYER G. A. 1990. DNA Science: A first course in recombinant DNA technology. Carolina del Norte, EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 442 p.
- MOCTEZUMA, E. V.; KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. México D.F., México. Mundi prensa. 147 p.
- MOUNT, M.; LACY: G. 1982. Phytopathogenic Procaryotes. Academic Press. EEUU. 541 p.
- MUSETTI, R.; FAVALI, M.A.; PRESSACCO. 2000. Hysthopathology and polyphenolcontentin plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102: 133-147.
- NAMBA, S.; OYAIZU, H.; KATO, S.; IWANAMI; TSUCHIZAKI, T. 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organism. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 461-467.
- NASU, S.; JENSEN, D.D.; RICHARDSON, J. 1970. Electron microscopy of mycoplasma-like bodies asociated wiht insect and plant hostsof peach western X-disease. *Virology* 41: 585-595.
- NAULT, L; RODRÍGUEZ, J. 1985. The leafhoppers and planthoppers. John Wiley & Sons, Inc. EE.UU. 499 p.
- NYLAND, 1971. Remision of symptoms of pear decline and peach X-disease after treatment with tetracycline. *Phytopathology* 61: 904-905.
- OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; KUBOYAMA, T.; MIYATA, S.; UGAKI; NAMBA, S. 2001. A plasmid of phytoplasmas encodes a unique replication protein having both plasmid - and virus- like domins: Clue to viral ancestry or result of virus/ plasmid recombination? *Virology* 285: 270- 277.
- SIGMA, 2001. [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), visitada en octubre, 2002.
- RAJU, B.C.; NYLAND, G. 1998. Chemoterapy of mycoplasma disease of fruit trees. *In*. Tree Mycoplasmas and Mycoplasmas Diseases. Ed. por Hiruki. University of Alberta Press, Edmonton, Alberta, Canada, p. 207-216.
- RAMÍREZ WASHIGNTON, P. 2000. Búsqueda y evaluación de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de *Gliricidia sepium* en le litoral Pacífico de Honduras, El Salvador y Nicaragua. Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/ Escuela Agrícola Panamericana. 37 p.

RAZIN, S.; YOGEV, D. 1995. Restriction endonuclease analysis. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, E.E. U.U. Academic Press. p. 355 -368.

SABALLOS, A. 1999. Diagnóstico molecular y estudio de la epidemiología del fitoplasma de la hoja pequeña de la gliricidia (*Gliricidia sepium*). Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/ Escuela Agrícola Panamericana. 72 p.

SAGLIO, P.H.; WHITCOMB, R.F. 1979. Diversity of wall-less prokaryotes in plant vascular tissue, fungi and invertebrates animals. *In* The Mycoplasmas. Ed. por Whitcomb and Tully. NY, EE.UU. Plant and Insect Mycoplasmas, Academic Press. p. 1-36.

SALAZAR, L. F. 1996. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 226p.

SAMRT, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.; AHRENS, U.; LORENZ, K.H.; SEEMÜLLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based upon sequences of the 16-23 rRAN spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.

SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; KIRKPATRICK, B.C.; SEEMÜLLER, E. 1993. Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organism using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139: 519-527.

SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E.; SMART, D. C.; KIRKPATRICK, C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma - like organisms or phytoplasmas. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, E.E. U.U. Academic Press. p. 369 -380

SEARS, B.B.; KLOMPARENS, K.L. 1989. Leaf tip cultures of the evening primrose allow stable, aseptically of mycoplasma-like organism. *Can. J. Plant Pathology* 11:343-348.

SEARS, B. B.; KIRKPATRICK, B. 1994. Unveiling the evolutionary relationship of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *AMS news* co: 307-312. (En línea).

Consultado el 13 de septiembre del 2002. Disponible en:

[http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13\\_4/v134z012.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13_4/v134z012.html)

SHINHA, R.C.; PATERSON, E.A. 1972. Uptake and persistence of oxytetracycline in aster plants and vectors leafhoppers in relation to inhibition of clover phyllody agent. *Phytopathology.* 62: 283-377.

SIDDIQUE, A.B.; GUTHRIE, K.B.; WALSH, D.T.; WHITE; SCOTT, P.T. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease.* 82: 1112-1120.

