

**Zamorano**  
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

BIBLIOTECA WILSON POPERON  
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA  
APARTADO 21  
TEGUIGALPA, HONDURAS

# Estudio epidemiológico a través de pruebas moleculares y bioensayos sobre las formas de transmisión del fitoplasma de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia

Mercedes Andrea Campaña Apolo

MICROISIS:	_____
FECHA:	_____
ENCARGADO:	_____

Honduras: Abril. 2000

#1086

Zamorano  
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Estudio epidemiológico a través de pruebas  
moleculares y bioensayos sobre las formas de  
transmisión del fitoplasma de la Enfermedad  
de la Hoja Pequeña de la Gliricidia**

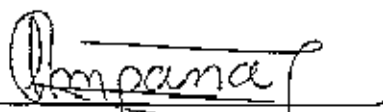
Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado  
Académico de Licenciatura.

Presentado por

**Mercedes Andrea Campaña Apolo**

Honduras: Abril, 2000

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.



Mercedes Andrea Campaña Apolo

Zamorano, Honduras  
Abril, 2000

DEDICATORIA

A mis padres

A mis hermanos

A mi familia

A mis amigos

A Caro, Wendy, Hilda, Ana, J.David

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a mis padres por su confianza, amor y apoyo incondicional. Gracias por haber forjado en mí un carácter fuerte y sembrado en mi vida valores sólidos que hicieron de mí lo que soy y sin los cuales no hubiera podido recorrer este camino.

A mis hermanos, Edgar, Ma Belén y Esther, por creer en mí y nunca dejarme sola.

A toda mi familia por su apoyo y cariño, por no permitir que sintiera que estoy lejos de casa, especialmente mi Abuelita y mi Tía Laste.

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

Al personal del DPV por su ayuda incondicional, especialmente a Chimino, Rosa, Lourdes, Carolina, Karla y Estela.

A mis amigas Isabel, Ma Augusta, Carolina, Daniela y Fernanda porque desde la distancia siempre estuvieron conmigo.

A Carolina Briceño, que más que una amiga es una hermana y más que una hermana es un hogar, por no permitirme que me rinda, por dejarme llorar y hacerme reír. Por ser siempre un ejemplo de coraje y valentía. Por siempre estar en los peores y mejores momentos.

A Juan David Fernández por ser mi refugio, mi amigo, mi estrella y alegría. Porque sin saberlo me dio la fuerza necesaria para levantarme y seguir. Porque su ausente compañía nunca me dejó, siempre en mi mente y en mi corazón.

A Dania, Bárbara, Marisabel, Miguel Ángel, Verónica, Ana Rosa, Rodrigo, Peter, Zoila por su amistad sincera, su apoyo incondicional y por haber sabido soportarme.

A todos mis amigos del Zamorano con los que compartí buenos y malos momentos, y supieron escucharme alguna vez.

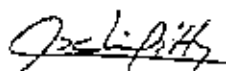
A todas las persona que de una u otra forma hicieron posible la realización de esta tesis y culminación de mi carrera. A todos gracias.

## RESUMEN

Campaña, Andrea. 2000. Estudio epidemiológico a través de pruebas moleculares y bioensayos sobre la transmisión del fitoplasma de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia.

La Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia (EHPG) causada por un fitoplasma se reportó por primera vez en La Soledad, Honduras, en 1992. Los síntomas característicos son amarillamiento, reducción y distorsión de los folíolos, proliferación de brotes y muerte regresiva del árbol en estados severos de la enfermedad. Para poder comprobar las vías de transmisión de la enfermedad, se realizaron tres ensayos y se utilizaron como herramientas básicas de diagnóstico las técnicas moleculares de PCR y electroforesis. Para los ensayos de transmisión por medio de semillas y estacas, se clasificaron 12 árboles padre en cuatro niveles de severidad de la enfermedad. Para comprobar la transmisión por estacas, se recolectaron y sembraron dos estacas de cada árbol padre. El ensayo de transmisión por semillas, se dividió en dos fases, en la primera, semilla de los árboles padre se sembró protegida contra insectos vectores en jaulas, en la segunda fase se analizaron flores y semillas igualmente protegidas contra insectos vectores. Los datos se analizaron utilizando una tabla de contingencia de  $X^2$  para probar la dependencia entre el nivel de severidad de la enfermedad de los árboles y la transmisión del fitoplasma. Se detectó el fitoplasma en 22% de las plántulas, 33% de las flores y 58% de las semillas. En el ensayo de transmisión por estacas, 75% enraizaron y rebrotaron, de las cuales, 89% resultaron positivas para las pruebas de detección del patógeno. Se concluyó que el fitoplasma causante de la EHPG, es transmitido por semilla y estacas de madreado, independientemente del nivel de severidad de la enfermedad del árbol padre. En el tercer ensayo, se trabajó con las especies *Empoasca hastosa* (Homoptera:Cicadellidae) y *Ollariannus* sp. (Homoptera:Cicadellidae), que se creen son posibles vectores de la enfermedad. Este ensayo se dividió en dos fases, en la fase de exposición y adquisición del fitoplasma, la especie *Ollariannus* sp. resultó positiva para las pruebas de detección del fitoplasma, concluyéndose que esta especie es capaz de adquirir el fitoplasma, pero no se pudo comprobar su capacidad para transmitirlo. En la fase de transmisión e incubación del patógeno en el hospedero sano, sólo se usó *E. hastosa*, la cual logró transmitir el fitoplasma.

