

**Diagnóstico molecular y estudio de la
epidemiología del fitoplasma de la Hoja
Pequeña de la Gliricidia (*Gliricidia sepium*)**

300892

Ana Ixtla Saballos Espinal

300892

MICROISIS:	_____
FECHA:	_____
ENCARGADO:	_____

ZAMORANO

Departamento de Protección Vegetal

Abril, 1999

#971

Diagnóstico molecular y estudio de la epidemiología del fitoplasma de la Hoja Pequeña de la Gliricidia (*Gliricidia sepium*).

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por

Ana Ixtla Saballos Espinal

Zamorano-Honduras

Abril, 1999

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.



Ana Ixtla Maya Saballos Espinal

Zamorano, Honduras
Abril, 1999

DEDICATORIA

A Dios

A nuestro planeta

A mi familia

A Nicaragua

AGRADECIMIENTOS

A mis padres sin cuyo apoyo incondicional este trabajo no hubiera sido posible

Al personal del DPV, especialmente a doña Nolvía, Rosa, Chimino y Lourdes, que tan desinteresadamente brindan su ayuda a los estudiantes.

A Carolina y Elsa, por los conocimientos compartidos y la ayuda brindada

A mis asesores, por la excelente guía que me dieron en la realización de este estudio.

A todos los compañeros del Zamorano, que con su presencia han hecho del tiempo en Zamorano un periodo agradable de mi vida.

A mis amigos Ingrid, Yolanda, Anthony, Olenka, por las penas y alegrías compartidas

A Gabriel, por su apoyo, cariño y comprensión y por todos los momentos felices juntos.

A doña Marthita Cálix, por ser en Zamorano como una madre para mí.

A Jorgito, por su cariño desinteresado y generoso.

Al Dr. Harrison, Dr. Kenyon y Dr. Boa, por su ayuda y conocimientos, imprescindibles para la realización de este trabajo.

Al Dr. Bolaños por su ayuda y su amistad.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco al Banco Central de Nicaragua por el financiamiento de mis estudios en el Programa de Ingeniería Agronómica.

RESUMEN

Saballos, Ana 1999. Diagnóstico molecular y estudio de la epidemiología del fitoplasma de la hoja pequeña de la *Gliricidia*. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 71 p.

En el madreado se ha detectado una enfermedad asociada con un fitoplasma, llamada Enfermedad de la Hoja Pequeña de la *Gliricidia* (EHPG). Se caracterizaron los síntomas que consisten en: reducción del tamaño de los folíolos, distorsión foliar, proliferación de brotes y brotes débiles. El síntoma amarillamiento no resultó confiable para la identificación de la enfermedad en el campo. Una enfermedad de esta naturaleza puede causar graves pérdidas económicas ya que debido al declinamiento gradual de los árboles es fácil que pase desapercibida hasta encontrarse en un nivel de severidad y expansión grandes. Como primer paso para estudiar la epidemiología de la enfermedad fue necesario optimizar una técnica apropiada para la detección del patógeno. Se utilizó la técnica molecular para amplificar ácidos nucleicos, conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction). Se realizó la optimización de los factores críticos del proceso. Entre los principales se incluyen: el método de extracción y máximo tiempo de almacenaje de las muestras frescas, la concentración de los componentes esenciales para la reacción y las temperaturas óptimas de las tres fases de cada ciclo. Con la técnica optimizada se llevaron a cabo estudios de transmisión de la enfermedad. Se encontró transmisión a través de estacas. Aunque el nivel de severidad de la enfermedad afecta negativamente el enraizamiento, estacas de plantas asintomáticas infectadas y de plantas con síntomas moderados enraízan y presentan infección del patógeno en las nuevas plantas. Se detectó ADN del fitoplasma en plántulas germinadas de semillas de plantas enfermas. Esto sugiere una posible transmisión a través de semillas. Los insectos *Empoasca hastosa*, *Lopidea murray*, *Alconeura sp.*, *Ollarianus sp.*, *Hydatothrips sp* se identificaron como posibles vectores de EHPG, ya que se le detectó ADN del fitoplasma en sus tejidos.

Palabras claves: PCR, *Gliricidia sepium*, fitoplasma, ADN, biología molecular, epidemiología.

Nota de Prensa

PCR: Una nueva herramienta para el diagnóstico de enfermedades de plantas

En el Departamento de protección Vegetal, Zamorano, se cuenta ahora con una nueva técnica que amplía las capacidades de diagnóstico e identificación de enfermedades de las plantas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite la detección de un patógeno a partir de la base de la identidad de cualquier organismo: el ácido desoxirribonucleico o ADN. Utilizando esta técnica se obtuvieron interesantes resultados sobre la caracterización de síntomas y formas de transmisión de la enfermedad de la hoja pequeña de la *Gliricidia*.

Todas las características de un ser vivo están codificadas en este compuesto, en un alfabeto de cuatro letras o base: adenina, guanina, timina y citosina. Cada base se acopla únicamente a su base complementaria. De esta manera, tenemos que la adenina se unirá siempre a la timina y la guanina a la citosina. La secuencia en que estas bases están ordenadas es única para cada organismo, de modo que sirven para identificarlo, como una especie de huella digital genética. El PCR amplifica o incrementa la cantidad de ADN presente en una muestra, por lo que se puede detectar la presencia de un organismo aun cuando se encuentre en cantidades tan bajas que no es posible detectarlo por otros medios.

Esta técnica es actualmente usada en todo el mundo no solo en el área de fitopatología, sino en todas las ramas de las ciencias biológicas. En el laboratorio molecular del DPV, se realizaron durante 1998 y 1999 pruebas para lograr la optimización de este método, con el fin de usarlo para realizar diagnósticos fitopatológicos. El método se validó en una enfermedad de un árbol de uso agroforestal: El madreño o matarratón (*Gliricidia sepium*). La enfermedad es conocida como Hoja Pequeña de la *Gliricidia* por su característica más notoria que es la reducción del tamaño de las hojas de la planta enferma y causa el declinamiento. El agente causal es un fitoplasma, organismo procariota sin pared celular. Por ser un patógeno de difícil diagnóstico con pruebas convencionales, como cultivo en platos petri y la observación en microscopio óptico, esta enfermedad resulta un excelente modelo para desarrollar un sistema de diagnóstico por PCR.

En el proceso de realización de una prueba PCR existen varios puntos claves que influyen en el éxito de la reacción. Estos son: La calidad y cantidad de la extracción de ADN de la muestra, la concentración de reactivos como magnesio y nucleótidos, y las temperaturas a las que se realice el proceso. Después de múltiples pruebas variando estos factores, se consiguió tener una prueba segura y confiable para diagnosticar al fitoplasma causante de

la enfermedad de la hoja pequeña. Con la técnica fue posible amplificar ADN del gen 16S rARN del fitoplasma y de esta manera identificar a las plantas infectadas con el patógeno.

Con esta prueba se realizaron ensayos de caracterización de síntomas y formas de transmisión, los cuales arrojaron resultados importantes para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad y el desarrollo de estrategias de manejo.

En la caracterización de síntomas se encontró que los síntomas más confiables para el diagnóstico de campo de la enfermedad son la reducción del tamaño de las hojas, la proliferación de brotes axilares de follaje débiles, y la deformación de las hojas, las cuales toman forma de cuchara. La presencia de estos síntomas es una guía bastante segura para identificar a la enfermedad de la hoja pequeña, sin embargo, la ausencia de estos no es una prueba de que la planta este saludable, ya que se ha detectado ADN del fitoplasma en concentraciones muy bajas en plantas sin síntomas aparentes.

Se identificaron algunos insectos posibles vectores de la enfermedad. Estos insectos son: *Empoasca hastosa*, *Lopidea murray*, *Alconeura sp.*, *Ollarianus sp.* e *Hydatothrips sp.* Es necesario realizar pruebas de transmisión de la enfermedad de plantas sanas a enfermas por medio de estos insectos para comprobar su capacidad vectoraje.

Un resultado de gran relevancia para futuros planes de manejo del madreño es la comprobación de que la enfermedad es transmisible a través de la propagación asexual (estacas). A pesar de que la enfermedad afecta negativamente el porcentaje de enraizamiento de las estacas, cuando se toma estacas de plantas asintomáticas o con síntomas moderados de la enfermedad se obtiene un buen porcentaje de estacas enraizadas muchas de las cuales presentan infección del patógeno. Esto resulta alarmante considerando que el método de propagación más usado en Centro América es el de estacas, y existe el riesgo de estar diseminando la enfermedad aun si se toma la precaución de cortar las estacas de plantas al parecer sanas.

También se detectó ADN del fitoplasma en un bajo porcentaje de plántulas. Hasta el momento se consideraba que no existía una transmisión de enfermedad causadas por fitoplasmas a través de semilla. En caso de confirmarse este resultado, sería uno de los primeros reportes de esta forma de transmisión.

Los estudios realizados para la enfermedad de la hoja pequeña de la *Gliricidia* pueden ser usados como modelo para otras investigaciones de enfermedades causadas por patógenos similares, como el amarillamiento letal del cocotero; y para realizar estudios más profundos de identificación de biotipos, como por ejemplo en el caso de enfermedades virales.

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Agradecimiento a patrocinadores	vi
Resumen	vii
Nota de prensa	viii
Contenido	x
Indice de Cuadros	xiii
Indice de Figuras	xiv
Indice de Anexos	xvi
1. INTRODUCCION	1
1.1 PROBLEMATICA DEL MADREADO	1
1.2 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	1
1.3 OBJETIVOS	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivo Específico	2
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 EL MADREADO	3
2.1.1 Clasificación botánica	3
2.1.2 Origen y distribución	3
2.1.3 Descripción botánica	4
2.1.4 Usos agroforestales del madreado	5
2.1.4.1 Producción de leña	5
2.1.4.2 Cercas vivas	5
2.1.4.3 Abono verde	5
2.1.4.4 Forraje	6
2.1.4.5 Sombra y soporte para otros cultivos	7
2.1.4.6 Otros usos	7
2.1.5 Propagación	7
2.1.5.1 Propagación asexual	7
2.1.5.2 Propagación sexual	7
2.1.6 Plagas insectiles y enfermedades	11

2.2	FITOPLASMAS	12
2.2.1	Historia	12
2.2.2	Taxonomía	12
2.2.3	Características	12
2.2.4	Síntomas causados por fitoplasmas	13
2.2.5	Mecanismos de resistencia	14
2.2.6	Transmisión	14
2.2.7	Una enfermedad causada por un fitoplasma: El Amarillamiento letal del cocotero	15
2.3	Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia	16
2.3.1	Antecedentes	16
2.3.2	Sintomatología	16
2.4	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa	19
2.4.1	Descripción de la técnica	19
2.4.2	Uso de PCR en el diagnóstico de la EHPG	22
3.	MATERIALES Y METODOS	23
3.1	OPTIMIZACION DEL METODO PCR	23
3.1.1	Factores críticos del proceso	23
3.1.1.1	Fase de extracción de ADN	23
3.1.1.2	Fase de amplificación	24
3.1.1.3	Fase de electroforesis	25
3.2	DETERMINACION DE POSIBLES VECTORES	26
3.2.1	Recolección de la fauna insectil	26
3.2.2	Prueba PCR a insectos	26
3.3	CARACTERIZACION DE LOS SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD	28
3.3.1	Diseño del ensayo	28
3.3.2	VARIABLES medidas	29
3.4	ESTUDIO DE TRANSMISION POR ESTACAS	30
3.4.1	Diseño del ensayo	30
3.4.2	VARIABLES medidas	31
3.5	ESTUDIO DE TRANSMISION POR SEMILLAS	32
3.5.1	Diseño del ensayo	32
3.5.2	VARIABLES medidas	32
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
4.1	OPTIMIZACION DEL METODO PCR	33
4.1.1	Fase de extracción	33
4.1.1.1	Determinación del método de extracción más adecuado	33
4.1.1.2	Determinación del tiempo máximo de almacenamiento de la muestra previo a la extracción	34
4.1.2	Fase de amplificación	34
4.1.3	Fase de electroforesis	36
4.1.3.1	Concentración de agarosa	36
4.1.3.2	Elección del buffer de corrida	36
4.1.3.3	Voltaje de corrida	36

4.2	DETERMINACION DE POSIBLES VECTORES	37
4.3	CARACTERIZACION DE SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD.....	38
4.4	TRANSMISION POR ESTACAS	41
4.5	TRANSMISION POR SEMILLAS	42
5.	CONCLUSIONES	44
6.	RECOMENDACIONES	46
6.1	RECOMENDACIONES POR OBJETIVOS	46
6.2	RECOMENDACIONES GENERALES	47
7.	BIBLIOGRAFIA	48
8.	ANEXOS	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Rendimiento de materia seca (MS) y su contribución en N,P,K en un cultivo en callejones de madreado con dos cosechas de maíz en Nigeria (dos años de plantado).....	6
2.	Valor nutritivo de <i>Gliricidia sepium</i>	6
3.	Plagas insectiles y enfermedades del madreado.....	11
4.	Taxonomía de los fitoplasmas.....	12
5.	Tiempo y condiciones de almacenamiento dados a la muestras desde su recolección a extracción.....	24
6.	Iniciadores.....	25
7.	Procedencias incluidas en el estudio de síntomas.....	28
8.	Niveles de severidad de la EHPG.....	29
9.	Arboles usados en el estudio de transmisión por estacas.....	30
10.	Concentración de ADN por los dos métodos de extracción.....	33
11.	Comparación de la intensidad de banda, método Harrison y Doyle y Doyle.....	33
12.	Resultados de los tipos de manejo	34
13.	Mezcla para reacciones de PCR de 25 µl.....	35
14.	Temperaturas de ligamiento.....	35
15.	Tiempo de corrida para diferentes voltajes.....	36
16.	Resultados de las pruebas de PCR a la fauna insectil del madreado.....	37

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Distribución del madreado en América.....	1
2.	Arbol de madreado.....	8
3.	Hoja madura.....	8
4.	Inflorescencia del madreado.....	8
5.	Vainas y semillas del madreado.....	9
6.	Plántulas de madreado.....	9
7.	Cerca viva de madreado.....	10
8.	Abono verde de madreado, follaje usado como cobertura.....	10
9.	Microfotografía electrónica de cuerpos de fitoplasmas del floema de soya.....	13
10.	Fotografía electrónica del fitoplasma del amarillamiento del aster.....	13
11.	Síntomas de la enfermedad de la hoja pequeña de la Gliricidia.....	17
12.	Secuencia meta e iniciadores.....	19
13.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	21
14.	Proceso de extracción y amplificación de ADN de insectos.....	27
15.	Sistema de evaluación de la intensidad de la banda. A= Banda fuerte B= Banda moderada C= Banda débil.....	30
16.	Muestra 7 = Arbol con síntomas severos.....	31
17.	A- Muestra 1: árbol asintomático (Pantanal 22) PCR directo P1 y P7 B- Muestra 1: árbol asintomático (Pantanal 22) PCR anidado PP/GLI f y PP/GLI r.....	31
18.	Gel de agarosa al 1% de concentración.....	36

19.	Distribución de las intensidades de bandas para cada nivel de la enfermedad.....	38
20.	Frecuencia de aparición de diferentes síntomas en árboles positivos para el ADN del fitoplasma.....	40
21.	Gel de plántulas provenientes de semillas de árboles enfermos.....	43
22.	Gel de plántulas provenientes de semillas de árboles enfermos.....	43

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Protocolos de PCR utilizados en el estudio.....	51
2.	Método de extracción de AND.....	59
3.	Iniciadores utilizados en el estudio.....	62
4.	Sistema de evaluación de la enfermedad.....	65
5.	Datos de todas las pruebas.....	66
6.	Glosario de biotecnología.....	70

1. INTRODUCCION

1.1 PROBLEMATICA DEL MADREADO

El madreado (*Gliricidia sepium*) es un árbol originario de las zonas áridas y subhúmedas de Mesoamérica. Tiene un amplio rango de usos, como cercas vivas, sombra para otros cultivos, producción de combustible, medicina botánica, rodenticida, abono orgánico y forraje proteico para rumiantes en épocas secas. El madreado tiene un alto impacto ecológico, pues por sus características de rápido establecimiento y crecimiento, su resistencia a condiciones de suelo pobre, y a su capacidad de rebrote después de un corte o quema; es una planta colonizadora de sitios cuya vegetación original ha sido destruida por causas naturales (Gómez *et al.*, 1997; Stewart *et al.* 1996; CATIE, 1991). Todas estas cualidades han hecho que el madreado sea un árbol importante para los agricultores de Mesoamérica que lo han utilizado desde tiempos precolombinos. Por su utilidad, este árbol ha sido introducido a numerosas regiones fuera de su zona de origen, encontrándose actualmente en todas las áreas tropicales y subtropicales de América, Asia y Africa (CATIE, 1991). En 1992, se reporta en La Soledad, Honduras síntomas de una enfermedad desconocida en el madreado. Posteriormente síntomas similares fueron observados en otros lugares de Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y México (Kenyon *et al.*, 1996). Estos síntomas incluyen amarillamiento, ramilletes de hojas reducidas, distorsión foliar, proliferación de brotes y muerte regresiva de ramas. Al síndrome se le dio el nombre de "Enfermedad de la hoja pequeña de la *Gliricidia*" (EHPG), debido a su característica más notoria, la cual es una reducción del tamaño de los foliolos. Por el tipo de síntomas, se le asoció con una infección por fitoplasmas, lo cual fue posteriormente confirmado a través de técnicas moleculares para la detección de ADN. La distribución actual de la enfermedad, unida al hecho que los agricultores no reportan su presencia en años anteriores, sugieren que se esta expandiendo (Kenyon *et al.*, 1996). La muerte de arboles jóvenes y el gradual marchitamiento de árboles adultos, representan una amenaza agravada por la escasa información sobre la enfermedad y sus formas de transmisión, y por la actitud de la población, ya que no la asocian a una enfermedad infecciosa debido a la lentitud del declinamiento del árbol. En la actualidad existen miles de kilómetros de cercas vivas y numerosas plantaciones de madreado tanto dentro como fuera de América, con fines de obtención de leña, madera, forraje y mejoramiento del suelo, entre otros. Por falta de conocimiento de la enfermedad y su manejo se podría correr el riesgo de perder la inversión realizada en estas áreas.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Solo conociendo la biología y ecología de un patógeno se pueden desarrollar estrategias apropiadas para su manejo. Por esta razón se necesita una prueba confiable de diagnóstico que permita la realización de estudios en estas áreas. Debido a la naturaleza del patógeno, no puede ser detectado por los medios de diagnósticos convencionales. Por esta razón se requiere el uso de técnicas moleculares para su detección. La manera más específica de diagnosticar un patógeno es detectando directamente su ácido nucleico (ADN). Los niveles de ADN *in vivo* son demasiado bajos para ser detectados. Por esto se utiliza el método PCR (reacción en cadena de la polimerasa), técnica que se usa para amplificar el ADN del patógeno y permitir su identificación. Adicionalmente, cada año se descubren nuevas enfermedades causadas por fitoplasmas, muchas de ellas anteriormente atribuidas a virus (Castaños, 1992) por lo que la detección y estudio de los fitoplasmas se ha convertido en una rama importante de la fitopatología. El desarrollo de un modelo de detección para el fitoplasma de la hoja pequeña y los estudios de su epidemiología, servirán de experiencia y modelo para futuros estudios sobre cualquier enfermedad causada por este grupo de patógenos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Establecer un sistema de diagnóstico por PCR para la detección del ADN del fitoplasma agente causal de la enfermedad de la Hoja Pequeña de la *Gliricidia*, que permita fortalecer la capacidad de diagnóstico molecular en Zamorano. Con el sistema establecido estudiar la epidemiología de la enfermedad y específicamente las formas de transmisión.