SIMONS, A. 1996. Ecology and reproductive biology. p. 19-31. *In*: STEWART, J; ALLISON, G; SIMONS, A. eds. *Gliricidia sepium*, genetic resources for farmers. Tropical Forestry Papers no. 33. Oxford Forestry Institute, Oxford, UK. 125 p.

STEWART, J.; ALLISON, G.; SIMONS, A. 1996. *Gliricidia sepium*, genetic resources for farmers. Reino Unido. Oxford forestry Institute. 125 p.

STRYER, L. 1995. Biochemistry. 4ta edición. W.H. Freeman and Co. 1064 p.

VAN, H.; TJALLINGHII, W.; VAN, T. 1994. Phloem collection from lettuce (*Lactuca sativa* L.): chemical comparison among collection methods. J. Chem. Ecol. 20: 3191-3206.

VÁZQUEZ, A. 2001. Descubren científicos cubanos causa de enfermedad de la caña. (En línea) Consultado el 13 octubre del 2002. Disponible en:  
<http://www.cadenahabana.islagrande.cu/informacion/cien01140802.htm>

WEBB, D. R.; BONFIGLIOLI, R.G.; CARRARO, L.; OSLER, R.; SYMONS, R. H. 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants ann insect vectors. Phytopatology 89: 894- 901.

WHITCOMB, R. F. 1973. Diversity of prokaryotic plant pathorens. Proceedings North Central Branch, Entomological society of America. 28: 38-60. (En línea). Consultado el 13 de septiembre del 2002. Disponible en:  
[http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13\\_4/v134z012.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13_4/v134z012.html)

ZALASAR, L.F. 2002. Fitoplasmas: un factor negativo para la producción de semilla de papa. (En línea) Consultado el 13 de octubre del 2002. Disponible en:  
<http://www.condesan.org/infoandina/Foros/InfoPapa/papa27.htm>

## **8. ANEXOS**

**Anexo 1. Lista de plantas hospederas de fitoplasmas en Venezuela.**

| Nombre común     | Nombre científico                        | Síntomas                              |
|------------------|--|---------------------------------------|
| Ajonjolí         | <i>Sesamun indicum</i> L.                | Filodia                               |
| Añil             | <i>Indigofera suffnucosa</i> Mill.       | Filodia y Escobillas                  |
| Canutillo        | <i>Milleria quinqueflora</i>             | Filodia                               |
| Caraota          | <i>Phaseolus vulgaris</i>                | Filodia                               |
| Cordón de Fraile | <i>Leonotis repetaefolia</i> (L.) R. Br. | Filodia                               |
| Crotalaria       | <i>Crotalaria agatiflora</i>             | Filodia y Escobillas                  |
| Dolichos         | <i>Dolichos lablab</i>                   | Filodia                               |
| Escoba dulce     | <i>Scoparia dulcis</i>                   | -                                     |
| Frijol de Monte  | <i>Phaseolus lathyroides</i>             | Filodia                               |
| Frijolillo       | <i>Phaseolus aureus</i>                  | Filodia                               |
| Maíz             | <i>Zea mais</i>                          | Enanismo                              |
| Quinchoncho      | <i>Cajanus cajan</i>                     | Filodia y Escobillas                  |
| Soya             | <i>Glicine max</i>                       | Filodia y Escobillas                  |
| Desmodium        | <i>Desmodium barbatum</i> Benth          | Filodia                               |
| Buenas Tardes    | <i>Catharanthus roseus</i> G. Don.       | -                                     |
| («Periwinkle»)   | <i>Lochnera rosea</i> (L.) Rchb.         | Filodia, Ecobilla y Escoba de brujas. |
|                  | <i>Vinca rosea</i> L.                    |                                       |

Fuente: Castillo, 1987. Adaptado por el autor.

## Anexo 2. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

### Método CTAB modificado por Harrison.

Reactivos

#### Buffer CTAB 1

2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)  
1.4M NaCl  
20mM EDTA pH8  
100 mM Tris – HCl pH8 (ácido etilenodiaminotetraacético)  
1% PVP-40  
0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol

Disolver los reactivos excepto el  $\beta$ -mercaptoetanol, en aproximadamente 500ml de agua destilada aplicando calor. Enfriar y ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado. Aforar a 1 L. Esterilizar en el autoclave durante 20 min. a 120 °C 15 psi. Dejar enfriar y adicionar el  $\beta$ -mercaptoetanol antes de usar, mezclar y almacenar a 65 °C.

#### Buffer CTAB 2

10% CTAB  
0.7 M NaCl

#### Cloroformo: Alcohol isoamílico 24: 1

96 ml de cloroformo  
4 ml de alcohol isoamílico

#### Buffer TE alto en sal

1mM EDTA  
1M NaCl  
10mM Tris-HCl pH 8

Esterilizar en el autoclave durante 20 min. a 120 °C 15 psi

#### Isopropanol

#### Etanol al 95 %

70 ml etanol  
30 ml agua destilada

**Protocolo para la extracción de ADN (Doyle & Doyle modificado por Harrison)**

1. Colocar en un mortero aproximadamente 1 g del tejido a extraer y agregar 600  $\mu$ l de CTAB 1.
2. Agregar 0.1 g de arena de cuarzo ultrapura y macerar el tejido con un pistilo.
3. Transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
4. Incubar a 65 C por 30 min.
5. Añadir (igual volumen )600  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, mezclar bien.
6. Centrifugar por 5 min. a 12,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga, evitando la interface.
8. Añadir 1/10 del volumen de CTAB 2
9. Repetir pasos 5, 6 y 7.
10. Añadir 2/3 del volumen de isopropanol frío, mezclar bien.
11. Centrifugar por 10 min. a 12,000 rpm.
12. Decantar el líquido cuidando de no botar el precipitado de ADN.
13. Secar al aire o en una incubadora.
14. Resuspender el precipitado en 100  $\mu$ l de buffer TE alto en sal.
15. Añadir 250  $\mu$ l de etanol frío al 95% para precipitar el AD
16. Centrifugar 10 min. a 12,000 rpm.
17. Repetir paso 12.
18. Agregar 500  $\mu$ l de etanol al 70% frío.
19. Centrifugar 10 minutos a 12,000 rpm.
20. Decantar el líquido cuidando de no botar el precipitado de ADN.
21. Secar al aire o en una incubadora
22. Resuspender el precipitado en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril.
23. Almacenar a 4 °C.

**Método de extracción de ADN de insectos (Doyle & Doyle modificado por Harrison)**

1. Colocar 200µl de buffer CTAB 1 de extracción a 60°C en un tubo microcentrífuga
2. Añada 1 insectos por tubo
3. Macerar bien el insecto
4. Incube por 30 min a 60°C
5. Agregue 200µl de cloroformo isoamil alcohol 24:1
6. Invierta el tubo y colóquelo 30 seg en el vortex
7. Centrifugue a por 5 min a 5000rpm
8. Transfiera la fase sobrenadante en un tubo nuevo
9. Añada igual volumen de isopropanol
10. Incube por 30 min a temperatura ambiente
11. Centrifugue por 5 min
12. Descarte el líquido dejando el sedimento en el fondo
13. Deje secar a temperatura ambiente por 30 min
14. Resuspender el sedimento en 25µl de agua biodestilada

**Anexo 3. Rehidratación de las PCR beads**

24.0  $\mu$ l de agua destilada estéril

0.5  $\mu$ l de P1 (25 ng/ $\mu$ l)

0.5  $\mu$ l de P7 (25 ng/ $\mu$ l)

---

25.0  $\mu$ l total

**Anexo 4. Protocolos para Reacción en Cadena de la Polimerasa****Buffer 10X para PCR**

385  $\mu$ l de agua desionizada, destilada y estéril

200  $\mu$ l Tris (1M)

250  $\mu$ l KCl (1 M)

50  $\mu$ l gelatina (2%)

100  $\mu$ l Tween 20 (5%)

15  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (1M)

1000  $\mu$ l total

Preparar y usar durante el día de preparación, posteriormente descartar.