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1.- Optimizar un sistema de PCR para lograr una detección confiable del patógeno de la EHPG.
- 2.- Determinación de posibles vectores de la EHPG a través de pruebas por PCR a la fauna insectil del madreado.
- 3.- Realizar estudios de transmisión de la EHPG a través de propagación vegetativa y semillas.
- 3.- Caracterizar los síntomas de la enfermedad, a través de establecer una relación entre la concentración del patógeno y la manifestación de los síntomas.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 EL MADREADO

2.1.1 Clasificación botánica.

Reino.....	Vegetal
Subreino.....	Embryophyta
Phyllum.....	Tracheophyta
Subphyllum.....	Pteropsida
Clase.....	Angiospermae
Subclase.....	Dicotyledoneae
Orden.....	Leguminales
Familia.....	Leguminosae
Subfamilia.....	Papilionoideae
Género.....	<i>Gliricidia</i>
Especie.....	<i>sepium</i> (Jacquin) Kunth

Existen dos especies más del género *Gliricidia*, las cuales son menos utilizadas. *Gliricidia maculata*, de flores blancas y hojas pequeñas y redondeadas, nativa de la península de Yucatán, México, y *Gliricidia guatemalensis*, la cual crece a altitudes mayores (1500-2000 msnm) de flores de color rojo púrpura (Gómez, 1997).

2.1.2 Origen y distribución

El madreaje (madero negro, rratón, madreacao) es probablemente originario de la región de Mesoamérica, desde el sur de México hasta Panamá. Por sus variados usos esta planta fue semidomesticada desde tiempos precolombinos, introduciéndose y nativisándose en muchas regiones tropicales de América, como se puede observar en la Figura 1.



Figura 1. Distribución del madreaje en América.
Fuente: Universidad de Cornell, (1998).

Su rango de distribución natural se encuentra entre los 7° 30' y 25° 30' latitud norte (CATIE, 1991). Actualmente tiene una distribución pantropical, resultado de diferentes introducciones que se han dado desde la época de la colonia. La primera introducción del madreño fuera de América se dio a principios de los 1600's, cuando los españoles la llevaron a las Filipinas y al Caribe para servir de sombra al cacao y más tarde al café. En los años 1800's fue llevada a Sri Lanka como sombra para el cultivo del té. La base genética de las poblaciones de Sri Lanka resulta muy estrecha ya que se cree que las semillas con las que se estableció procedían de un solo árbol de la isla Trinidad. De Sri Lanka se extendió hacia Indonesia, Malasia y Tailandia. En los inicios de los 1900's fue introducida al oeste de África y Uganda, para sombra de otros cultivos. 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 madreño en América tropical que fueron introducidas en 55 países de regiones tropicales, lo que ha causado una alta demanda por sus semillas (Stewart *et al.* 1996)

El madreño crece bien en temperaturas de 22-30° C, con precipitación de 800-2,300 mm al año con periodo seco y altitudes de 0 a 1600 msnm (Gómez, 1997; Boster, 1998). Un reporte del CATIE (1991) cita que el madreño ha sido probado con éxito fuera de su rango natural, sin embargo en áreas carentes de una estación seca bien definida no es capaz de reproducirse sexualmente y por tanto debe ser propagada por estacas (Stewart *et al.*, 1996).

Se desarrolla en una amplia variedad de suelos, incluidos suelos ácidos y erosionados (Gómez, 1997). En su área de distribución natural se encuentra predominantemente en suelos de origen volcánico, usualmente superficiales y compactados por la agricultura de quema. Aunque la ecología del madreño no requiere fuego, es muy tolerante a quemas y los árboles rebrotan rápidamente, mientras que otras especies son severamente dañadas, por lo que el madreño constituye la especie recolonizadora por excelencia en las zonas del trópico seco de Mesoamérica (Stewart *et al.* 1996). También presenta un buen desarrollo en dunas de arena costera, bancos ribereños, vertisoles negros y planicies inundadas (CATIE, 1991). El madreño no tolera suelos muy ácidos con alta saturación de aluminio y presenta un pobre desarrollo en áreas altamente compactadas por actividades ganaderas (Stewart *et al.* 1996).

2.1.3 Descripción botánica

El madreño es una leguminosa arbórea, perenne, caducifolia, de raíces profundas. Crece hasta los 15 m de altura y 40 cm de diámetro. Presenta una copa irregular y extendida (figura 2). Las hojas son compuestas, imparapinadas, alternas, con un largo de 15 a 25 cm. Los folíolos son opuestos con un folíolo terminal (Gómez, 1997). Tienen forma oblonga terminada en punta y su tamaño se incrementa hacia el extremo distal de la hoja (figura 3). Las flores se encuentran en inflorescencias racimosas. Son de color rosado a púrpura pálido (Stewart *et al.* 1996) de una longitud aproximada de 2 cm (figura 4). Las vainas son dehiscentes, aplanadas, verde amarillentas inmaduras y café amarillento al madurar con 3 a 8 semillas lenticulares de color amarillo ocre (CATIE, 1991; Gómez, 1997) (figura 5). La germinación de las semillas es alta, sobre el 90% (figura 6). La semilla

semilla puede conservar su viabilidad hasta por 4 años a 5 °C en un frasco hermético de vidrio (CATIE, 1991). Según Steward *et al.* (1996) a una temperatura de 4 °C y contenido de humedad de 6-10%, la semilla retiene hasta el 90% de germinación por mas de 10 años. La madera es dura, pesada y fuerte. El duramen es de color amarillo a café, con marcas finas y pálidas lo que la hace muy decorativa cuando aserrada. Es altamente resistente a las termitas. Por su dureza es difícil de aserrar, pero esta misma dureza proporciona gran resistencia a los muebles elaborados con ella (CATIE, 1991).

2.1.4 Usos agroforestales del madreado.

2.1.4.1 Producción de leña. El madreado es una especie con gran potencial para producción de leña por su habilidad de resistir cortes repetidos, rápido crecimiento y buenas características para quemar. La madera es pesada, arde lentamente, sin chispas y con poco humo. Produce buena brasa. Los árboles manejados en un sistema de cortes periódicos producen leña de pequeño diámetro, la cual es más fácil de secar y manejar (Stewart *et al.* 1996). Aunque cerca del 90% del consumo energético de los hogares en los países en desarrollo proviene de la leña, son raras las plantaciones de arboles para el propósito de producción de leña. Usualmente, el cultivo de árboles por los agricultores es para la obtención de otro producto de mayor valor, y la leña es un producto secundario del manejo de la plantación (FAO, 1986).

2.1.4.2 Cercas vivas. Es el uso más común del madreado en América Central. Usualmente se planta alrededor de terrenos de pastura y para delimitar las propiedades (figura 7). Generalmente los árboles son establecidos de estacas y son podados periódicamente dependiendo del uso secundario que se le dé: para forraje cada 2 a 3 meses, o cada uno a tres años para leña o estacas. Una cerca podada cada 6 meses da un rendimiento de casi 3 t en 1 km de cerca (Stewart *et al.*, 1996).

2.1.4.3 Abono verde. El uso de abono verde reporta numerosos beneficios para el suelo tales como: incremento de la materia orgánica y nitrógeno, mejoramiento de las características físicas del suelo como aireación y drenaje. Cuando es usado como cobertura (figura 8), proporciona control de malezas, reducción de la erosión, reducción de la temperatura del suelo y conservación de la humedad (Stewart *et al.*, 1996). El madreado ha demostrado ser un sistema fácil y barato para la producción de follaje para el abono verde cuando se utiliza en setos en los contornos de laderas, y cultivo en callejones o hileras en combinación con cultivos alimenticios como frijol y maíz (CATIE, 1991). La contribución del abono verde de madreado al mejoramiento del suelo en un sistema de siembra en callejones en un cultivo de maíz puede observarse en el cuadro 1.

Cuadro 1. Rendimientos en materia seca (MS) y su contribución en N,P,K, en un cultivo en callejones de madreado con dos cosechas de maíz en Nigeria (dos años de plantado).

Podas	MS	N		P		K	
	Kg/ha	Kg/ha	%	Kg/ha	%	Kg/ha	%
Hojarasca	1263	23	1.81	2	0.17	7	0.57
1er poda	3120	126	4.04	8	0.24	86	2.76
2da poda	2667	119	4.49	7	0.27	75	2.83
3er poda	3217	144	4.47	8.9	0.27	92	2.86
4ta poda	1811	88	4.86	5	0.27	52	2.86

MS = Materia seca

N = Nitrógeno

P = Fósforo

K = Potasio

Fuente: Yamoá *et al.* (1986; citado por CATIE, 1991)

2.1.4.4 Forraje. El madreado es una planta de alto potencial productivo de follaje para su utilización como forraje. Mediante la fijación de nitrógeno, la hojarasca y los residuos de cosecha que regresan al suelo, es un sistema de reciclaje de nutrientes, por lo que la fertilidad y la producción no decaen aun con más de 6 años de cosecha como forraje (Gómez, 1997). Aunque el madreado es una planta decidua, puede obtenerse forraje fresco por rebrote en la estación seca si la planta es manejada con un sistema de cortes periódicos. El forraje de madreado por su alto valor nutritivo (ver cuadro 2) resulta un valioso suplemento para rumiantes. Sin embargo, se han encontrado algunos problemas de aceptación por el ganado. Se cree que este rechazo se debe al olor más que al sabor de las hojas. Este problema desaparece si las hojas se dejan marchitar por 24 horas antes de suministrárselas al ganado. En los no rumiantes el suministro de madreado como parte de la dieta presenta problemas de toxicidad (Stewart *et al.* 1996; Gómez, 1997)

Cuadro 2. Valor nutritivo de *Gliricidia sepium*

Componente	Rango
Energía total	4600-500
Digestibilidad in vierto %	48-77
Proteína cruda %	18-30
Fibra ácido detergente %	18-34
Fibra neutro detergente %	27-50
Fibra cruda %	13-30
Extracto etéreo %	4-8
Cenizas %	6-10
Calcio %	1-2
Fósforo %	0.2-0.3

Fuente: Glover (1989; citado por Stewart *et al.*, 1996)

2.1.4.5 Sombra y soporte para otros cultivos. El madreaje es utilizado como sombra en cultivos como té, café y cacao. Las características de su follaje permiten una sombra ligera, ideal para estos cultivos, además de que su resistencia a podas repetidas permiten una manipulación de esta para adaptarla a las diferentes épocas y etapas del cultivo. Los rastrojos resultantes de la poda pueden ser usados como cobertura, además de su capacidad de fijación de nitrógeno representa una ventaja adicional para el cultivo. Por su facilidad de establecimiento, y resistencia a podas de formación, es utilizada también como soporte para cultivos trepadores, como pimienta negra, vainilla y pitahaya (Stewart *et al.*, 1996).

2.1.4.6 Otros usos. Por su dureza y resistencia los troncos y ramas del madreaje son ampliamente utilizados para la construcción de viviendas y la elaboración de mangos de herramientas (Boster, 1998). También es usada como medicina tradicional como tratamiento contra enfermedades fungosas en la piel. Una de sus nombres comunes, matarratón, deriva de su uso como rodenticida, elaborándose cebos con las hojas molidas del madreaje mezcladas con arroz cocido. Schroth *et al.* (1995; citado por Stewart, 1996) encontró que en cultivos de maní intercalado con madreaje la incidencia de *Puccinia arachidis* era significativamente menor que en parcelas de maní solo. En las regiones rurales de Mesoamérica puede encontrarse el uso de las flores en alimentación humana, este uso sin embargo, esta ya casi extinto (Whellock, 1998).

2.1.5 Propagación

2.1.5.1 Propagación asexual. Es el sistema más usado en Centroamérica, especialmente para el establecimiento de cercas vivas, sombra y soporte. Se recomienda cortar las estacas al final del verano cuando el árbol no tiene hojas. Las mejores estacas para la propagación son las provenientes de ramas maduras, de diámetro de 4 a 12 cm y de 30 o más cm de largo. La edad de la rama de la cual se obtienen las estacas debe estar entre los 18 a 24 meses. Las estacas deben de ser plantadas lo mas pronto posible después de ser cortadas. Debe evitarse el desgarrar o golpes de la corteza (CATIE, 1991). Durante el periodo de enraizamiento las estacas son muy susceptibles a patógenos fungosos del suelo, por lo que debe evitarse la humedad excesiva en el suelo y en las heridas.

2.1.5.1 Propagación sexual. En los sistemas de producción de forraje es preferible establecer las plantaciones con semilla, ya que estas desarrollaran un sistema radicar mas profundo que le permitirá resistir mejor la cosecha de forraje y rebrote aun en periodos secos. La semilla se obtiene de las vainas de color amarillo pardo, justo antes de que ocurra la dehiscencia. Pueden almacenarse por un periodo de alrededor de 4 años a una temperatura de 4 °C y con un contenido de humedad de 12 –14 % sin perder la viabilidad. La profundidad de siembra debe no ser mayor de 2 cm. Si se utiliza un sistema de siembra en vivero el trasplante puede realizarse a los 2-3 meses de edad. Usualmente el porcentaje de germinación es mayor al 90% (Gómez, 1997).

2.1.6 Plagas insectiles y enfermedades

Las plagas reportadas por la literatura se encuentran detalladas en el cuadro 3.

Cuadro 3: Plagas insectiles y enfermedades del madreado.

Agente causal	Parte atacada	Daño
Plagas insectiles		
<i>Azeta versicolor</i> (Lepidoptera, noctuidae)	Follaje desarrollado	Defoliador
<i>Omiodes martynatis</i> (Lepidoptera, pyralidae)	Follaje desarrollado	Defoliador
<i>Phyllonorictor sp.</i> (Lepidoptera, grascilaridae)	Follaje desarrollado	Minador
<i>Aphis spp</i>	Brotos jóvenes	Chupador
<i>Spodoptera spp.</i>	Plántula	Cortador
<i>Empoasca hastosa</i> (Homoptera, cicadellidae)	Follaje	Chupador
<i>Agrotis spp.</i>	Plántula	Cortador
Enfermedades fungosas		
<i>Cercosporium gliricidiasis</i>	Follaje maduro	Manchas redondas café claro, defoliación
<i>Colletotrichum gloesporoides</i>	Follaje	Manchas redondas café oscuro, defoliación
<i>Sirosporium gliricidiae</i>	Follaje	Manchas irregulares, amarillas en el haz, café en el envés
<i>Cladosporium sp.</i>	Follaje	Defoliación
<i>Sphaceloma sp.</i>	Follaje, peciolos y tallos	Lesiones color café
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Follaje y tallos jóvenes	Parches necróticos y marchitez de hojas
<i>Botryosphaeria sp.</i> <i>Nectria sp.</i> <i>Phomopsis spp.</i>	Tallos y ramas	Muerte regresiva
<i>Armillaria mellea</i>	Cuello	Pudrición
<i>Rosellinia pepo</i>	Raíces	Pudrición
<i>Botrydiplodia theobromae</i>	Raíz	Pudrición
<i>Sphaerostilbe repens</i>	Raíz	Pudrición maloliente
<i>Merimbla sp.</i> <i>Fusarium pallidoroseum</i>	Toda la planta	Muerte regresiva, amarillamiento y marchitez
Otras enfermedades		
Infecciones virales	Enfermedad sistémica	Enrollamiento de hojas, amarillamiento, mosaico, distorsión foliar
Fitoplasma (<i>Candidatus Phytoplasma gliricidiora</i>)	Enfermedad sistémica	Reducción del tamaño de los foliolos, amarillamiento, distorsión foliar, proliferación de brotes, muerte regresiva.

2.2 FITOPLASMAS

2.2.1 Historia

Los fitoplasmas son organismos que carecen de pared celular verdadera y la habilidad para sintetizar las sustancias requeridas para formarla. Fueron observados por primera vez por un grupo de científicos japoneses integrado por Doi, Teranaka, Yora y Asuyama en el floema de plantas con síntomas de virosis. Desde entonces se ha comprobado que muchas enfermedades anteriormente atribuidas a virus y más de 200 enfermedades nuevas son causadas por estos organismos (Castaño, 1994).

2.2.2 Taxonomía

Dada la dificultad que presenta el estudio de estos organismos, su taxonomía aun es incompleta. Debido a su parecido con los micoplasmas presentes en animales, originalmente se les clasificó como "Organismos similares a micoplasmas"(MLO). Actualmente se considera que los MLO's son organismos que poseen características propias diferentes a los verdaderos micoplasmas, por lo que se les ha dado la denominación de fitoplasmas.

Cuadro 4: Taxonomía de los fitoplasmas

Clase	Orden	Familia	Género
Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma</i>
			<i>Ureaplasma</i>
		Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma</i>
		Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>

Fuente: Castaño, 1994.

2.2.3 Características

Los fitoplasmas son microorganismos procariotas restringidos a los tubos cribosos del floema de las plantas (figura 9), están rodeados por una membrana simple formada por tres láminas. Su contenido celular está compuesto de citoplasma, ribosomas y filamentos de material nuclear de ADN. Tienen genomas que van de 600 a 1300 kpb, lo cual les confiere capacidades metabólicas muy limitadas (Raychaudhuri, 1998). Son altamente paleomórficos variando desde una forma cocoide a ovoide e incluso irregularmente filamentosa (ver figura 10). Su tamaño varía de 50 nm hasta diez μ m. Son organismos gram negativos y presentan sensibilidad a la tetraciclina (Castaño, 1994).

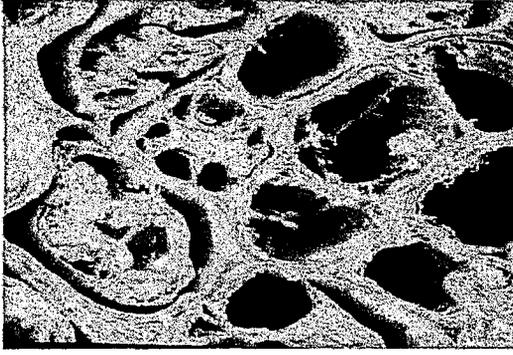


Figura 9. Microfotografía electrónica de cuerpos de fitoplasmas en el floema de soja. Fuente: Universidad de Wisconsin, 1999.



Figura 10. Fotografía electrónica del fitoplasma del amarillamiento del aster. Fuente: Universidad de Wisconsin, 1999.

Pueden reproducirse mediante gemación y fisión binaria, no producen esporas. Los fitoplasmas no han podido ser cultivados en medio nutritivo artificial por períodos largos, ni se ha podido purificar el organismo en estado infectivo. Debido a este hecho, no han podido usarse pruebas rigurosas para demostrar su patogenicidad a través de los postulados de Koch. Sin embargo se han usado pruebas indirectas para comprobar que los fitoplasmas son capaces de causar enfermedades en las plantas, como la presencia del patógeno en plantas enfermas pero no en sanas, los efectos adversos en las células invadidas por fitoplasmas y sus células vecinas, el desarrollo de la enfermedad después de efectuar transmisión por insectos vectores de fitoplasmas o injerto de tejido infectado y la remisión de síntomas al aplicarse tetraciclina y tratamiento térmico (Mount y Lacy, 1982).

2.2.4 Síntomas causados por fitoplasmas

Los síntomas comúnmente asociados con enfermedades causadas por fitoplasmas son: reducción del crecimiento, producción de hojas pequeñas y distorsionadas, acortamiento entre nudos, proliferación de retoños, amarillamiento y muerte regresiva. Según Maxwell y Maxwell, (1998) la **fasciculación** es otro síntoma característico. Sin embargo, todos estos síntomas pueden ser causados también por otros patógenos como virus o condiciones abióticas, o puede darse el caso de que una planta infectada no presente síntomas, por lo que la sintomatología se considera una característica de diagnóstico no confiable (Castaño, 1994). Los síntomas anteriormente mencionados pueden tener su origen en tres diferentes mecanismos (Mount y Lacy, 1982):

- 1) Bloqueo físico de los poros del floema por deposición de tejido calloso u oclusión directa por los fitoplasmas.
- 2) Alteración del balance de reguladores del crecimiento ya sea por la dificultad del transporte de los mismos por los conductos bloqueados, inhibición de la síntesis de la ácido indolacético oxidada debido a polifenoles producidos por los fitoplasmas (Guozhong y Xijin 1996) o a la síntesis de fitohormonas por parte del patógeno (Mount y Lacy, 1982).

- 3) Producción de toxinas por los fitoplasmas o por la planta en respuesta a la presencia de los mismos.

2.2.5 Mecanismos de resistencia

Se ha observado gran variación de la severidad y frecuencia de la infección, la cual se puede dar entre diferentes variedades de una misma especie e incluso entre plantas de igual variedad. Las causas de esta diferencia pueden deberse a dos mecanismos:

1. Klenducidad: se define como la falta de enfermedad en una planta genéticamente susceptible debido al efecto que tiene la planta sobre el vector (Castaño, 1994). Debido a que los fitoplasmas no son transmisibles mecánicamente y por tanto requieren un vector para su diseminación una planta no apetecible como alimento a los vectores no adquirirá la enfermedad.
2. Resistencia: el movimiento de los fitoplasmas dentro de la planta está restringido a los conductos del floema de la planta, pasando de una célula de floema a otra a través de los poros del floema. Por lo tanto el tamaño de estos puede afectar la velocidad en que los fitoplasmas pasan de célula a célula. Teóricamente en una planta con poros del floema lo suficientemente pequeños para impedir o retrasar el paso del patógeno, este sería incapaz de invadir sistémicamente la planta y daría tiempo para permitir la senescencia y caída del tejido en el cual se dio el punto de inoculación, por lo tanto esta planta presentaría algún grado de resistencia de campo (Mount y Lacy, 1982). Puede existir también resistencia fisiológica de la planta a los fitoplasmas. Se ha propuesto que la oclusión vascular es un mecanismo de defensa común en las plantas contra los patógenos vasculares (Mount y Lacy, 1982). En el caso de los fitoplasmas, el depósito de tejido calloso en los poros del floema podría ser un mecanismo de defensa para reducir la movilidad de los fitoplasmas.

2.2.6 Transmisión

Debido a su incapacidad de transmitirse mecánicamente y al hecho de que no forman esporas u otras estructuras infectivas capaces de propagarse de una planta a otra, los fitoplasmas sólo pueden ser transmitidos por insectos vectores, injertos, o un puente biológico con una planta parásita como cuscuta (*Cuscuta* sp.). Dado que las dos últimas son vías artificiales, en infecciones naturales los fitoplasmas dependen casi enteramente de vectores homópteros para su diseminación. Los insectos que se ha comprobado que actúan como vectores en enfermedades causadas por fitoplasmas son principalmente chupadores del floema que incluyen saltahojas de la subfamilia Deltocephalinae, psyllidos y cercopidos. También se han reportado fulgóricos, piesmidos y áfidos (Harris, 1979; citado por Mount y Lacy, 1982). En las enfermedades por fitoplasmas estudiadas hasta el momento, se ha detectado la presencia del patógeno en los embriones de las semillas pero no se ha comprobado la transmisión a plántulas, ya que las semillas infectadas no han resultado viables o las plantas enfermas no presentan floración y cuando lo hacen, las flores son a menudo estériles (Harrison N, 1998, comunicación personal)¹. Los fitoplasmas

¹ Dr. Nigel Harrison, Universidad de Florida

son circulatorios dentro de sus insectos vectores. Una vez que el insecto ingiere el patógeno este invade sus células hasta alcanzar la hemolinfa, circulando en el cuerpo del vector y multiplicándose en tejidos adiposos, neurales y salivarios, hasta que es inyectado en plantas sanas a través de la secreción de las glándulas salivares infectadas. El período de incubación requerido para que el insecto sea capaz de transmitir el fitoplasma varía de ocho a más de treinta días dependiendo de la especie del patógeno y del vector (Mount y Lazy, 1983). Mount y Lacy, (1982) reportan que el fitoplasma causa lesiones en el vector, que el periodo de vida de un vector infectado es menor que el de uno sano y que el 30% de las hembras infectivas eran estériles.

2.2.7 Ejemplo de una enfermedad causada por un fitoplasma : El Amarillamiento letal del cocotero.

El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad altamente destructiva del cocotero y otras palmas en las islas caribeñas del norte, Estados Unidos, México, Belize, Africa, Asia y las islas Polinesias. Dada su capacidad de rápida expansión y la alta susceptibilidad de la mayoría de las variedades de cocotero, el AL es considerado una de las mayores amenazas a la producción de coco. Solamente en Jamaica mas de cinco millones de palmas “alta de Jamaica” fueron destruidas en los 20 años después de la aparición de la enfermedad en las regiones productoras de coco. En territorio continental, la enfermedad se ha extendido más de 400 Km en ambas direcciones desde que se reportó por primera vez en México, y continúa su avance a través de Belize. El AL se reportó por primera vez en Honduras en 1994. Ha causado el declinamiento de las poblaciones de *Coccos nucifera* var. “Alto Atlántico”. Llegó a la Costa Atlántica de Honduras pocos años después, donde está provocando gran cantidad de daños. Se cree que el AL y otras enfermedades relacionadas son causadas por fitoplasmas, ya que estos han sido encontrados consistentemente en el floema de las plantas enfermas pero no de las sanas, y el tratamiento de tetraciclina causa la remisión de los síntomas. Debido a la dificultad de cultivar estos patógenos *in vitro*, los diagnósticos se han realizado tradicionalmente a través de observación de síntomas y el microscopio electrónico. Con el uso de los métodos de biología molecular como hibridación de ADN y PCR se ha logrado la identificación de las razas del patógeno y su detección aun en tejidos con muy baja concentración del ADN del fitoplasma, como tejido de plantas leñosas perennes que sirven de hospederos alternos. El insecto que hasta el momento se considera el principal sospechoso de ser el vector del AL es *Myndus crudus*, sin embargo aun existen dudas sobre si este insecto es realmente el vector (Ohler, 1986). Existen varios paralelos entre el AL y la EHPG. Ambas son causadas por fitoplasmas y posiblemente transmitidas por un insecto vector; ambas atacan cultivos perennes con consecuencias severas. En ambos casos existe un desconocimiento sobre la enfermedad por parte de agricultores o personas relacionadas con el cultivo. Hasta el momento, la única forma viable de manejo es el uso de resistencia genética, la cual ya ha sido establecida en el caso del AL e identificadas algunas procedencias de madreado resistentes ha EHPG para las condiciones de Zamorano.

2.3 ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUEÑA DE LA GLIRICIDIA

2.3.1 Antecedentes

En 1992 se descubrió en La Soledad, Honduras, una enfermedad que causaba síntomas característicos de un fitoplasma (Lenné y Boa, 1993). Estudios posteriores en 1995 confirmaron la amplia distribución de esta enfermedad, siendo observada en otras regiones de Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y México. Estas observaciones fueron cortas y no se realizó una descripción sistemática de los síntomas ni del impacto de la enfermedad. De 1995 a 1997 una investigación realizada por L. Kenyon, R. Black, P. Doyle y E. Boa determinó a través de tres métodos indirectos a un fitoplasma como el posible agente causal de dicha enfermedad. Los métodos utilizados fueron los siguientes: (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 genoma de fitoplasma a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Actualmente se considera que el patógeno es un fitoplasma muy similar al fitoplasma causante de la escoba de bruja del frijol gandul (*Cajanus cajan*). El fitoplasma del madreaje aun no ha sido reconocido como una especie propia, por lo que hasta la realización de las pruebas necesarias se le denomina *candidatus Phytoplasma gliricidiora* (Harrison N, 1998 Comunicación personal). Como parte de este mismo estudio se realizaron pruebas de transmisión del patógeno a través de semilla y estacas. En estas pruebas las semillas recolectadas de árboles enfermos tuvieron un bajo porcentaje de germinación y fueron atacadas por enfermedades fungosas, muriendo poco después. Los brotes de las estacas que enraizaron eran débiles y murieron poco después de formarse. También se realizó recolección de malezas asociadas a las plantaciones de madreaje con el objetivo de identificar hospederos alternos del fitoplasma. Debido a la cantidad insuficiente de material no se pudo realizar la identificación de las especies recolectadas. En 1997, Jordán realizó un estudio en el cual se compararon algunas procedencias de madreaje para detectar resistencia genética a la EHPG. De este estudio se determinó que la resistencia a la enfermedad variaba entre las diferentes procedencias. Se encontró que las procedencias Guayabillas (Honduras), Vaho hondo (Guatemala) y Belén (Nicaragua) tenían menor mortalidad e incidencia de síntomas de la EHPG. También se hizo un intento de identificar al insecto vector, pero los resultados fueron inconclusos.

2.3.2. Sintomatología

La sintomatología de la enfermedad varía en severidad y clase de síntomas dependiendo del sitio, estado fisiológico y la etapa de crecimiento en que se encuentra la planta. Los síntomas que se presentan en las plantas son: amarillamiento, distorsión de la hoja, reducción del tamaño de los folíolos, proliferación excesiva de brotes de yemas secundarias y muerte regresiva de las ramas severamente infectadas (figura 11). De estos el síntoma más característico es el tamaño anormalmente pequeño de la hoja, de donde la enfermedad toma el nombre de "hoja pequeña de la Gliricidia".

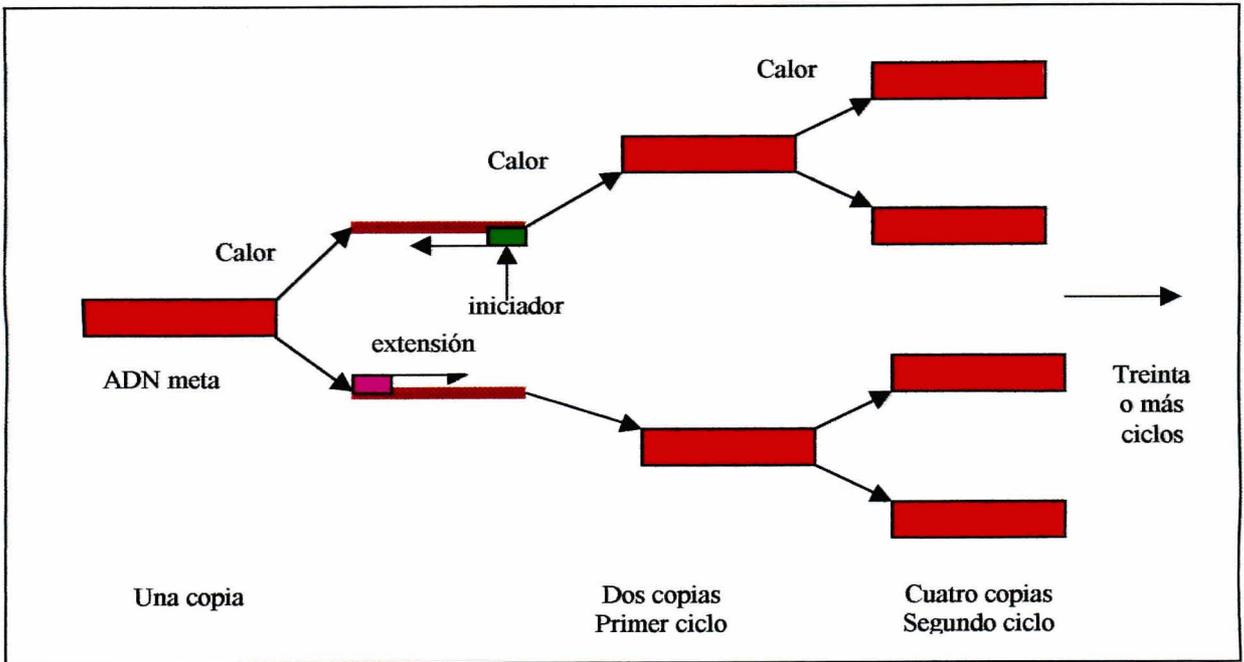


Figura 13. Reacción en cadena de la polimerasa

El proceso de PCR presenta varios puntos claves cuya variación afecta significativamente el éxito en la obtención de producto. Estos factores determinan si se obtiene o no el producto, y en caso de obtenerse, si este corresponde realmente a la secuencia específica de los iniciadores usados o si es un producto no específico, producto de la amplificación de una secuencia de ADN no enteramente complementaria a los iniciadores. Los factores más importantes a tomarse a consideración son:

- 1) La calidad y concentración del ADN de la muestra (**templete**). La concentración recomendada de ADN en el templete es de mínimo de 50 hasta alrededor de 500 ng por μl de ADN total. En caso de existir una concentración mas baja de ADN, es posible que la cantidad de producto no se lo suficiente para ser visualizado. Al contrario, una concentración muy alta provoca que al realizarse la electroforesis no se obtenga una banda definida de un tamaño específico, sino una mancha dispersa que dificulta el diagnóstico.
- 2) La presencia de compuestos inhibidores: Algunos compuestos presentes en la muestra son capaces de inhibir la reacción de PCR, si no son eliminados durante el proceso de extracción.
- 3) Concentración de magnesio en la mezcla de PCR: El magnesio es indispensable para que una reacción de amplificación se lleve a cabo, ya que la enzima taq polimerasa es dependiente del magnesio para activarse. Además, el magnesio interactúa con los fosfatos libres presentes en la reacción. Un exceso de magnesio provoca la formación de producto no específico, muy poco resulta en la falta de formación de producto. La

El proceso de PCR se compone de tres pasos esenciales:

Desnaturalización:

el ADN extraído de la muestra analizada es calentado a una temperatura de aproximadamente 94° C, lo que provoca que las dos cadenas complementarias se separen.

Ligamiento:

La temperatura disminuye a 56° C, con lo que los iniciadores, por ser complementarios de un fragmento de la secuencia meta, se unen a este fragmento.

Extensión:

Se aumenta la temperatura a 72° C, permitiendo que una enzima llamada **ADN polimerasa** (Taq polymerase ®) acople bases libres, que se encuentran en el medio, a sus bases complementarias de las cadenas de la secuencia meta. Es decir, la enzima sintetiza nuevo ADN pero solo de la secuencia meta (figura 14).

Al conjunto de estos tres pasos se le llama un **ciclo de amplificación**. Después de cada ciclo, la cantidad de ADN es el doble de la cantidad inicial, es decir, se amplifica de manera exponencial. Usualmente se requieren de 28-30 ciclos para obtener suficiente ADN para ser visualizado por medio de electroforesis (figura 13). Al ADN amplificado se le conoce como **producto de PCR**.

Para aumentar la sensibilidad o la especificidad de la prueba se puede realizar una reamplificación de este producto, utilizando iniciadores de menor tamaño que los utilizados en el primer PCR. En este caso, se refiere al primer proceso como **PCR directo** y a la reamplificación como **PCR anidado** (nested PCR). Para visualizar los resultados del proceso se utiliza la técnica de **electroforesis horizontal** que opera bajo el principio de la atracción entre dos cargas opuestas de energía. Se coloca la muestra amplificada en una gel de agarosa y se le aplica una corriente eléctrica. Dado que el ADN posee una carga negativa, emigra hacia el polo positivo de la corriente. La velocidad de este movimiento depende del tamaño y la forma de la cadena de ADN.

Usualmente se refiere a este proceso de migración como “correr una muestra”. Como el largo del producto de PCR es uniforme en tamaño, forma una bandas de tamaño determinado que pueden ser visualizadas en el gel luego de tratarla con bromuro de etidio, una sustancia que se intercala en las cadenas de ADN y fluoresce con luz ultravioleta, permitiendo así visualizar el ADN (Brown, 1998; Ausbel, 1995). El tamaño de la banda, medido en **kbp** (mil pares de bases), puede ser estimado comparándola con las bandas de un marcador molecular, que puede obtenerse comercialmente, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaños conocidos y que se corre al mismo tiempo que la muestra.

concentración usualmente utilizada es de 1.5 mM, pero esta debe ser adaptada a cada situación dentro de un rango de 0.5 a 2 mM.

- 4) Concentración de **dNTP** (deoxinucleosidos trifosfatos): Los dNTP's son las bases de las cuales esta compuesto el ADN. Son por lo tanto, un factor limitante para la cantidad de producto que se obtenga de una reacción de PCR. La concentración estándar es de 200 μ M de cada una de las cuatro bases (adenina, guanina, timina y citosina). Esta concentración puede variarse para lograr la optimización del PCR.
- 5) Temperatura de ligamiento: La temperatura de ligamiento determina la especificidad del producto obtenido. Una temperatura demasiado baja provoca que los iniciadores se unan a secuencias de bases no enteramente complementarias a ellos. La temperatura estándar es de 55° C, si se obtienen productos no específicos se eleva uno o dos grados hasta obtener el producto adecuado. La temperatura de ligamiento depende del iniciador utilizado (Schall, 1997).

2.3.2 Uso de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de la hoja pequeña del madreño

Durante la investigación realizada en el periodo 1995-97 se utilizaron tres técnicas para detectar al agente causal de la hoja pequeña. Las técnicas usadas fueron la microscopía fluorescente, inyección con oxitetraciclina y PCR. De estas técnicas, PCR demostró ser la más confiable ya que la variabilidad de la expresión de los síntomas y la distribución desinformes del patógeno en los tejidos infectados hacían confuso en diagnóstico seguro de la enfermedad. Con el método de PCR utilizando iniciadores específicos de los genes **rRNA 16S y 23S** de fitoplasmas (diseñados por el Dr. Nigel Harrison en la universidad de Florida) fue posible detectar la presencia de ADN del fitoplasma en tejido de hojas y brotes de madreño. También se realizó PCR anidado usando iniciadores **PPWB-WX** para incrementar la sensibilidad de la prueba. Con estos procedimientos se obtuvieron resultados positivos en arboles con variación de síntomas, partes asintomáticas de arboles enfermos y de plántulas de semillas las cuales habían estado expuestas a infección natural pero que aun no presentaban síntomas. Los protocolos utilizados para estos análisis fueron desarrollados por el Dr. Nigel Harrison, Universidad de Florida (Kenyon *et al.*, 1996). Estos protocolos pueden observarse en el anexo 1.

300892

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 OPTIMIZACION DE EL METODO PCR

3.1.1 Factores críticos del proceso

No existe un conjunto de condiciones que se apliquen a todas las reacciones de PCR, por lo que es necesario optimizar los factores críticos del proceso para las diferentes condiciones experimentales en que se realice la reacción de PCR. En este estudio, para lograr la optimización del método se realizaron múltiples reacciones variando diferentes factores críticos en cada una sus etapas. Se varió solo un factor a la vez. Los protocolos base para la reacción están incluidos en el Anexo 1.

3.1.1.1 Fase de extracción de ADN. Esta fase es una de las más importantes dentro del proceso ya que de ella depende la cantidad y calidad del ADN que se usara en la reacción. El método de extracción consiste básicamente en una serie de pasos de disolución en cloroformo y precipitación con alcohol del ADN de la muestra, siendo ésta tejido de brotes jóvenes de la planta que se quiere analizar. Estos pasos de disolución y precipitación buscan separar el ADN del resto de compuestos contenidos en el tejido (clarificación), los cuales pueden intervenir en la reacción de PCR degradando y bajando la cantidad de ADN que se pone en ella o actuando como inhibidores de la misma. Los métodos que se probaron en este estudio fueron:

- a) El método de extracción de ADN del tejido de la muestra.
- b) El tiempo máximo que puede ser almacenada la muestra antes de la extracción de ADN.