**Dideoxynucleotidos 10 X (dNTP's)**

760  $\mu$ l de agua desionizada, destilada y estéril

10  $\mu$ l de dATP (100 mM)

10  $\mu$ l de dCTP (100 mM)

10  $\mu$ l de dGTP (100 mM)

10  $\mu$ l de dTTP (100 mM)

800  $\mu$ l total

Ajustar a pH 7 con 0.5  $\mu$ l de 1N NaOH

**Iniciadores**

1  $\mu$ l de solución madre de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l

39  $\mu$ l de agua desionizada, destilada y estéril

40  $\mu$ l de solución 25 ng/ $\mu$ l

**Reacción de PCR**

33.8 µl de agua desionizada, destilada y estéril  
 5.0 µl de dNTP's 10X  
 2.0 µl de iniciador 1  
 2.0 µl de iniciador 2  
 5.0 µl de buffer de PCR 10X  
 0.2 µl *Taq* polimerasa (5u/µl)  
2.0 µl de ADN muestra  
 50.0 µl total

### **Programas para el termociclador**

Iniciadores universales P1 y P7

Primer ciclo    94 °C 2:00 min.  
                   55 °C 1:20 seg.  
                   72 °C 1:00 min.

28 ciclos        94 °C 0:30 seg.  
                   55 °C 1:20 seg.  
                   72 °C 2:00 min.

Ultimo ciclo    94 °C 0:30 seg.  
                   55 °C 1:20 seg.  
                   72 °C 8:00 min.

### **Reacción en cadena de la polimerasa: primers: PP/ Gllf y PP/Gllr (Saballos, 1999)**

Mezcla para la reacción

2µl de template de ADN  
 0.5 µM de cada iniciador (PP/Gllf y PP/Gllr)  
 100µM de cada dNTP  
 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 unidad de tap polomerasa  
 1 x buffer de PCR

Aceite mineral

Equipo

Micropipetas y puntas estériles  
 Tubos de PCR  
 Termiciclador

Selle cada reacción con una gota de aceite mineral

## Primer ciclo

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| Desnaturalización | 4 °C 2:00 min.  |
| Ligamento         | 55 °C 1:20 seg. |
| Extensión         | 72 °C 1:00 min. |

## 28 ciclos

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| Desnaturalización | 94 °C 0:30 seg. |
| Ligamento         | 55 °C 1:20 seg. |
| Extensión         | 72 °C 2:00 min. |

## Ultimo ciclo

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| Desnaturalización | 94 °C 0:30 seg. |
| Ligamento         | 55 °C 1:20 seg. |
| Extensión         | 72 °C 8:00 min. |

**Anexo 5. Preparación de reacciones de digestión con enzimas de restricción**Día 1

5.0  $\mu$ l de producto de amplificación (varia de acuerdo a la intensidad de la banda)

0.5  $\mu$ l de enzima (10 U/ $\mu$ l)

1.5  $\mu$ l de buffer de la enzima

8.0  $\mu$ l de agua destilada estéril (debe modificarse, para completar 15  $\mu$ l de volumen final)

15.0  $\mu$ l Total (incubar a la temperatura indicada, hasta el día siguiente)

Día 2

A la mezcla del día uno, agregar:

0.5  $\mu$ l de enzima

0.5  $\mu$ l de buffer

4.0  $\mu$ l de agua destilada estéril

20.0  $\mu$ l total (incubar a la temperatura indicada, hasta el día siguiente)

Detener la reacción, colocándola a 65 °C durante 5 min.

## Anexo 6. Protocolos para la preparación de geles de poliacrilamida al 8%

### Solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%

#### 29.0 g acrilamida

1.0 g bisacrilamida

Pesar y aforar a 100 ml con agua destilada estéril. Si la solución se ve turbia filtrar y almacenar en un frasco oscuro a 4 °C. La solución es útil hasta que se vuelve de un color amarillento, en ese momento agregue TEMED para que se polimerice y posteriormente descarte.

### TBE 5X

54.0 g de Tris

27.5 g de ácido bórico

20.0 ml de EDTA 0.5M pH 8

### Solución de persulfato de amonio al 1%

#### 0.1 g de persulfato de amonio

1.0 ml de agua destilada estéril

Mezcle en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Descarte la solución no utilizada.

### Gel de acrilamida al 8%

6.65 ml de solución acrilamida-bisacrilamida al 30%

13.17 ml de agua destilada estéril

5.0 ml de TBE 5X

175.0  $\mu$ l de persulfato de amonio al 1% (preparado en ese momento)

8.7  $\mu$ l de TEMED

Mezclar y verter en el molde para la gel. Tiempo aproximado de polimerización: 1:30 h.

### Escalera molecular (1 Kb DNA ladder Gibco)

10  $\mu$ l de 1 Kb DNA ladder

20  $\mu$ l de buffer de carga

70  $\mu$ l de agua destilada

100  $\mu$ l