Los métodos de extracción que se probaron fueron el método con CTAB con doble proceso de clarificación y el método CTAB modificado por Doyle y Doyle. El método de doble clarificación fue el recomendado para el trabajo con tejido de madreado; sin embargo el método Doyle y Doyle presentó las ventajas de ser más sencillo de realizar y requerir menos tiempo. Para definir el mejor método se recolectaron 6 muestras de tejido de madreado de arboles sintomáticos y se extrajeron con ambos métodos. El primer paso del proceso (ruptura del tejido para la liberación del ADN del núcleo de las células) se realizó macerando las muestras en un mortero utilizando arena y buffer de extracción. En los métodos se recomienda la maceración con nitrógeno líquido, pero debido a la dificultad de conseguirlo, éste no fue utilizado. Se probó también macerar las muestras dentro de tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con un pistilo de plástico, pero el tejido de madreado resultó demasiado lignificado y no se lograba obtener una maceración uniforme. La concentración del ADN total obtenido en las extracciones se midió a través del fluorómetro, instrumento que determina la concentración de ADN presente en una

del fluorómetro, instrumento que determina la concentración de ADN presente en una muestra a través de la intensidad de la fluorescencia que esta desprende cuando se le agrega un tinte que se une al ADN.

Posteriormente se realizó la reacción de PCR y electroforesis a todas las muestras. Se evaluó visualmente la intensidad de las bandas obtenidas.

Para definir el tiempo que se puede conservar la muestra antes de ser extraída, y las condiciones apropiadas de almacenamiento, se recolectó una muestra de una planta infectada de madreado, la cual se dividió en 12 submuestras. Se probaron seis tipos de manejo, los cuales pueden observarse en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Tiempos y condiciones de almacenamiento dados a la muestra desde su recolección a extracción

Tiempo de almacenamiento	Condiciones de almacenamiento
0	
1	4° C en bolsas de plástico
2	4° C en bolsas de plástico
3	4o C en bolsas de plástico
4	4o C en bolsas de plástico
10	Liofilizada con HR de 5%

La liofilización de las muestras se realizó secando las muestras a temperatura ambiente en un frasco hermético con sílica gel u otro desecante para extraer la mayor cantidad posible de humedad.

Se hizo dos repeticiones de cada tratamiento. Las muestras fueron extraídas por el método CTAB de doble clarificación. Se realizó la reacción PCR y electroforesis. El resultado fue evaluado visualmente por la intensidad de las bandas obtenidas.

3.1.1.2 Fase de amplificación. Se variaron factores claves tanto en la composición de la mezcla en la cual se lleva a cabo la reacción como en las temperaturas requeridas durante los pasos del ciclo de PCR. La base de la cual se partió para empezar a realizar cambios fue el protocolo Harrison y Kenyon de PCR para madreado. Se utilizaron cinco pares de iniciadores, que se describen en el Cuadro 6. Los detalles de los iniciadores se encuentran en el Anexo 3. Se utilizaron como controles positivos ADN de los fitoplasmas del amarillamiento letal del cocotero, amarillamiento del aster, y hoja pequeña del madreado. Se evaluó el uso de la mezcla comercial para reacciones de PCR, "PCR beads Ready to Go", de la casa comercial Pharmacy Biotech.

Concentración de Mg Cl₂: La concentración recomendada en el protocolo es de 1.5 mM. A partir de esta concentración se realizaron reacciones aumentando o disminuyendo 0.5 mM, dentro de un rango de 0.5 a 2 según lo recomendado en la literatura. Con esto se

esperaba obtener la concentración de magnesio con la cual se lograra la obtención de un producto específico para todos los iniciadores utilizados.

Concentración de dNTP's: Se varió la concentración de dNTP's aumentando o disminuyendo 50 μM a partir de los 800 μM en un rango de 600 a 1200 μM .

Temperatura de ligamiento: Se realizaron pruebas aumentando un grado la temperatura a partir de la recomendada para cada iniciador (Anexo 3).

Se evaluó si se logró amplificación del ADN (presencia de bandas), y en caso afirmativo, la especificidad de las bandas (presencia de más de una banda en tamaños no correspondientes a la secuencia o bandas difusas) y la intensidad de las bandas. Para evaluar la consistencia del método se recolectaron muestras de 23 plantas de madreado con diferentes síntomas. Estas muestras fueron extraídas con el método CTAB de doble clarificación. A cada muestra se le realizaron cuatro pruebas de PCR y se corrieron los productos en un gel al 1% de agarosa en buffer TBA a 80 voltios por 40 min. Se compararon los resultados de las cuatro repeticiones de PCR para cada muestra con el fin de comprobar la consistencia del método.

Cuadro 6. Iniciadores

Iniciador	Especificidad	Uso
P1 y P7	Universal para ADN de fitoplasma	PCR directo
R16m1 y R16m2	Universal para ADN de fitoplasma	PCR directo y anidado del P1 y P7
PPWB16s f y PPWB16s r	Específico para ADN del fitoplasma de la EHPG	PCR directo y anidado del P1 y P7
PP/GLL f y PP/GLL r	Específico para ADN del fitoplasma de la EHPG	PCR directo y anidado del P1 y P7
B32 f y b32 r	Específico para ADN del fitoplasma de la EHPG	PCR directo, especialmente para muestras de insectos

3.1.1.3 Fase de electroforesis. En esta fase se optimizaron tres variables del proceso de electroforesis:

- Concentración de agarosa: La concentración de agarosa determina el tamaño de los poros en la estructura del gel. Esto a su vez influye en la capacidad del gel de separar los diferentes tamaños de las cadenas de ADN. Se varió la concentración desde 0.5 a 1 % de agarosa. La capacidad de separación de los genes se probó corriendo en ellos tres diferentes marcadores moleculares, los cuales contienen tamaños de bandas desde 75 a 12216 kpb. El voltaje utilizado fue de 60 v. Se evaluó la resolución de las bandas obtenidas.

- b) Buffer utilizado: El buffer de corrida es una solución de sales en agua destilada que sirve de conductor de la corriente eléctrica sin aumentar de temperatura. Se probaron dos buffers comerciales, el TAE y el TBA, ambos de marca sigma. Se evaluó la capacidad de mantener la temperatura baja a voltajes de 55 a 120v. Como parámetro para decidir si existía aumento importante de la temperatura del buffer se observó la formación de condensación en las paredes del tanque de electroforesis. También se evaluó la definición de las bandas obtenidas de ADN amplificado.
- c) Voltaje de corrida: Se probaron voltajes de 55, 60, 80, 100, 120v. Se midió el tiempo de corrida, el aumento de temperatura y la definición de las bandas obtenidas.

3.2 DETERMINACION DE POSIBLES VECTORES

Este estudio estuvo dirigido a determinar los insectos que dentro de la fauna insectil del madreado mostraran presencia del patógeno, lo que los señalaría como posibles vectores. Esto se logra haciendo pruebas de PCR al ADN extraído de los insectos para comprobar si dentro de su organismo se encuentra ADN del fitoplasma que es detectado por la prueba. Se realizaron dos etapas. En la primera se realizaron pruebas a todos los insectos recolectados pertenecientes a los ordenes Hemíptera y Thysanóptera, por contener numerosas especies que se alimentan de la savia de la planta. En la segunda etapa se enfocaron las pruebas a los insectos que resultaron positivos en la primera y a las familias de insectos que la literatura reporta como vectores comunes de fitoplasmas.

3.2.1 Recolección de fauna insectil

Esta fase se llevó a cabo desde julio de 1998 a marzo de 1999. El sitio de recolección fue un ensayo de procedencias de madreado ubicado en la sección de cerdos, departamento de zootecnia de la Escuela Agrícola Panamericana; donde se presentaban plantas con síntomas severos de la enfermedad. El método de recolección fue encerrar ramas completas con una bolsa de plástico transparente y golpear las ramas para desprender los insectos.

3.2.2 Prueba PCR a insectos

Para la extracción del ADN de los insectos se utilizó el método CTAB para insectos (Harrison. 1998; comunicación personal). El proceso en detalle puede verse en el Anexo 1. Con este método se obtiene tanto el ADN genómico del insecto como (en caso de estar presente) ADN del fitoplasma. La concentración de ADN de fitoplasma suele ser muy baja en los insectos, por lo que la cantidad de producto que se obtiene de un solo ciclo de amplificación es por lo regular insuficiente para ser visualizada por un solo ciclo de electroforesis. Además se sabe que algunos insectos contienen dentro de su tracto digestivo otras especies de fitoplasmas diferentes del patógeno en estudio (Harrison, 1998; comunicación personal). Debido a esto, para incrementar la sensibilidad de la prueba y su especificidad, se realizaron dos rondas de PCR para cada muestra. Se realizó PCR directo utilizando la pareja de iniciadores P1- P7, universal para ADN de cualquier fitoplasma. La pareja de iniciadores PPWB/GLLr - PPWB/GLLf, específica para el

fitoplasma de EHPM, fue usada para realizar PCR anidado del producto de la reacción con el P1- P7, para descartar cualquier amplificación debida a otra especie de fitoplasma e incrementar la cantidad de producto obtenido en el PCR directo. Se realizaron también pruebas utilizando el iniciador B32f- B32r, el cual es altamente específico para el patógeno, lo que permite incrementar el número de ciclos de PCR sin amplificar producto inespecífico, lo que resulta en un mayor grado de sensibilidad en la prueba sin necesidad de realizar PCR anidado. Por estas características es usado especialmente para hacer pruebas en insectos. El flujo del proceso de PCR en insectos se detalla en la figura 14.

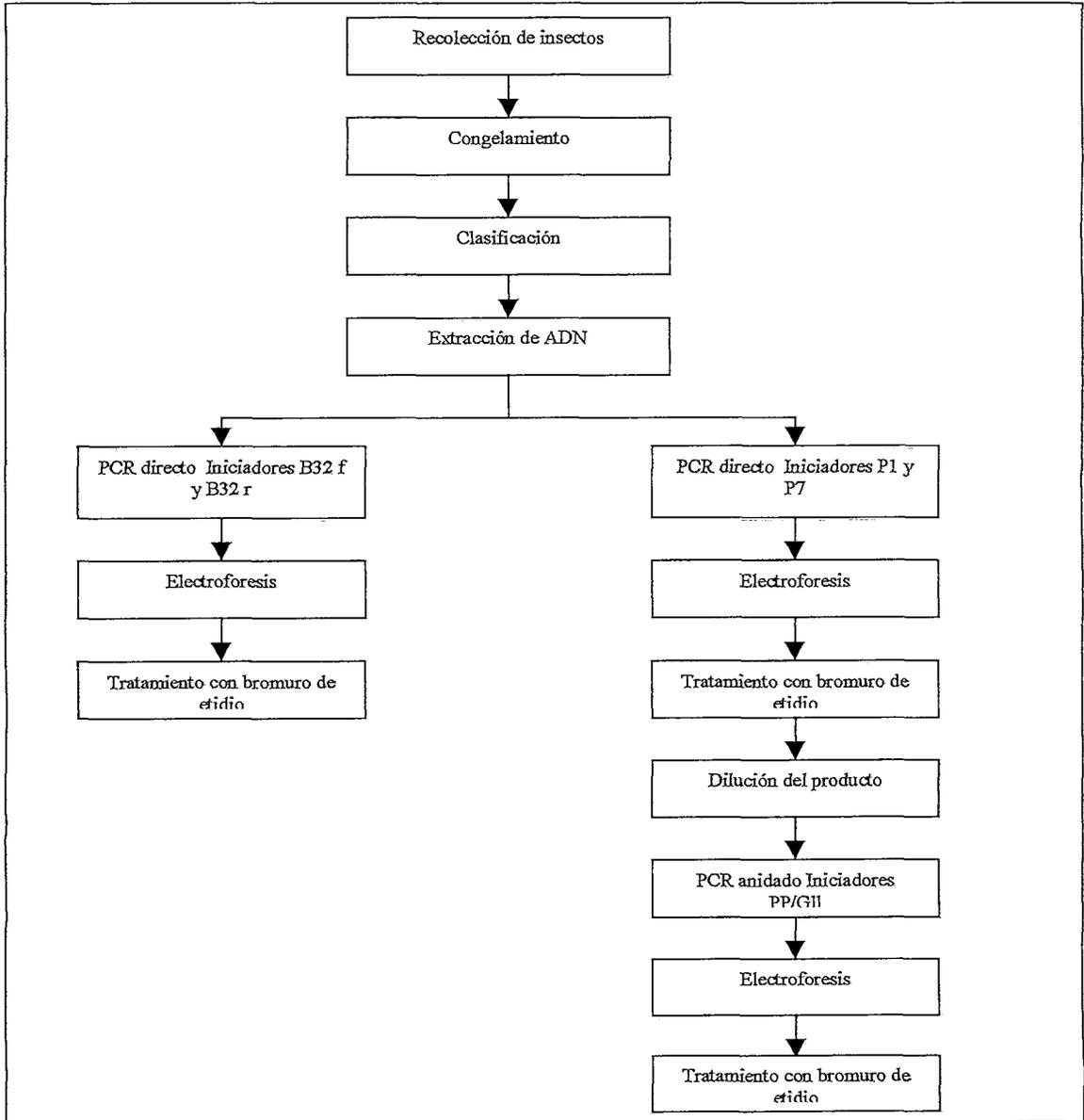


Figura 14. Proceso de extracción y amplificación de PCR en insectos.

Se utilizaron los métodos PCR que fueron optimizados en la primera parte del estudio. En cada grupo de reacciones se incluyeron un control positivo de ADN de fitoplasma y un control negativo de agua para detectar cualquier contaminación o falla de la reacción. Se corrieron las muestras y un marcador molecular en gel de agarosa al 1% a 80 voltios por 40 min. Los insectos que presentaron banda (positivos al fitoplasma) fueron identificados por el Dr. Ronald Cave, del departamento de Protección Vegetal, Zamorano.

3.3 CARACTERIZACION DE SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD

El estudio se llevó a cabo en los terrenos de la sección de cerdos, Departamento de Zootecnia de la Escuela Agrícola Panamericana, en el periodo comprendido entre enero y marzo de 1999.

3.3.1 Diseño del ensayo

El ensayo consistió en parcelas sembradas con semillas procedentes de 10 procedencias. Se sembró en 1988 en los terrenos de la sección de cerdos de la Escuela Agrícola Panamericana para un estudio conjunto con la universidad de Oxford. Está ubicado a 800 msnm, 14° 00' de latitud norte y 87° 02' longitud oeste. La zona presenta una temperatura mínima de 16.3°C y máxima de 28°C. Se registra una precipitación promedio de 1132 mm/año con distribución bimodal. El diseño del ensayo fue de bloques completos al azar, con tres replicas de cada procedencia. Cada parcela consistió de en 80 plantas en 20 m².

En este estudio se incluyeron cuatro de las procedencias del ensayo (Cuadro 7). El criterio para la elección fue el grado de expresión de síntomas e incidencia de la enfermedad, según el estudio realizado por Jordan en 1997.

Cuadro 7. Procedencias incluidas en el estudio de síntomas.

Procedencia	País	Incidencia de la enfermedad y expresión de síntomas
Vaho hondo	Guatemala	Baja
Guayabillas	Honduras	Baja
Rothaluleo	Guatemala	Alta
San Mateo	México	Alta

Dentro de cada parcela se seleccionaron tres plantas, cada una con un nivel de severidad de la enfermedad: Sana, Moderada, y Severa (Cuadro 8). Se utilizó el sistema de evaluación de la enfermedad creado por Boa, 1996 (Anexo 4). En cada caso se anotaron los síntomas mostrados, aspecto general y otras enfermedades presentes.

Cuadro 8. Niveles de severidad de la EHPG.

Calificación	Severidad	Proporción de árbol afectada
0	Saludable	0
2	Moderado	25 – 50%
3	Severo	Más del 50%

De cada planta seleccionada se tomó una muestra de hojas, tomando el brote más joven de todas las ramas. Se realizó la extracción de ADN por el método Harrison. La concentración de ADN en las muestras se midió con un fluorómetro.

Una vez determinada la concentración de cada muestra, se llevo a todas a una base uniforme a través de diluciones en agua destilada. La concentración final de las muestras fue de 150 ng por ml. Se realizaron cuatro reacciones de PCR directo a cada muestra utilizando los iniciadores P1 y P7. Se realizó la electroforesis de los productos en geles de agarosa al 1% a 80 voltios por 40 min. Posteriormente se realizó PCR anidado a todas las muestras que presentaron resultados negativos en el PCR directo. Se utilizó una dilución de 1 en 40 del producto del PCR directo en agua destilada como templete para la reacción de PCR anidado para evitar una sobresaturación de ADN en la mezcla de PCR, ya que esto impide que se realice la reacción. El iniciador usado fue el PPWB/GLL f y r.

3.3.2 Variables medidas

Se midió la intensidad de la banda obtenida en el gel, como indicativo de la concentración de ADN del fitoplasma en la muestra. Las bandas fueron clasificadas como:

- a) Ausente: No es posible distinguir la banda
- b) Débil: Se distingue levemente una banda
- c) Moderada: Se distingue de manera clara una banda, pero no resalta fuertemente del fondo
- d) Fuerte : Se distingue la banda de manera clara y destaca fuertemente del fondo.

Con este sistema no se pretende obtener una medición exacta de la concentración de ADN en el templete. Sólo se intenta buscar una escala sobre la cual comparar las muestras. Este sistema tiene las limitantes de que sobre una determinada concentración ya no se logra distinguir entre las intensidades de las bandas, ya que todas dan uniformemente fuertes; además que en caso de presentarse compuestos inhibidores en la extracción se obtienen bandas ausentes o débiles que no corresponden a una baja concentración de ADN.

Se puede ver un ejemplo de clasificación la intensidad de bandas en la figura 15.

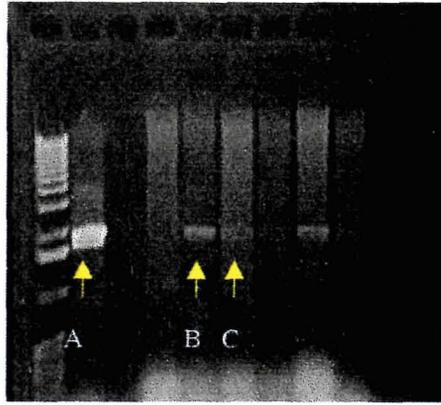


Figura 15. Sistema de evaluación de la intensidad de la banda
A= Banda fuerte B= Banda moderada C= Banda débil

Se realizaron análisis de tablas de contingencia (χ^2) para probar la hipótesis nulas de que no existían diferencias significativas entre las concentraciones del ADN del fitoplasma entre los diferentes niveles de severidad de los síntomas y entre las procedencias de las plantas.

3.3 ESTUDIO DE TRANSMISION POR ESTACAS

Este estudio se realizó en el periodo comprendido entre diciembre de 1998 y marzo de 1999 en terrenos de ubicados en el Departamento de Protección Vegetal (Zamorano, Honduras).

3.4.1 Diseño del ensayo

El ensayo consistió en la siembra de manera alterna de estacas provenientes una planta enferma y una planta asintomática (Cuadro 9). De cada planta se obtuvieron 15 estacas de diámetro entre 5 a 10 cm en su extremo más angosto y de aproximadamente 1 m de largo. Se sembró las estacas a 60 cm de distancia en surcos previamente preparados con azadón para lograr tierra suelta apropiada para el enraizamiento. La siembra se realizó el día 10 de diciembre de 1998. Inicialmente se aplicó riego en horas de la mañana, pero se presentaron problemas de hongos en los cortes, por lo que se suspendió el riego reiniciándolo hasta que se presentaron los primeros rebrotes en las estacas.

Cuadro 9. Árboles usados en el estudio de transmisión por estacas.

Árbol	Ubicación	Síntomas	PCR directo	PCR anidado
Asintomático	Lado oeste del dormitorio Pantanal, Zamorano	Ningún síntoma visible	Negativo	Positivo
Enfermo	Terrenos de Florencia, Zamorano	Proliferación de brotes, hoja pequeña	Positivo	Positivo

Los geles de electroforesis mostrando los resultados para los árboles utilizados en el estudio se muestran en las figuras 16 y 17.

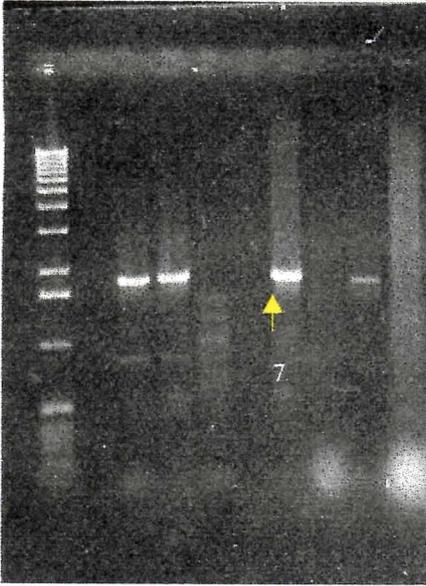


Figura 16. Muestra 7= Arbol con síntomas severos. Trial Florencia, EAP. PCR directo, P1 yP7

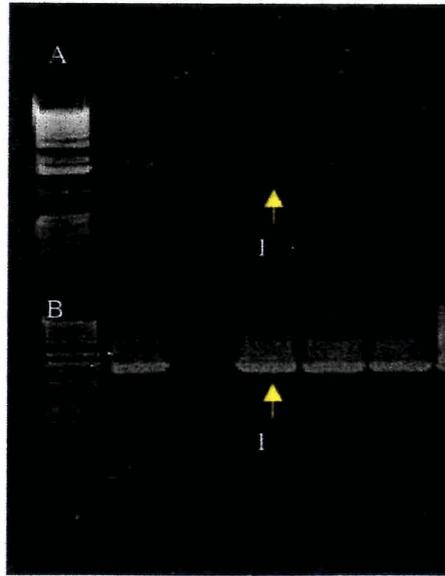


Figura 17. A- Muestra 1: árbol asintomático (Pantanal 22) PCR directo P1 yP7
B- Muestra 1: árbol asintomático (Pantanal 22) PCR anidado PP/GLI f y PP/GLI r

El 1 de marzo de 1999 se realizó la toma de datos y recolección de muestras de hojas jóvenes de las estacas. Se realizó la extracción con en método CTAB de doble clarificación y la reacción de PCR directo con el método optimizado en la primera parte del estudio, utilizando el iniciador P1 y P7. En la reacción se incluyeron controles positivos y negativos (ADN del fitoplasma del amarillamiento del cocotero y agua destilada respectivamente). La electroforesis se corrió en una gel al 1% de agarosa a 80 v por 40 min. Posteriormente se realizó PCR anidado a las muestras que resultaron negativas en la primera prueba. Para esto se realizó una dilución del producto de la reacción inicial de 1: 40. Se utilizó esta dilución como templete en la reacción anidada. El iniciador usado en esta fue el PPWB/GLL. El control positivo usado en esta segunda reacción fue el ADN extraído de una planta de madreado positiva en pruebas anteriores. La electroforesis se realizó de igual manera que la anterior.

3.4.2 Variables medidas

- a) Porcentaje de enraizamiento de las estacas de planta asintomática vs. planta severa

b) Presencia del fitoplasma en los brotes de las estacas.

Se realizó un análisis de tabla de contingencia de χ^2 para probar la hipótesis nula de que el porcentaje de enraizamiento es igual para las estacas provenientes de plantas severas y asintomáticas.

3.4 ESTUDIO DE TRANSMISION POR SEMILLAS

3.4.1 Diseño del ensayo

El estudio se realizó del 4 de enero al 25 de febrero de 1999. Se sembraron semillas recolectadas de cuatro árboles, tres infectados con el patógeno y uno sano. El diagnóstico visual de los arboles fue confirmado mediante prueba PCR. Los tres árboles enfermos fueron clasificados como moderados según el sistema de clasificación de la enfermedad de Boa, 1996.

La recolección de las semillas se llevó a cabo a finales de abril de 1998. Hasta enero de 1999, se almacenaron a 4° C con humedad relativa de 20%. La siembra se realizó en maceteros de 3'' de diámetro con medio pasteurizado. Se sembraron 10 maceteros con las semillas de cada árbol, con dos semillas por macetero. Para evitar la transmisión por vectores de la EHPG, se colocaron los maceteros en jaulas de malla fina para prevenir la entrada de cualquier insecto.

A los 42 días después de emergencia las plántulas habían desarrollado suficiente follaje para realizar la toma de muestras. Se extrajo el ADN por el método Harrison. Se realizó una reacción de PCR directo con los iniciadores P1 y P7, y PCR anidado con PPWB/GLL, cada juego de reacciones con sus respectivos controles positivos y negativos. Se visualizaron los resultados en una gel de agarosa al 1%, a 80 v por 40 min.

3.4.2 Variables medidas

La variable medida fue la presencia o ausencia del fitoplasma en las muestras tomadas de las plántulas. Por la naturaleza no paramétrica de la variable, no fue posible realizar un análisis de ANDEVA, por lo que se realizó como una prueba de tabla de contingencia (χ^2)

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 OPTIMIZACION DEL METODO PCR

4.1.1 Fase de extracción

4.1.1.1 Determinación del método de extracción mas adecuado. Se observó una diferencia en la concentración del ADN en las extracciones realizadas por los métodos Harrison y Doyle y Doyle (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración de ADN por los dos métodos de extracción

Número de muestra	Concentración de ADN ng/μl	
	Harrison	Doyle y Doyle
1	1829	320
2	3059	171
3	1823	1203
4	2739	1886
5	3592	1335
6	2105	1715
Media	2524.50	1105.00

La media de la concentración de ADN obtenida en la extracción con el método Harrison fue cerca del doble que la obtenida por el método Doyle y Doyle. También se observó diferencias en la intensidad de las bandas en cuatro de las seis muestras extraídas por ambos métodos (Cuadro 11). El método de extracción que presentó mayor intensidad de banda en esas cuatro muestras fue el Harrison.

Cuadro 11. Comparación de la intensidad de bandas, métodos Harrison y Doyle y Doyle.

Número de muestra	Intensidad de la banda	
	Harrison	Doyle y Doyle
1	Fuerte	Débil
2	Fuerte	Débil
3	Fuerte	Moderada
4	Fuerte	Fuerte
5	Fuerte	Moderada
6	Fuerte	Fuerte

Los resultados de la prueba concuerdan con lo que se esperaría por el proceso de extracción empleado. El método Harrison remueve mas compuestos ajenos al ADN de la muestra, como polisacáridos, proteínas y celulosa, por lo que resulta en una mayor concentración de ADN en la extracción final. Lo mismo se puede decir sobre la intensidad de las bandas, ya que al tener mayor concentración, se coloca una mayor cantidad de ADN por unidad volumétrica de la extracción que se le agregue a la mezcla de PCR, por lo tanto en una muestra con baja concentración de ADN del fitoplasma se aumenta la capacidad de detección de la prueba.

4.1.1.2 Determinación del tiempo máximo de almacenamiento de la muestra previo a la extracción . Se encontró diferencias de las intensidades de banda presentadas por las muestras con los diferentes tipos de almacenamientos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados de los tipos de manejo

Tiempo de almacenamiento en días	Condiciones de almacenamiento	Intensidad de banda	
		Muestra 1	Muestra 2
0		Fuerte	Fuerte
1	4° C en bolsas de plástico	Fuerte	Fuerte
2	4° C en bolsas de plástico	Fuerte	Fuerte
3	4° C en bolsas de plástico	Moderada	Moderada
4	4° C en bolsas de plástico	Débil	Débil
10	Liofilizadas con HR de 5%	Ausente	Ausente

Después del segundo día de almacenamiento se observó una reducción en la intensidad de la banda obtenida. Se sabe que en las células existen enzimas y otros compuestos químicos capaces de degradar el ADN. Estas sustancias son liberadas cuando la célula muere al destruirse las estructuras celulares que los contienen (lisosomas). Es de esperar que a mayor tiempo transcurra entre la recolección de la muestra y su extracción, existirá una mayor cantidad de células muertas dentro del tejido, por lo que la cantidad de ADN que se obtiene va a ser menor y con mayor degradación. Se sabe que es posible extraer ADN de muestras liofilizadas, siendo esta la manera en que usualmente se conservan las muestras que deben ser enviadas distancias largas para su extracción. Sin embargo, en este ensayo no se obtuvieron resultados positivos con ninguna de las dos muestras liofilizadas. Probablemente este resultado se deba a que el proceso para desecar las muestras fue demasiado largo y permitió la degradación del ADN.

4.1.2 Fase de amplificación

a) Mezcla para reacciones de PCR. La mezcla final que se obtuvo a través de múltiples pruebas de PCR es la siguiente:

Cuadro 13. Mezcla para una reacción de PCR de 25 μ l.

Reactivos	Concentración final	Cantidad en microlitros (μ l)
Agua ddestilada		18.35
10x PCR buffer	1 ^x	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	1.5
dNTP's (25 mM)	1 mM	1
Iniciador 1 (50 ng/ μ l)	2 ng/ μ l	0.5
Iniciador 2 (50 ng/ μ l)	2 ng/ μ l	0.5
Enzima taq. ADN polimerasa	1 unidad	0.15
Muestra de ADN de 150 a 1000 ng/ μ l	3 a 200 ng/ μ l	0.5
Total		25 μ l

No se encontró diferencia en los resultados de las repeticiones del PCR a una misma prueba, por lo que se considera que el método es consistente.

Las reacciones realizadas con la mezcla comercial **PCR beads Ready to Go** demostraron tener capacidad de detección del ADN de fitoplasmas. En todos los casos, se observó amplificación del control positivo y las muestras de plantas infectadas con el patógeno.

b) Temperaturas de ligamiento. Las temperaturas optimizadas de ligamiento para los diferentes iniciadores fueron:

Cuadro 14. Temperaturas de ligamiento

Par de iniciadores	Temperatura			
	PCR directo	Tiempo	PCR anidado	Tiempo
P1 y P7	56 °C	80		
PPWB/GLL f y PPWB/GLL r	56 °C	80	57 °C	80
R16M 1 y2	56 °C	80	57 °C	80
B32 f y r	56 °C	50		

Con el aumento en un grado de todas las temperaturas de ligamiento se logró obtener en todas las pruebas realizadas bandas definidas, no se presentaron bandas no específicas o difusas.

4.1.3 Fase de electroforesis

4.1.3.1 Concentración de agarosa. La concentración de agarosa que presentó una mejor separación de todas las bandas de los marcadores moleculares fue de 1% (Figura 18).

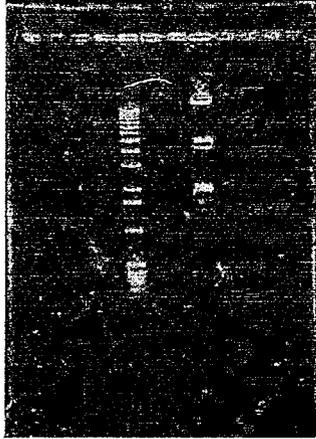


Figura 18. Gel de agarosa a 1% de concentración.
Se observa una alta resolución de las bandas del marcador molecular.

4.1.3.2 Elección del buffer de corrida. No se observó diferencia en el uso de cualquiera de los buffers TAE o TBE ni en definición de bandas ni en capacidad de conservar la temperatura estable.

4.1.3.3 Voltaje de corrida. Se observó diferencia en el tiempo en que se realizaba la electroforesis, pero no en el aumento de temperatura en el rango de voltaje de 55 a 120 voltios (Cuadro 15).

Cuadro 15. Tiempo de corrida para diferentes voltajes.

Voltaje	Tiempo en minutos
55	90
60	60
80	40
100	30
120	25

Probablemente no se dio un aumento significativo de la temperatura del buffer debido a que todos los voltajes probados se hallaron dentro del rango de la capacidad de los buffers de mantener la temperatura constante. Otra posibilidad es que debido a que el tiempo de corrida disminuía, el aumento de temperatura no llegó a alcanzar un grado tal que fuera notable. Si se hubiera dado un aumento notable en la temperatura del buffer al aumentarse el voltaje, el resultado sería que el gel se derretiría, perdiéndose las muestras. Ya que esta

situación no se presentó con los voltajes probados, se permite flexibilidad respecto al voltaje que se use para correr los geles de agarosa. Como la única variación que se dio entre los diferentes voltajes (en un rango de 55 a 120 v) es el tiempo en que se corre el gel, el investigador puede elegir el voltaje más adecuado a sus actividades.

4.2 DETERMINACIÓN DE POSIBLES VECTORES

En la primera etapa, se descartaron como posibles vectores a insectos de las familias Pentatomidae y Membracidae, ya que resultaron negativos al PCR directo y no se encontró referencia de insectos de estas familias como vectores de fitoplasmas. En la segunda etapa se realizaron pruebas solamente a insectos de las familias Cicadellidae, Thripidae, Aleyrodidae y Miryidae, por resultar positivos en la primera etapa. Los resultados de las pruebas PCR a insectos se encuentran en el Cuadro 16.

El PCR directo se realizó utilizando la pareja de iniciadores P1 y P7. El PCR anidado se realizó con los iniciadores PPBW/GLL f y r. Las pruebas con el iniciador B32 f y r. dieron resultados negativos en la mayoría de los casos. Esto puede deberse a que se trabajó únicamente con 30 ciclos de amplificación, con lo que niveles bajos de ADN podrían haber pasado inadvertidos. Debido a que el B32 no tiene un iniciador interno con el cual realizar PCR anidado, no fue posible comprobar si se logró amplificación con este iniciador en las reacciones en las que no se observó banda. Los resultados de la electroforesis de todas las muestras se encuentran en el Anexo 5.

Se consideran especies con mayores probabilidades de ser vectores las especies del género *Empoasca*, ya que pertenece a la familia Cicadellidae, en la cual se encuentran varias especies reportadas como vectores de otros fitoplasmas. También se considera el *Hydatothrips gliricidiae*, por la constancia con que presentó resultados positivos en las pruebas. Las otras especies presentaron positivos de manera esporádica.

Estos positivos se pueden deber al ADN del fitoplasma contenido en el estómago del insecto después de alimentarse, más que al hecho de que el fitoplasma se estuviera reproduciendo sistemicamente en el interior del insecto. Al contrario, los negativos observados pueden deberse tanto a que el insecto no había estado expuesto al fitoplasma, o que este aun no hubiera pasado por suficiente tiempo de incubación.

Cuadro 16. Resultado de las pruebas de PCR a la fauna insectil del madreado

Insecto	# de pruebas	Pruebas positivas para PCR directo	# de pruebas	Pruebas positivas para PCR anidado
<i>Alconeura sp.</i> (Homoptera: Cicadellidae)	2	0	1	1
<i>Aphis spp.</i>	1	0		
<i>Empoasca hastosa</i> (Homoptera: Cicadellidae)	6	0	3	1
<i>Empoasca sp.</i> (Homoptera: Cicadellidae)	3	0	2	0
<i>Hydatothrips gliricidia</i> (Homoptera: Thripidae)	5	4	2	2
<i>Lopidea murray</i> (Heteroptera: Mirydae)	7	1	1	1
Membracidos	10	0	7	0
Mosca blanca (especie no identificada)	1	0	1	1
<i>Ollarianus sp.</i> (Homoptera: Cicadellidae)	2	1	1	0
Pentatomido	1	0	1	0

4.3 CARACTERIZACION DE SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD.

Se encontró una diferencia significativa de la concentración del ADN del fitoplasma (medida en intensidad de banda) para los diferentes niveles de la enfermedad ($\chi^2 = 17.38$; $gl = 6$; $p < 0.03$).

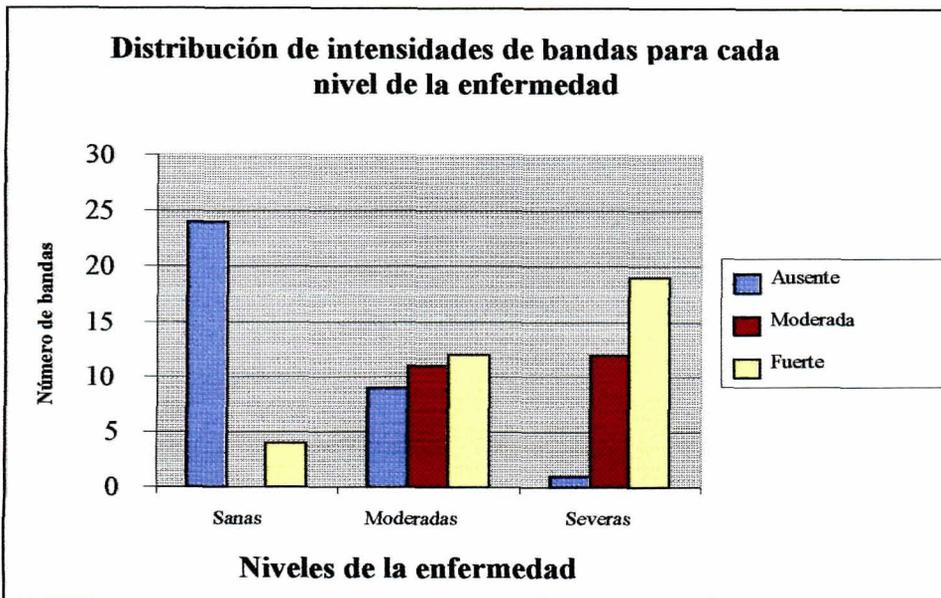


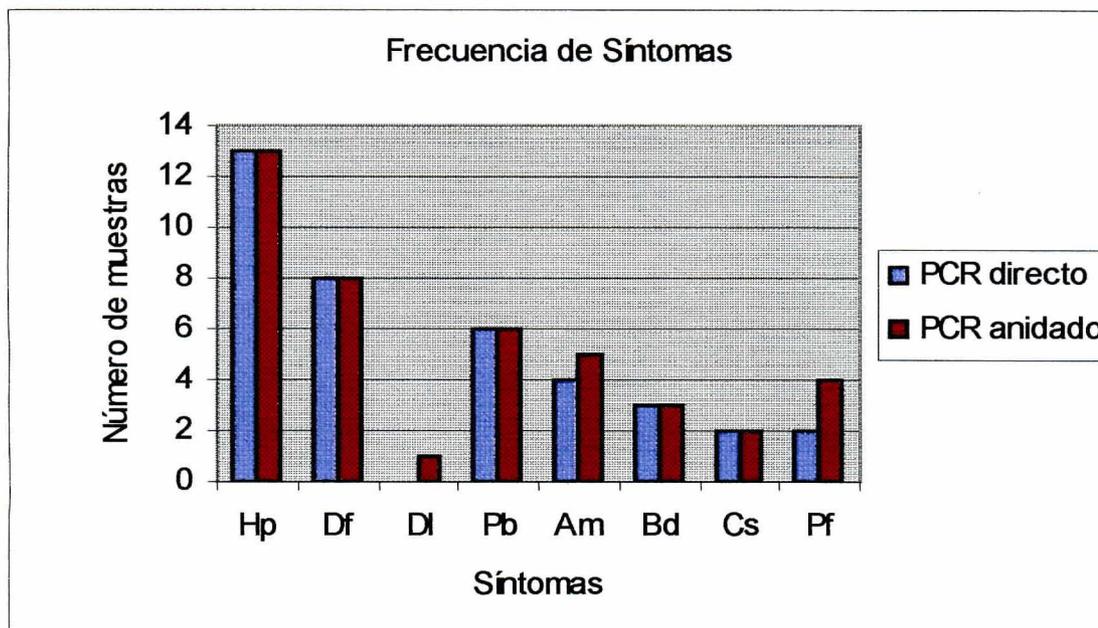
Figura 19. Distribución de intensidades de banda para cada nivel de la enfermedad

Se puede observar en la Figura 19, que para los niveles sanas y severas existe una predominancia de las intensidades de bandas ausente y fuerte, respectivamente. Esto concuerda con la hipótesis de que existe una relación entre la concentración del patógeno y la clasificación de los síntomas observados. Sin embargo, en el nivel de severidad moderada, las intensidades de bandas se distribuyen entre todas las intensidades, con una ligera predominancia de bandas fuertes.

Esto se puede deber a la limitante de la prueba de distinguir las diferencias entre las muestras cuando estas sobrepasan una determinada concentración de ADN, ya que a partir de ésta, todas las bandas son uniformemente fuertes. De igual manera, la aparición de bandas moderadas y ausentes en las plantas clasificadas como severas se puede deber a la presencia de compuestos inhibidores en las muestras, los cuales pueden causar resultados confusos. Por esto se puede decir que la prueba solo va a detectar diferencias entre muestras que presenten gran diferencia en el nivel de severidad de la enfermedad.

Esto nos da cierto grado de confianza de que a una mayor severidad en la expresión de síntomas se encuentra una mayor concentración del patógeno en los tejidos. Con esto se confirma que los síntomas utilizados para medir la severidad de la enfermedad corresponden a los causados por el fitoplasma.

En la distribución de frecuencias (Figura 20) se puede observar que el síntoma más frecuente en las muestras positivas al fitoplasma fue la hoja pequeña. Este síntoma se presentó usualmente junto con distorsión severa de las hojas. El síntoma de proliferación de brotes fue acompañado en los crecimientos jóvenes con brotes débiles, los cuales se desprendían fácilmente dejando el raquis de la hoja con la apariencia de cola de serpiente. En las ramas con proliferación de brotes de follaje maduro, este presentaba hoja pequeñas, cloróticas y distorsionadas. Debido al sistema de manejo de corta periódica no se observó con frecuencia el síntoma de la muerte regresiva, por lo cual solo se pudo tomar muestras de una planta la cual resultó positiva. El síntoma amarillamiento (clorosis) usualmente se dió en las mismas plantas que exhibían otros síntomas. Sin embargo, la única planta que solo presentó este síntoma resultó negativa para el fitoplasma. Ya que una clorosis o amarillamiento en una planta puede ser causado por múltiples factores tanto abióticos (deficiencias de nutrientes, fitotoxicidad) como bióticos (infecciones virales), este síntoma solo no es de confiable para la caracterización de la enfermedad.



Pf= Pérdida de follaje Hp= Hoja pequeña Df= Distorsión fuerte Dl= Distorsión ligera Pb= Proliferación de brotes Am= Amarillamiento Bd= Brotes débiles Cs= Cola de serpiente

Figura 21. Frecuencia de aparición de diferentes síntomas en los árboles positivos para ADN del fitoplasma.

Síntomas como distorsión ligera de hojas y pérdida de follaje no fueron positivas para el PCR directo, pero sí al PCR anidado. Esto parece ser debido a que el patógeno se encontraba en concentraciones bajas. No hay datos suficientes en el estudio para llegar a una conclusión definitiva, pero podría especularse que estos síntomas sean característicos de el inicio de la infección en plantas maduras. Se observaron en el mismo lote síntomas de otro patógenos en las hojas. El hongo *Oidium* sp se encontraba frecuentemente en las ramas con proliferación de brotes, probablemente debido a que la densidad de follaje creaba un ambiente de humedad propicio para el patógeno. Se presentaba como una lámina polvorienta blanca sobre hojas distorsionadas. Se presentó también una mancha chocolate en las hojas maduras y tallos jóvenes. Por sus características se le identificó como el hongo *Colletotrichum* sp., pero no fue posible realizar una identificación segura ya que el estado de las muestras no lo permitió. Estas enfermedades fungosas se presentaron a partir de octubre de 1998, después del período húmedo causado por el huracán Mitch.

Se observó que las plantas manejadas con el sistema de podas periódicas presentaban mayor severidad de síntomas y mayor cantidad de plantas muertas. Esto se puede deber a que la perturbación provocada por la remoción de ramas debilita al sistema de defensa de

la planta, o a que al realizarse la poda se disminuye el tamaño de la corona por lo que mayor porcentaje de esta se encuentra expuesta a los vectores.

No se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de ADN del patógeno entre las cuatro procedencias ($X^2= 7.76$; $gl=9$; $p<0.80$). Esto se debe probablemente al hecho de que las plantas de donde se obtuvieron las muestras fueron seleccionadas para mostrar todos los niveles de la enfermedad.

Sin embargo en el ensayo se pudo observar que en las procedencias Vaho Hondo y Guayabillas un menor número de plantas clasificadas como moderada y severa, e incluso en la procedencia Guayabillas no se encontró ninguna planta con la clasificación de severa. Esto concuerda con el estudio de Jordán (1997), confirmando que las plantas de las procedencias Vaho Hondo y Guayabillas presentan algún tipo de tolerancia a la multiplicación del patógeno dentro de los tejidos de la planta.

En las pruebas de PCR anidado se encontró que todas las plantas asintomáticas en todas las procedencias resultaron positivas. Esto sugiere que el patógeno está presente en los tejidos de estas plantas pero en concentraciones muy bajas. Los mecanismos de resistencia a fitoplasmas sugeridos por la literatura no parecen ser los que se encuentran en el caso de la EHPG. Durante la recolección de las muestras se pudo observar que las plantas asintomáticas presentaban un follaje uniforme sin que se notara diferencias en vigor, coloración o tamaño de la hoja. Esto no concuerda con las hipótesis de resistencia por los siguientes motivos: a) klenducidad afirma que la planta no resultaba infectada por el patógeno por no ser preferida por el vector. Esto no es lo que se observó en este estudio, ya que las plantas sí presentaban infección. b) deposición de tejido calloso en los poros del floema: Esta hipótesis afirma que la resistencia se debe a la dificultad de traslocación del patógeno dentro de la planta, quedando confinado cerca del punto de inoculación. El tejido infectado muere por la obstrucción del floema. En las plantas no se observaron partes que presentaran características de la enfermedad o marchitez por lo que no parece estar actuando este mecanismo.

4.4 TRANSMISION POR ESTACAS

De las 15 estacas provenientes de una planta asintomáticas se obtuvieron 7 estacas enraizadas. De las 15 estacas provenientes de una planta con síntomas severos, sólo enraizó una estaca.

Se observó diferencia significativa en el porcentaje de germinación entre las estacas provenientes de plantas asintomáticas y con síntomas severos ($X^2= 6.37$; $gl= 1$; $p< 0.03$). Al realizarse la prueba de PCR la estaca enraizada de planta con síntomas severos resultó positiva, en cambio las 7 estacas enraizadas de plantas asintomáticas dieron negativos. Sin embargo, al realizarse PCR anidado a estas estacas se obtuvieron resultados positivos en seis de ellas por lo que se puede decir que en estas estacas la concentración del fitoplasma era baja comparada con la estaca de planta severamente sintomática.

En ambos casos se observa un porcentaje inferior a la reportada por la literatura. Es posible que la época de siembra haya influido en el enraizamiento, ya que se realizó en el mes de diciembre, cuando las temperaturas aun eran bajas (Gladstone S. 1998, comunicación personal)². También puede que la presencia del fitoplasma aún en las estacas, aun cuando la planta madre no presenta síntomas influya en la reducción del porcentaje de enraizamiento. Las estacas de plantas enfermas mostraron un nivel de enraizamiento muy bajo significativamente inferior a las de plantas asintomáticas. Ésto sugiere que los conductos del floema de estas estacas pudieran estar físicamente obstruidos por las células de los fitoplasmas, por lo que se podría haber dificultado el transporte de fitohormonas y nutrientes necesarios para el proceso de enraizamiento.

4.5 TRANSMISION POR SEMILLAS

Durante la recolección de semillas se observó que las plantas severamente enfermas no producían semillas ya que no presentaban floración. Con la prueba de PCR anidado se presentaron tres casos positivos entre las plántulas de semillas de arboles moderadamente enfermos (Figuras 21 y 22). En ninguna de las plántulas de semillas de árbol sano (control negativo) se detectó ADN de fitoplasma, por lo que se descarta una contaminación por vectores en las jaulas. No hubo diferencia significativa entre las plántulas de semillas sanas y enfermas ($\chi^2= 3.96$; $gl= 3$; $p < 0.77$), esto se debe al bajo numero de positivos en la población de plántulas. Sin embargo, el significado biológico de estos resultados positivos es muy importante, ya que aunque la cantidad de semillas que transmitan efectivamente la enfermedad sea bajo, el solo hecho de tener plantas infectadas dentro de una población de plantas susceptibles representa una fuente de inóculo que puede ser luego transmitido a través de vectores.

En la literatura no se ha encontrado ningún caso de transmisión de fitoplasmas por semillas. Se ha encontrado la presencia de ADN de fitoplasma en el embrión de cocos afectados por el amarillamiento letal del cocotero, pero las semillas de plantas enfermas no germinan (Harrison N. 1998, comunicación personal). En un estudio realizado con semillas de madreco recolectadas de plantas con síntomas de la enfermedad, se observó que las plántulas obtenidas morían poco después de la germinación. (Kenyon *et al.* 1996). Estos estudios se han visto limitados por la dificultad de obtener cantidades suficientes de semilla, por lo que no cierran la posibilidad de que exista un porcentaje de transmisión no reportado.

² Dra. Sally Gladstone, Departamento de Recursos Naturales, Zamorano.

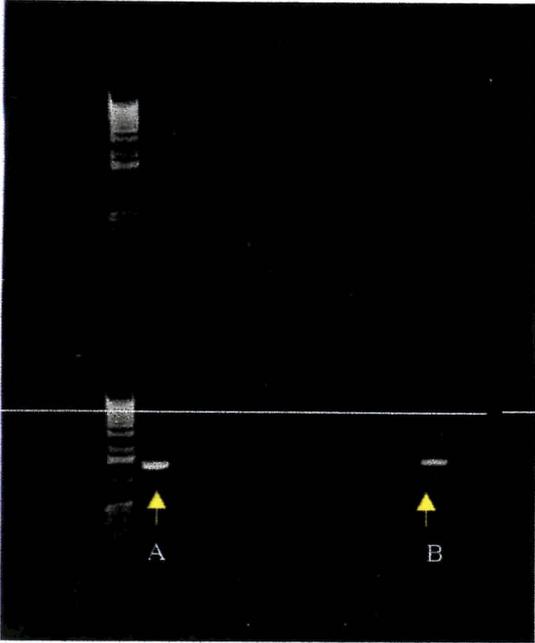


Figura 21. Gel de plántulas provenientes de semillas de árboles enfermos. A= control positivo B= plántula posiblemente infectada.

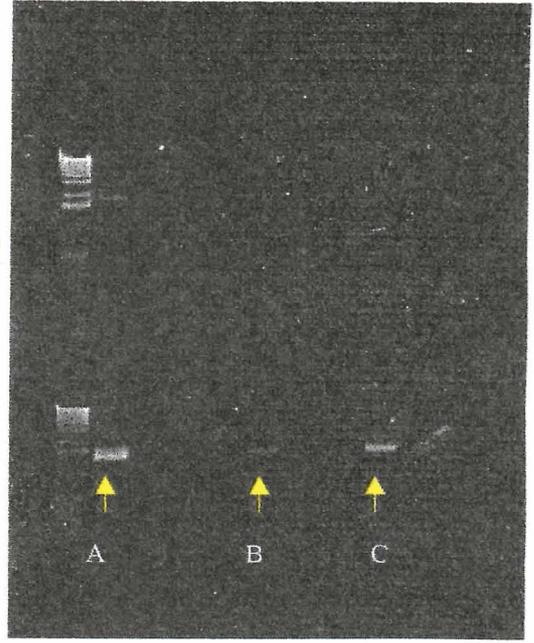


Figura 22. Gel de plántulas provenientes de semillas de árboles enfermos. A= control positivo B= plántula posiblemente infectada C= plántula posiblemente infectada

Debido al proceso de desarrollo de la semilla se cree que existe una barrera fisiológica para el paso del patógeno, ya que la semilla se desarrolla a partir de tejido meristemático, sin una conexión directa con los conductos vasculares. Los conductos del floema, en donde se localiza el patógeno, tienen conexión únicamente hasta la nucela, no al embrión. Sin embargo, los reportes de presencia de ADN del patógeno en el embrión demuestran que esta barrera no siempre evita el paso del fitoplasma a la semilla, pero si pudiese explicar porque existe un porcentaje tan bajo de plántulas infectadas. La seguridad en los resultados de las pruebas se comprobó por la falta de contaminación del control negativo y por la distribución de los positivos en la reacción, ya que las pruebas positivas se encontraban alternas con otras negativas. El resultado esperado en una contaminación es la aparición de positivos de manera continua. La concentración del ADN del patógeno en las plántulas era baja, por lo que solo se logro detectar a través de PCR anidado. A los dos meses después de germinación las plántulas infectadas no presentaron diferencias fenotípicas con las sanas. Esto se puede deber a la baja concentración del patógeno. En estudios realizados en amarillamiento letal del cocotero, se ha detectado infección por el fitoplasma en plantas jóvenes, pero éstas no manifiestan síntomas hasta alcanzar la madurez (Brown J. 1999, comunicación personal)³. Es probable que en el madreado el desarrollo de la expresión de los síntomas ocurra de manera parecida. En tal caso, las plántulas infectadas desarrollarán los síntomas de la enfermedad cuando alcancen un mayor grado de madurez.

³ Dra. Judith Brown, Universidad de Arizona.

5. CONCLUSIONES

El método optimizado de diagnóstico molecular por la técnica de PCR resulta un método seguro y altamente sensible para detectar el fitoplasma de la EHPG. Con las especificaciones resultantes de este estudio es posible obtener resultados de manera rápida y confiable para detectar si una muestra está o no infectada con el fitoplasma. Las bandas obtenidas por electroforesis resultan claras y definidas, lo que facilita su interpretación.

Las muestras deben ser extraídas el mismo día de la recolección o almacenadas como máximo dos días a 4 °C de temperatura. El mejor método de extracción es el CTAB con doble clarificación. La concentración de los dNTP's (nucleótidos) en la mezcla de PCR debe ser de 1 mM. Las temperaturas de ligamiento son de 56° y 57 °C para PCR directo y anidado respectivamente. La mejor concentración para la gel de electroforesis es de 1 % de agarosa. Los buffers de corrida TAE y TBE no muestran diferencias en su uso, por lo que ambos pueden usarse indistintamente bajo las condiciones de este estudio. El gel puede ser corrido en un rango de 55 a 120 voltios, afectando esto el tiempo de corrida, pero no el calentamiento del buffer ni la definición del gel.

El uso del producto comercial "PCR beads Ready to Go" facilita la realización del diagnóstico, ya que reduce el tiempo de preparación de la prueba y las oportunidades de fallas en el proceso. Además no requiere condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas por lo que son mas seguros y fáciles de conservar.

Existe una relación directa entre la concentración del ADN del fitoplasma y la severidad de los síntomas en la planta. Los síntomas típicos en las plantas con follaje maduro son: hoja pequeña y hoja distorsionada en ramilletes, a menudo acompañados de amarillamiento. En las plantas con follaje en desarrollo (rebrotos) los síntomas típicos son: proliferación de brotes y brotes débiles, los cuales al caer dejan los raquis de las hojas con el aspecto de "cola de serpiente". El síntoma de amarillamiento o clorosis, cuando se encuentra como único síntoma en la planta no resulta confiable para la identificación de la enfermedad.

La ausencia de síntomas no es una prueba confiable para considerar a una planta libre del patógeno. Se puede detectar ADN del fitoplasma en plantas asintomáticas a una concentración baja.

Las procedencias Vaho hondo y Guayabillas mostraron en observaciones generales mayor desarrollo de follaje y altura de la planta. Además en los lotes de estas procedencias se observaron menor número de árboles muertos.

Los posibles vectores de la hoja pequeña son los insectos *Empoasca hastosa*, *Lopidea murray*, *Alconeura sp.*, *Ollarianus sp.*, e *Hydatothrips gliricidiae*. Se consideran como principales candidatos *Empoasca hastosa*, *Alconeura spp.*, y *Ollarianus sp.* por pertenecer a la familia Cicadellidae, la cual cuenta ya con varios vectores comprobados de fitoplasmas. Además *Hydatothrips gliricidiae.*, por resultar positivo en la mayoría de las pruebas realizadas.

Se detectó ADN del fitoplasma en rebrotes de estacas provenientes de plantas infectadas, lo que sugiere que la EHPG puede ser transmitida por propagación asexual. Las estacas de plantas con síntomas severos tienen un bajo porcentaje de enraizamiento. En este sentido la diseminación de la enfermedad es autolimitada. Sin embargo, estacas de plantas asintomáticas infectadas con el patógeno enraízan y desarrollan sin mostrar síntomas de la enfermedad por lo menos hasta los 60 días después de rebrotar. Ya que las estacas son el medio más frecuente de propagación del madreo, estas podrían ser una de las formas más importantes de diseminación de la enfermedad.

Se encontró un bajo porcentaje de transmisión de la enfermedad a través de semilla. En caso de confirmarse estos datos esto afectaría a las poblaciones naturales de madreo, las cuales dependen de la reproducción sexual para propagarse. Aunque el porcentaje de transmisión sea bajo, una planta infectada constituye una fuente de inóculo al resto de la población de madreo que se encuentre en el área. Esto también afecta a las empresas que actualmente se dedican a la recolección y venta de semillas de árboles agroforestales. La recolección y venta de semillas de árboles asintomáticos o con síntomas moderados de la enfermedad puede acelerar la dispersión de la enfermedad hacia las regiones en la que se introduzca la semilla.

6. RECOMENDACIONES

6.1 RECOMENDACIONES POR OBJETIVOS

Optimización del método PCR

Continuar con pruebas de conservación de tejidos de madreado por el método de liofilización. Las actividades que podrían realizarse para la optimización de esta forma de conservación pueden ser : a) Tipo de secado: Secado de la muestra al ambiente, desecación con sílica gel u otro agente secante, aplicación de calor moderado. b) Contenido de humedad en la muestra. c) Temperatura de almacenamiento. Optimizando el método de conservación se lograría una valiosa herramienta para estudios posteriores, ya que sería posible conservar las muestras por un periodo de tiempo mucho mayor.

Determinación de posibles vectores

Continuar con los estudios de transmisión in vivo con los insectos *Empoasca hastosa*, *Lopidea murray*, *Alconeura sp.*, *Ollarianus sp.*, *Hydatothrips gliricidiae*, que presentaron resultados positivos al ADN del fitoplasma con la prueba PCR. Para realizar estos estudios es necesario recolectar individuos de estas especies en arboles de madreado, exponerlos al fitoplasma encerrándolos en jaulas en arboles positivos para en ADN del patógeno. Después de un período prudencial de tiempo, para permitir la incubación del patógeno dentro del insecto, estos se transfieren a plántulas sanas de madreado, dejándolos alimentar de ellas. Posteriormente se realizaría la prueba PCR a las plántulas para comprobar si se dio transmisión del fitoplasma.

Transmisión a través de propagación vegetativa

Realizar un ensayo de mayores dimensiones con estacas de plantas sanas y con diferentes niveles de severidad de la enfermedad. Realizar mediciones de el porcentaje de enraizamiento de las estacas con los diferentes niveles de enfermedad y de la presencia del fitoplasma en los rebrotes obtenidos.

Realizar un seguimiento del desarrollo de los síntomas en las estacas enraizadas positivas para el fitoplasma que se obtuvieron en el presente estudio.

Transmisión por propagación sexual (semillas)

Confirmar los datos obtenidos en este estudio repitiendo el ensayo de transmisión por semillas pero con mayor número de repeticiones. Realizar recolección de semillas de el mayor número posible de árboles sanos y positivos para el fitoplasma.

Estudios de resistencia a la infección con la EHPG

Realizar un estudio de las procedencias de madreado mas resistentes a la transmisión por vectores de la EHPG. Esto se puede realizar germinando semillas de distintas procedencias de madreado y exponiéndolas a el o los vectores cuando estos sean identificados. Posteriormente se realizaran las pruebas de PCR para detectar el porcentaje de las plántulas que resulten infectadas dentro de cada procedencia. Con esto se podría determinar que procedencia de madreado resulta mas adecuada para utilizar como control fitogenético de la enfermedad. Este resultado sería especialmente interesante para las casa comerciales que se dedican a la venta de semillas agroforestales.

Se recomienda probar a las procedencias Vaho Hondo y Guayabillas en condiciones ambientales diferentes de las de Zamorano, y evaluar si continúan presentando características de tolerancia a la EHPG. En condiciones similares a las del estudio, se recomienda la utilización de estas procedencias como medida de control genético de la EHPG.

Caracterización de los síntomas y dispersión de la enfermedad

Se recomienda realizar un seguimiento del desarrollo de los síntomas en los árboles utilizados en este estudio. Comparar los síntomas presentes en plantas jóvenes y maduras, plantas sometidas a corta periódica y plantas no podadas. Monitorear la aparición y avance de la enfermedad en nuevas áreas.

6.2 RECOMENDACIONES GENERALES

Continuar utilizando el método de diagnóstico por PCR para la detección del fitoplasma de la EHPG, ya que presenta las ventajas de ser un sistema altamente confiable y sensible. Utilizar la mezcla comercial PCR beads ready to go, ya que facilitan la realización de la prueba y reduce los riesgos de daño en los reactivos porque no requiere condiciones de congelación para su conservación.

Utilizar el método de diagnóstico para el fitoplasma de la EHPG como modelo para realizar investigaciones en otras enfermedades causadas por fitoplasma, específicamente en la enfermedad del amarillamiento letal del cocotero.

BIBLIOTECA WILSON FORNIA
 ESCUELA AGRICOLA VALLEJO CA
 1996

7. BIBLIOGRAFIA

- AUSBEL, F. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. 3 ed. EE.UU. Wiley. 650 p.
- BOA, E; LENNÉ, J. 1993. Final report R4852 pilot assesment of diseases of important woody legumes in Central America and México. Reino Unido. Natural Resources Institute. 125 p.
- _____. 1996. *Gliricidia sepium* diseases. Reino Unido. Oxford Forestry Institute. 33:19-31.
- BOSTER, L. 1998. Tree species available from The New Forest Project. <http://www.newforesstproject.com/seed.html>.
- BROWN, J. 1998. What is PCR?. <http://flacon.cc.ukans.edu/~jbbrown/pcr.html>.
- CASTAÑO, J. 1994. Principios Básicos de Fitopatología. 2 ed. Zamorano, Hond. Zamorano Academic Press. 518 p.
- CATIE. 1991. Madero negro (*Gliricidia sepium* (Jacquin) Kunth ex Wapers) árbol de uso múltiple en América Central. Costa Rica. Editorial El País. 72 p.
- UNIVERSIDAD DE CORNELL. 1998. Agroforestry uses of *Gliricidia sepium*. <http://eddie.mannlib.cornell.edu/instruction/horticulture/H415/species/glir/overview/gliricid.html>.
- FAO. 1986. Tree growing by rural people. Roma, Italia. 130 p.
- GLOVER, N. 1989. Gliricidia production and use. Hawaii, EE.UU. Nitrogen Fixing Tree Assosiation. 44 p.
- Citado por: STEWARD, J, ALLISON, G; SIMONS, A. 1996. *Gliricidia sepium*, genetic resourses for farmers. Reino Unido. Oxford Forestry Institute. 125 p.
- GOMEZ, M. 1997. Arboles y arbustos forrajeros utilizados en la alimentación animal como fuente proteica. Cali, Col. CIPAV. 80 p.
- GUOZHONG, T; Xijin, Z. 1998. Influence of callose accumulation in the sieve tubes of the phloem of Paulownia on colonization of Witches broom. <http://www.metla.fi/conf/iufro95abs/d5pap132.htm>.

HARRIS, K. 1968. Leafhopper Vector and Plant Disease Agents. Nueva York, EE.UU. Academic Press. 300 p.
Citado por: MOUNT M; LACY, G. 1982. Phytopathogenic Procaryotes. EE.UU. Academic Press. 500 p.

JORDAN, T. 1996. Resistencia genética en *Gliricidia sepium* (Kunth) a la enfermedad de la hoja pequeña, su desarrollo y transmisión. Tesis Lic. Zamorano, Hond. Programa de Ingeniería de Zamorano/EAP. 68 p.

KEYON, L; BLACK, R; DOYLE, P. 1996. Diseases of *Gliricidia sepium* in Latin América. Reino Unido. Natural Resources Institute. 150 p.

LEE, M. Phytoplama home page. 1998.
<http://plantpath.wisc.edu/~soyhome.pp/phyhome.htm>

MAXWELL Y MAXWELL. 1998. Symptom, transformation of tissue.
<http://www.wisc.edu/plantpath/pp300/docs/conefl.html>.

MODGE, R. 1995. Agroforestry uses of *Gliricidia sepium*.
<http://eddie.mannlib.cornell.edu/instruction/horticulture/H415/species/gkir/overview/gkirid.html>

MOUNT M; LACY, G. 1982. Phytopathogenic Procaryotes. EE.UU. Academic Press. 500 p.

OHLER, J. 1986. El cocotero, árbol de vida. FAO. Producción y Protección Vegetal No. 57. 236 p.

RAYCHAUDHURI, S. 1998. Mycoplasma Cell and Molecular Biology.
<http://www.vet.uga.edu/erc/mycoplasma/>.

SCHALL, R. 1997. Biotechnology laboratory technician training program, PCR methods, a short course. EE.UU. The Madison Area technical College. 124 p.

SCHROTH, G; BALLE, P; PELTIER, T. 1995. Alley cropping groundnut with *Gliricidia sepium* in cote d'Ivoire: effects on yields, microclimate and crop diseases. Agroforestry Systems. 29 (2): 147-163.

Citado por: STEWARD, J, ALLISON, G; SIMONS, A. 1996. *Gliricidia sepium*, genetic resources for farmers. Reino Unido. Oxford Forestry Institute. 125 p.

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

WHELLOCK, J. 1998. La cocina nicaragüense. Managua, Nicaragua. Editorial Nueva Nicaragua. 250 p.

YAMOA, C; AGBOOLA, A; MULONGOY, K. 1986. Decomposition, nitrogen release and weed control by prunnings of selected alley cropping shrubs. *Agroforestry Systems*. 4:239-254.

Citado por: CATIE. 1991. Madero negro (*Gliricidia sepium* (Jacquin) Kunth ex Wapers) árbol de uso múltiple en América Central. Costa Rica. Editorial El País. 72 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. PROTOCOLOS DE PCR UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

Protocolo para amplificación de ADN de fitoplasma de tejidos de *Gliricidia sepium* (Harrison y Kenyon)

Extracción de ADN. Método Harrison.

Buffer CTAB de extracción 1

Calentar a 60 °C antes de usar

2 % CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

100 mM Tris-HCl pH 8 (trisma base)

20 mM EDTA pH 8 (ácido etilenodiaminotetraacético)

1.4 M NaCl

1% Polyvinilpirrolidona

0.2 % β-mercaptoetanol (añadir justo antes de usar)

Buffer CTAB 2

10% CTAB

0.7 M NaCl

Mezcla cloroformo/isoamil alcohol (24:1)

Cloroformo 240 ml

Alcohol isoamílico 10 ml

TE alto en sal

10 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA

1 M NaCl

Isopropanol

Etanol

Equipo

Morteros y pistilos estériles

Nitrógeno líquido

Arena ultrapura de cuarzo

Micropipetas

Puntas de micropipetas

Tanque de baño María

Tubos de microcentrífuga

Microcentrífuga

Método de extracción

1. Macere el material en un mortero, use nitrógeno líquido si esta disponible
2. Añada igual volumen de buffer de extracción CTAB 1 a 60 °C (e.g. 200 mg de tejido - 200µl de buffer)
3. Incube a 60 °C por 30 min
4. Añada igual volumen de cloroformo/isoamil alcohol 24:1 (e.g. 400µl+ 400µl)
5. Mezcle bien
6. Centrifugue por 5 min (5000rpm)
7. Remueva el sobrenadante y colóquelo en otro tubo
8. Añada 1/10 del volumen del buffer CTAB 2 al sobrenadante (e.g. 30µl+ 300µl)
9. Repita los pasos 4,5,6,7
10. Añada 2/3 del volumen de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos
11. Centrifugue 5 min
12. Descarte el líquido dejando el sedimento de ADN en el fondo del tubo
13. Seque al aire el sedimento por 30 min
14. Resuspenda el sedimento en 100 µl de TE alto en sal
15. Añada 2.5 volúmenes de Etanol frío para precipitar el ADN
16. Centrifugue por 5 min
17. Descarte el líquido, dejando el sedimento en el fondo del tubo
18. Seque el sedimento
19. Lave el sedimento con etanol al 70% frío
20. Resuspenda el sedimento en buffer TE

Reacción en cadena de la polimerasa iniciadores P1 y P7

Mezcla para la reacción

2 µl del template de ADN
0.5 µM de cada iniciador (P1 y P7)
100 µM de cada dNTP
2.5 mM MgCl₂
1 unidad de Taq polimerasa
1x buffer de PCR

Aceite mineral

Equipo

Micropipetas y puntas estériles
Tubos de PCR
Termociclador

Selle cada reacción con una gota de aceite mineral.

Primer ciclo

Denaturalización	94 °C	2 min
Ligamiento	54 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

28 ciclos

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	54 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

Ciclo final

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	54 °C	50 seg
Extensión	72 °C	5 min

Número total de ciclos = 30

Reacción en cadena de la polimerasa iniciadores PP/Gllf y PP/GllrMezcla para la reacción

2 μ l del template de ADN
0.5 μ M de cada iniciador (PP/Gllf y PP/Gllr)
100 μ M de cada dNTP
2.5 mM MgCl₂
1 unidad de Taq polimerasa
1x buffer de PCR

Aceite mineralEquipo

Micropipetas y puntas estériles
Tubos de PCR
Termociclador

Selle cada reacción con una gota de aceite mineral.

Primer ciclo

Denaturalización	94 °C	2 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

28 ciclos

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

Ciclo final

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	5 min

Reacción en cadena de la polimerasa iniciadores R16M1 y R16M2

Mezcla para la reacción

2 µl del templete de ADN
 0.5 µM de cada iniciador (R16M1 y R16M2)
 100 µM de cada dNTP
 2.5 mM MgCl₂
 1 unidad de Taq polimerasa
 1x buffer de PCR

Aceite mineral

Equipo

Micropipetas y puntas estériles
 Tubos de PCR
 Termociclador

Selle cada reacción con una gota de aceite mineral.

Primer ciclo

Denaturalización	94 °C	2 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

28 ciclos

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

Ciclo final

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	5 min

Reacción en cadena de la polimerasa iniciadores PPWB16sf y PPWB16sr

Mezcla para la reacción

2 µl del templete de ADN
 0.5 µM de cada iniciador (PPWB16sf y PPWB16sr)
 100 µM de cada dNTP
 2.5 mM MgCl₂
 1 unidad de Taq polimerasa
 1x buffer de PCR

Aceite mineral

Equipo

Micropipetas y puntas estériles
 Tubos de PCR
 Termociclador

Selle cada reacción con una gota de aceite mineral.

Primer ciclo

Denaturalización	94 °C	2 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

28 ciclos

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	2 min

Ciclo final

Denaturalización	94 °C	1 min
Ligamiento	55 °C	50 seg
Extensión	72 °C	5 min

Método de extracción de ADN de insectos

Colocar 200 μ l de buffer CTAB de extracción en un tubo de microcentrífuga
 Añada un insecto por tubo
 Macere el insecto en pequeños pedacitos
 Incube por 30 min a temperatura ambiente
 Añada 200 μ l de cloroformo isoamil alcohol 24:1
 Mezcle bien
 Centrifugue por cinco min a 5000rpm
 Transfiera la fase acuosa a un tubo nuevo
 Añada igual volumen de isopropanol
 Incube por 20 a 30 min
 Centrifugue por 5 min a 5000 rpm
 Bote el líquido dejando el sedimento en el fondo del tubo
 Deje secar a temperatura ambiente por 30 min
 Resuspenda el sedimento en 50 μ l de agua bidestilada

Se puede amplificar el ADN con cualquiera de los iniciadores para el fitoplasma de la EHPG, especialmente con el B32.

Reacción en cadena de la polimerasa iniciadores B32f y B32r

Mezcla para la reacción

2 μ l del templete de ADN
 0.5 μ M de cada iniciador (B32f y B32r)
 100 μ M de cada dNTP
 2.5 mM MgCl₂
 1 unidad de Taq polimerasa
 1x buffer de PCR

Aceite mineral

Equipo

Micropipetas y puntas estériles
 Tubos de PCR
 Termociclador

Selle cada reacción con una gota de aceite mineral.

Primer ciclo

Denaturalización	94 °C	90 seg
Ligamiento	60 °C	50 seg
Extensión	72 °C	80 seg

38 ciclos

Denaturalización	94 °C	30 seg
Ligamiento	60 °C	50 seg
Extensión	72 °C	80 seg

Ciclo final

Denaturalización	94 °C	30 seg
Ligamiento	60 °C	50 seg
Extensión	72 °C	8 min

Número total de ciclos = 40

Anexo 2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Método CTAB modificado por Harrison.

Buffer CTAB de extracción 1

Calentar a 60 °C antes de usar
 2 % CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)
 100 mM Tris-HCl pH 8 (trisma base)
 20 mM EDTA pH 8 (ácido etilendiaminotetraacético)
 1.4 M NaCl
 1% Polyvinilpirrolidona
 0.2 % β-mercaptoetanol (añadir justo antes de usar)

Buffer CTAB 2

10% CTAB
 0.7 M NaCl

Mezcla cloroformo/isoamil alcohol (24:1)

Cloroformo 240 ml
 Alcohol isoamílico 10 ml

TE alto en sal

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

Isopropanol

Etanol

Equipo

Morteros y pistilos estériles
 Nitrógeno líquido
 Arena ultrapura de cuarzo
 Micropipetas
 Puntas de micropipetas
 Tanque de baño María
 Tubos de microcentrífuga
 Microcentrífuga

Procedimiento

1. Macere el material en un mortero, use nitrógeno líquido si esta disponible
2. Añada igual volumen de buffer de extracción CTAB 1 a 60 °C (e.g. 200 mg de tejido - 200µl de buffer)
3. Incube a 60 °C por 30 min
4. Añada igual volumen de cloroformo/isoamil alcohol 24:1 (e.g. 400µl+ 400µl)
5. Mezcle bien
6. Centrifugue por 5 min (5000rpm)
7. Remueva el sobrenadante y colóquelo en otro tubo
8. Añada 1/10 del volumen del buffer CTAB 2 al sobrenadante (e.g. 30µl+ 300µl)
9. Repita los pasos 4,5,6,7
10. Añada 2/3 del volumen de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos
11. Centrifugue 5 min
12. Descarte el líquido dejando el sedimento de ADN en el fondo del tubo
13. Seque al aire el sedimento por 30 min
14. Resuspenda el sedimento en 100 µl de TE alto en sal
15. Añada 2.5 volúmenes de Etanol frío para precipitar el ADN
16. Centrifugue por 5 min
17. Descarte el líquido, dejando el sedimento en el fondo del tubo
18. Seque el sedimento
19. Lave el sedimento con etanol al 70% frío
20. Resuspenda el sedimento en agua bidestilada

Método CTAB Doyle y Doyle

Buffer de extracción CTAB

NaCl (1.4 M)
EDTA (20 mM)
Trizma base (100 mM)
0.2 % 2- mercaptoetanol (añadir justo antes de usar)

Buffer de lavado

Etanol al 95% (76%)
NH₄OAc a 8 M (10 mM)

Buffer TE

Trizma base (10mM)
EDTA (1mM)
Ph 8 (agregar HCl para ajustar pH)

Procedimiento

1. Pese 0.2 g de tejido de la planta
2. Macere el tejido en un mortero usando arena y nitrógeno líquido. No permita que el tejido se derrita
3. Agregue 800 µl de buffer CTAB en el mortero. Mezcle con el tejido y traspáselo a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
4. Deje incubar a 60 °C por 30 min
5. Enfríe los tubos a temperatura ambiente
6. Añada igual volumen de cloroformo isoamil /alcohol 24:1
7. Centrifugue a 9000rpm por 10 min
8. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo
9. Añada 2/3 volúmenes de isopropanol frío
10. Incube toda la noche a temperatura ambiente
11. Centrifugue a 9000 rpm por 10 min
12. Descarte el sobrenadante, dejando el sedimento en el fondo del tubo
13. Añada 100µl de buffer de lavado frío, resuspenda el sedimento
14. Centrifugue a 9000 rpm por 5 min
15. Deje secar el sedimento por 30 min
16. Resuspenda en agua bidestilada

Anexo 3. INICIADORES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

P1 y P7

Secuencia

P1= 5' - AAGAGTTTGATCCTGGCTAGGATT- 3'

P7= 5' - CGTCCTTCATCGGCTCTT- 3'

Temperatura de ligamiento

55°C

Especificidad

Universal, amplifica la región del gen para 16S rARN, la región espaciadora del gen 16S ARN y el gen 23S ARN y 30 bases del extremo 5' del gen 23S rARN, presente en todos los fitoplasmas.

Tamaño de banda

1.8 kpb.

PP/GLI f y PP/GLI r

Secuencia

F= 5' - GTCGAACGGAAACCTTAG- 3'

R= 5' - ACGGCTCCTCTTCTAAC- 3'

Temperatura de ligamiento

56 °C

Especificidad

Específico para el grupo de fitoplasmas causantes de la escoba de bruja en *Cajanus cajan* y la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Amplifica una región interna del gen 16S rARN, por lo que puede ser usado para PCR anidado de productos de amplificación con los iniciadores P1 yP7.

Tamaño de banda

1.4 kpb.

PPWB16s f y PPWB16s r

Temperatura de ligamiento

56°C

Especificidad

Específico para el grupo de fitoplasmas causantes de la escoba de bruja en *Cajanus cajan* y la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Amplifica una región interna del

gen 16S rARN, por lo que puede ser usado para PCR anidado de productos de amplificación con los iniciadores P1 y P7.

Tamaño de banda
1.5 kpb

R16M f y R16M r

Temperatura de ligamiento
56°C

Especificidad

Universal para fitoplasmas. Amplifica una región del gen 16S rARN presente en todos los fitoplasmas. Puede ser empleado para PCR anidado de productos de los iniciadores P1 y P7.

B32 f y B32r

Secuencia

F= 5'- GACTCAAGGAGAAAGCAGAAC- 3'

R= 5'- GGTAATTAATAGGCGGCAG- 3'

Temperatura de ligamiento
56°C

Especificidad

Altamente específico para el grupo de fitoplasmas causantes de la escoba de bruja en *Cajanus cajan* y el fitoplasma de la hoja pequeña de *Gliricidia sepium*. Por su alta especificidad se puede someter a un mayor número de ciclos de amplificación sin obtener productos no específicos, aumentando la sensibilidad de la prueba.

Secuencia del gen 16S rARN y la región espaciadora 16/23S rARN del fitoplasma de la hoja pequeña de la *Gliricidia*.

```

1  AGTTTGATCC TGGCTCAGGA TTAACGCTGG CGGCGCGCCT AATACATGCA
51  AGTCGAACGG AAACCTTAGG GTTTTAGTGG CGAACGGGTG AGTAACACGT
101 AAGCAACCTG CCTTTAAGAC GTGGATAACA TTTTAAAAG GTTGCTAAGA
151 CAGGATAGGA AATTAAGAGG CATCTTTTAA TTTTAAAAG A ACCTTTTTCG
201 AAAGGTATAC TTAAAGAGGG GCTTGCGCCA CATTAGTTAG TTGGTAAGGT
251 AAAAGCTTAC CAAGACGATG ATGTGTAGCT GGTCTGAGAG GTCGAACAGC
301 CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACCTC CTACGGGAGG CAGCAGTAAG
401 TGAAGTACTT CGGTATGTAA AGTTCTTTTA TTGAAAAAGA AAAAATAGTG
451 GAAAAACTAT CTTGACATTA TTCAATGAAT AAGCCCCGGC TAATTATGTG

```

501 CCAGCAGCCG CGGTAATACA TAAGGGGCGA GCGTTATCCG GAATTATTGG
551 GCGTAAAGGG TGCGTAGGTG GTTTGATAAG TCTATAGTTT AAATGCAGTG
601 CTTAACGCTG TAGCGCTATA GAAACTGTCT GACTAGAGTT AGATAGAGGC
651 AAGCGGAATT CCATGTGTAG CGGTAAAATG CGTAAATATA TGGAGGAACA
701 CCAGAGGCGT AGGCGGCTTG CTGGGTCETA ACTGACGCTG AGGCACGAAA
751 GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG
801 ATGAGTACTA AGTGTCGGGT TTTGACTCGG TACTGAAGTT AACACATTAA
851 GTRACTCCGCC TGAGTAGTAC GTACGCAAGT ATGAAACTTA AAGGAATTGA
901 CGGGACCCCG CACAAGCGGT GGATCATGTT GTTTAATTCG AAGATACACG
951 AAAAACCTTA CCAGGTCTTG ACATAATTTT GCGACATTAT AGAAATATAA
1001 TGAAGGTTAT CAGAATTACA GGTGGTG CAT GGTTGTCGTC AGCTCGTGTC
1051 GTGAGATGTT AGGTTAAGTC CTAAAACGAG CGCAACCCTT GTCGTTAGTT
1101 GCGACCACGT AATGGTGAGC ACTTTAGCGA GACTGCCAAT GAAAAATTGG
1151 AGGAAGGTGA GGATTACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG ATCTGGGCTA
1201 CAAACGTGAT ACAATGACTG TTACAAAGAG TAGCTGTAAC GTGAGTTTAT
1251 GGCCAATCTC AAAAAACAG TCTCAGTTCG GATTGAAGTC TGCAACTCGA
1301 CTTACTGAAG TTGGAATCGC TAGTAATCGC GAATCAGCAT GTCGCGGTAA
1351 ATACGTTCTC GGGGTTTGTA CACACCGCCC GTCAAACCAC GAAAGTTGAT
1401 AATACCCGAA AGCGGTCCG TAACTTCGTT AGAAGAGGGA GCCGTCTAAG
1451 GTAGGATCGA TGATTGGGGT TAAGTCGTAA CAAGGTATCC CTACCGGAAG
1501 GTGGGGATGG ATCACCTCCT TTCT

Anexo 4. SISTEMA DE EVALUACION DE LA ENFERMEDAD

(Creado por el Dr. Erick Boa, NRI)

1- Distribución

General: Párese enfrente del árbol y divida la copa en cuartos. Marque los cuartos que presenten amarillamiento, muerte de ramas y hojas pequeñas.

2- Intensidad

General: La intensidad reporta la cantidad de desarrollo del daño o de un síntoma clave. Si existe confusión sobre que puntaje darle, se debe utilizar el más bajo.

0 = No presenta daño 1= Menor (menos de 25%) 2= Moderado (25 a 50%) 3= Severo (más del 50%)

3- Características de la enfermedad

General: Se necesita comparar los distintos tipos de síntomas presentes en las diferentes procedencias y poblaciones de árboles y distintas épocas del año.

Amarillamiento: 0= No presente 1= distintas áreas de la copa 2- general a lo largo de la copa 3= solo en la punta de las ramas

Reducción de hojas: 0= no hay 1= Follaje reducido en un 50% 2= reducción mayor a un 50%

Proliferación de brotes: 0= no presenta 1= ninguna 2= presente sólo en pocas ramas enfermas 3= presente en muchas ramas enfermas

Distorsion: 0= no presente 1= ninguna 2= presente en pequeños ramilletes

Largo del entrenudo: 0= no presente 1= reducción es menor del 50% del largo normal 2= reducción es mas del 50% del largo normal

Caida de hojas: 0= no presente 1= ninguna 2= poca, usualmente de brotes jóvenes en ramas con hoja pequeña 3= mucha, en toda la copa

Anexo 5. Datos de todas la pruebas

Caracterización de síntomas

Muestra	Síntomas	16/01/1999 P1 y 7		18/01/1999 P1 y 7		20/01/1999 P1 y 7		21/01/1999 B32	
		PCRdirecto1	Intensidad1	PCRdirecto2	Intensidad2	PCRdirecto3	Intensidad3	PCRdirecto4	Intensidad4
Vaho hondo S1		negativo		negativo		negativo		negativo	
Vaho hondo M1	HD, BD (50%)	positivo	débil	positivo	débil	positivo	débil	positivo	débil
Vaho hondo SE1	HD, PB, CS, HP	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
Vaho hondo S2		negativo		negativo		negativo		negativo	
Vaho hondo M2	HD, HP, PB (60%)	positivo	moderado	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	moderado
Vaho hondo SE2	HD, HP	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
Vaho hondo S3		negativo		negativo		negativo		negativo	
Vaho hondo M3	HD, HP (60%)	positivo	moderado	positivo	moderado	positivo	moderado	positivo	moderado
Vaho hondo SE3	AM, HD, HP, PB	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
Retalhuleu SE1	HP, AM, PF	positivo	débil	positivo	débil	positivo	débil	positivo	moderado
Retalhuleu S2	PF	negativo		negativo		negativo		negativo	
Retalhuleu M2	HD, HP, PB (50%)	positivo	moderado	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
Retalhuleu SE2	PB, CS, BD, HP	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
Retalhuleu M3	AM 50%	negativo		negativo		negativo		negativo	
Retalhuleu SE3	HP, BD, PB	positivo	débil	positivo	débil	positivo	débil	positivo	moderado
Guayabillas S1	mw, at	negativo		negativo		negativo		negativo	
Guayabillas M1	HP, HD (50%), at, mw, mn	positivo	moderado	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
Guayabillas S2	mw, at	negativo		negativo		negativo		negativo	
Guayabillas M2	DL, AM, 60%	negativo		negativo		negativo		negativo	
San mateo SE1	MR, HP, PF, at	negativo		positivo	débil	positivo	débil	positivo	débil
San mateo S2	md, AM, PF	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
San mateo M2	HD, HP (60%)	negativo		positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte
San mateo SE2	HP, AM	positivo	moderado	positivo	fuerte	positivo	fuerte	positivo	fuerte

HD= Hoja distorsionada
 PB = proliferación de brotes
 CS= cola de serpiente
 HP= hoja pequeña
 BD = brotes débiles

AM = amarillamiento
 DL = hoja ligeramente distorsionada
 PF = pérdida de follaje

mw= mildew
 at= antracnosis
 mn= minador

Pruebas de PCR a insectos

Fecha	Descripción	PCR directo	Intensidad	PCR anidado	Intensidad
30/7/98	<i>Hydatothrips gliricidae</i>	Positivo	moderada		
30/7/98	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Producto inespecífico	moderada		
30/7/98	<i>Empoasca hastosa</i>	Negativa			
30/7/98	Membracido	Negativa			
30/7/98	Áfido	Negativa			
3/9/98	<i>Hydatothrips gliricidae</i>	Positivo	débil		
3/9/98	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Producto inespecífico	moderada		
20/1/99	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Positivo	débil		
20/1/99	<i>Hydatothrips gliricidae</i>	Negativa			
20/1/99	<i>Alconeura sp.</i>	Producto inespecífico	débil		
20/1/99	<i>Empoasca hastosa</i>	Producto inespecífico	moderada		
20/1/99	<i>Ollarianus sp.</i>	Positivo	moderada		
28/1/99	<i>Empoasca hastosa</i>	Negativa			
28/1/99	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Negativa			
28/1/99	Membracido	Negativa			
28/1/99	<i>Empoasca sp</i>	Negativa			
28/1/99	Fulgórico	Negativa			
28/1/99	Fulgórico	Negativa			
28/1/99	<i>Empoasca sp</i>	Negativa			
28/1/99	Membracido	Negativa			
36/05	<i>Hydatothrips gliricidae</i>	Negativa		Positiva	Fuerte
9/2/99	Membracido	Negativa		Negativa	
9/2/99	Mosca blanca	Negativa		Positiva	Fuerte
9/2/99	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Empoasca hastosa</i>	Negativa		Negativa	
9/2/99	Membracido	Negativa		Positiva	Fuerte
9/2/99	Pentatomide	Negativa		Negativa	
9/2/99	Membracido	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Empoasca hastosa</i>	Negativa		Positiva	Muy fuerte
9/2/99	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Negativa		Negativa	
9/2/99	Membracido	Negativa		Negativa	
9/2/99	Membracido	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Empoasca sp</i>	Negativa		Negativa	
9/2/99	Membracido	Negativa		Negativa	
9/2/99	Saltahojas verde metálico	Negativa		Positiva	Muy fuerte
9/2/99	Membracido	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Lopidea murray</i> (Lepidoptera: Miridae)	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Alconeura sp.</i>	Negativa		Positiva	Muy fuerte
9/2/99	<i>Hydatothrips gliricidae</i>	Negativa		Positiva	Muy fuerte
9/2/99	<i>Empoasca hastosa</i>	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Ollarianus sp.</i>	Negativa		Negativa	
9/2/99	<i>Empoasca sp.</i>	Negativa		Negativa	

Pruebas de PCR para el estudio de transmisión por semilla.

Muestra	PCR directo	Intensidad	PCR anidado	Intensidad
Planta sana				
A	negativo		negativo	
B	negativo		negativo	
C	negativo		negativo	
D	negativo		negativo	
E	negativo		negativo	
F	negativo		negativo	
G	negativo		negativo	
H	negativo		negativo	
I	negativo		negativo	
J	negativo		negativo	
Planta enferma 1				
K	negativo		negativo	
L	negativo		negativo	
M	negativo		negativo	
N	negativo		negativo	
O	negativo		positivo	fuerte
P	negativo		negativo	
Q	negativo		negativo	
R	negativo		negativo	
S	negativo		positivo	débil
T	negativo		negativo	
Planta enferma 2				
U	negativo		negativo	
V	negativo		positivo	moderada
W	negativo		negativo	
X	negativo		negativo	
Y	negativo		negativo	
Z	negativo		negativo	
AA	negativo		negativo	
AB	negativo		negativo	
AC	negativo		negativo	
AD	negativo		negativo	
Planta enferma 3				
AE	negativo		negativo	
AF	negativo		negativo	
AG	negativo		negativo	
AH	negativo		negativo	
AI	negativo		negativo	
AJ	negativo		negativo	
AK	negativo		negativo	
AL	negativo		negativo	
AM	negativo		negativo	
AN	negativo		negativo	

Pruebas de PCR en las estacas

Fecha	Muestra	Descripción*	PCRdirecto	Intensidad	PCRanidado	Intensidad
3/2/99	1	Pantanal 22	negativo		negativa	
	2	Triá Tania	positivo	moderada	positiva	fuerte
	3	Pantanal 22	negativo		positiva	fuerte
	4	Pantanal 22	negativo		positiva	fuerte
	5	Pantanal 22	negativo		positiva	fuerte
	6	Pantanal 22	negativo		positiva	fuerte

* Pantanal 22 = asintomático

Triá Tania = síntomas severos

Porcentaje de germinación			
Procedencia	Est.sembradas	Est.enraizadas	
Triá Tania	15	1	6.67
Pantanal 21	15	7	46.67

Anexo 6

Glosario de Biotecnología

- **Acido nucleico:** grandes polímeros biológicos (ADN o ARN) hechos de nucleótidos.
- **ADN :** ácido desoxirribonucleico. En la mayoría de organismo el ADN lleva la información genética primaria, es un polímero que consiste en cadenas largas de nucleótidos. Cada nucleótido consiste en una base ligada a un azúcar (deoxirribosa) y una molécula de fosfato.
- **ADN polimerasa:** enzima que cataliza la producción de moléculas de ácido nucleico
- **Agrobacterium tumefaciens:** una bacteria que naturalmente es capaz de transferir información genética a las células de las plantas.
- **Antibiótico:** una sustancia que mata o previene el crecimiento de bacteria que es usualmente producida por otras bacterias u hongos, e.g. Penicillium. También se pueden hacer sintéticamente.
- **Anticuerpo:** una proteína hecha por el sistema inmune que ataca a un antígeno específico.
- **Bacteria:** un organismo relativamente simple que consiste en una célula, sin núcleo y el ADN citoplásmico es libre dentro del citoplasma en forma de un anillo.
- **Base (de ácido nucleico):** una de las subunidades químicas que se encuentran en moléculas de ácido nucleico las cuales (en tríos) llevan la codificación para un aminoácido particular. En ADN, las bases son adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). Uracilo (U) se encuentra en lugar de la timina en las moléculas de ARN.
- **cADN (ADN complementario):** una cadena de ADN sintetizada de ARN por la acción de la enzima transcriptasa reversa (Nota: esto es al revés de la situación usual en que la secuencia de ADN determina la molécula de ARN).
- **Célula:** la menor subunidad, capaz de divisiones independientes, de la cual los seres vivientes se componen.
- **Ciclo de amplificación:** conjunto de los tres pasos de PCR, desnaturalización, ligamiento y extensión que resultan en la obtención del doble de la cantidad de ADN inicial en la reacción.
- **Citoplasma:** el material que se encuentra dentro de la membrana celular que rodea al núcleo.
- **Codon:** un grupo de tres bases en el ácido nucleico que codifican para un aminoácido particular o que actúan como señales para parar o empezar la "lectura" de un gen, a veces referidos como tríos o tripletas.
- **Complementariedad (de bases):** los pares específicos de bases en las moléculas de ácido nucleico, entre adenina y timina (o Uracilo en ARN) y citosina y guanina.
- **Cromosoma:** la estructura que contiene ADN y lleva la información genética. Los humanos tenemos 23 pares de cromosomas en las células somáticas, un par proveniente de cada padre. En los eucariotes, el ADN está asociado a las proteínas (histonas), mientras que en los procariotes (bacterias), el cromosoma es un anillo sin proteínas asociadas.
- **Desnaturalización:** separación de la doble cadena de ADN por efecto del calor.

- dNTP: las unidades de las cuales está compuesto el ADN (adenina, guanina, timina y citosina).
- Doble hélice: la estructura tridimensional del ADN, en la cual dos cadenas están colocadas en forma de una hélice hacia la derecha. Las dos se unen mediante los pares de bases, y normalmente hay unos 10 pares de bases por vuelta de la hélice.
- Electroforesis: una técnica para separar fragmentos de diferente tamaño de ADN, basado en su movilidad en un campo eléctrico. Ya que los fragmentos de ADN generalmente llevan carga negativa, ellos se mueven relativamente lento, donde piezas pequeñas se mueven rápido.
- Enzima: un catalizador proteico que acelera una reacción química altamente específica.
- Extensión: acoplamiento de nucleótidos libres a sus nucleótidos complementarios en una cadena de ADN.
- Fasciculación: Formación de estructuras normales en lugares que no le corresponde, e.g. brotes vegetativos en flores.
- Fenotipo: todas las características de un organismo que pueden ser determinadas sin pruebas genéticas. Todas las características visibles que resultan de la interacción de efectos genéticos y ambientales.
- Fitoplasma: organismo procariota parecido a una bacteria sin pared celular, restringido a los tubos de floema de las plantas presuntos causantes de numerosas enfermedades conocidas genéricamente como amarillamientos.
- Gel de agarosa: un gel firme hecho de agarosa, un derivado altamente puro de agar (proveniente de algas). Es usado en electroforesis de pedazos relativamente grandes de ADN.
- Gen: unidad de la herencia que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una posición específica dentro del genoma.
- Gen rRNA 16 S y 23 S: gen específico del material genético de los fitoplasmas, usado para diferenciarlos de otros organismos
- Genoma: el set completo de cromosomas que lleva una célula sexual.
- Genotipo: la composición genética de un organismo.
- Haploide: la mitad del número usual de cromosomas e.g. espermatozoides y óvulos son haploides.
- Homólogos (cromosomas o ADN): similitud debida a una relación entre los genes. Así un gen normal y su derivado mutante, o dos cromosomas con exactamente el mismo arreglo de genes, pero posiblemente difiriendo en la información dada por la mutación, se dice que son homólogos.
- Hormona de crecimiento: es una proteína producida por la glándula pituitaria que controla el crecimiento de las células.
- Ingeniería genética: también llamada manipulación genética. Es la producción de nuevas combinaciones de material genético transfiriendo ADN a un organismo en el cual normalmente no se encuentra en forma natural.
- Iniciador: en la síntesis de ADN, una pieza pequeña de ADN de una sola cadena que actúa como inicio para la formación de una cadena complementaria.
- Inmunidad: la habilidad para resistir infecciones o rechazar proteínas foráneas. Está dada por los anticuerpos específicos.

- **Ligamiento:** unión de los iniciadores con sus secuencias complementarias en las cadenas del templete.
- **Ligasa:** una enzima usada para unir las moléculas de ADN.
- **Locus:** lugar específico de un gen o secuencia de ADN en un cromosoma
- **Mapeo genético:** un diagrama que muestra las posiciones relativas de los genes en los cromosomas.
- **Marcador (genético):** una característica distintiva que puede ser usada para identificar un parte de un cromosoma específico.
- **mARN:** ARN mensajero, es una sección de ARN que se transcribe de una molécula de ADN y lleva el código para las secuencias de aminoácidos en una proteína.
- **Núcleo:** la estructura que contiene los cromosomas.
- **Nucleótido:** las partes de que se componen los ácidos nucleicos. Cada uno consiste en una base, un azúcar y un grupo fosfato.
- **Par de bases:** dos bases en diferentes cadenas de ácido nucleico que se juntan se manera reversible. En ADN, la citosina siempre se une a la guanina y la adenina a la timina. En cambio en ARN la adenina se une a Uracilo.
- **PCR anidado:** reamplificación de un producto de PCR utilizando iniciadores internos a los usados en el PCR directo. Se utiliza para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba.
- **PCR beads:** producto comercial que contiene todos los reactivos necesarios para realizar una reacción de PCR excepto el templete.
- **PCR directo:** amplificación de ADN de un organismo
- **Procariote:** organismo que carece de núcleo verdadero.
- **Producto de PCR:** ADN amplificado obtenido después de una reacción de PCR.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** proceso de laboratorio por el cual una secuencia específica de ADN es copiada millones de veces en pocas horas.
- **Secuencia meta:** secuencia dentro del genoma de un organismo complementaria a un iniciador dado y que es amplificado durante el proceso de PCR.
- **Templete:** ADN de la muestra que sirve de molde para la replicación de nuevas cadenas.