Palabra Claves: *Empoasca hastosa*, *Gliricidiu sepium*, madreado, *Ollariannus* sp, organismo similar a un mycoplasma (MLO), postulados de Koch, reacción en cadena de la polimerasa.

  
Abelino Pitty Ph.D.

## Nota de Prensa

### ¿Qué se debe hacer para proteger el madreaje?

El madreaje o gliricidia, es un árbol nativo de Centro América, que tiene un gran potencial para ser un pilar en la formación de sistemas agroforestales sostenibles en el trópico. En el año 1992, se reportó por primera vez en La Soledad, Honduras, la enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia, que causa la muerte de este preciado recurso natural. Esta enfermedad, es causada por un organismo parecido a una bacteria que carece de pared celular llamado fitoplasma. Estos patógenos, habitan en el floema de la plantas y hasta el momento sólo se ha reportado que son transmitidos a través de insectos vectores, injertos y puentes biológicos con plantas parásitas.

Zamorano, preocupado por las posibles consecuencias devastadoras de esta enfermedad inició una serie de estudios para lograr caracterizala y así poder formular un plan de manejo adecuado que permita proteger esta especie de gran valor.

Para poder comprender en su totalidad el desarrollo de la enfermedad, fue necesario conocer a plenitud la biología y ecología del organismo causante. Dentro de los aspectos del desarrollo de una enfermedad y su relación con el patógeno, uno de los más importantes es la forma de transmisión de la misma. Determinando exactamente los mecanismos de dispersión del patógeno podemos prevenir y detener su avance.

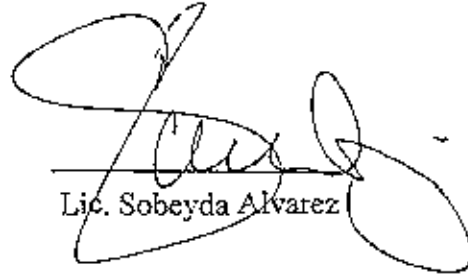
En este estudio realizado desde enero de 1999 hasta abril del 2000, se investigó las formas de transmisión de la enfermedad del madreaje a través de semillas y estacas del árbol; así como también, se iniciaron pruebas para determinar cuál es el insecto vector.

Para lograr estos objetivos, se recolectó semilla y estacas de árboles enfermos, que fueron sembradas para posteriormente realizarles pruebas de detección del patógeno. También se protegieron flores y vainas contra insectos vectores y se realizaron estudios de transmisión con varias especies de saltahojas.

Como conclusión del estudio, se determinó que el fitoplasma causante de la enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia es transmitido mediante la propagación del madreaje por semillas y estacas, sin importar el grado de severidad de la enfermedad en el árbol de donde se obtengan las semillas y estacas.

Este es el primer reporte que se hace sobre la transmisión por semilla de un fitoplasma, ya que debido a su ecología se creía que éstos eran incapaces de llegar hasta la semilla de los árboles.

Los resultados de este estudio, han enriquecido los conocimientos del desarrollo de la enfermedad, los cuales son necesarios para poder formular un plan de manejo apropiado de la misma. El uso tanto de semilla y estacas certificadas que se encuentra libre del patógeno, en combinación con la siembra de procedencias tolerantes a la enfermedad son los pilares del manejo que se le debe dar al madrcado para protegerlo y así poder preservar un valioso recurso natural.



Lic. Sobeyda Alvarez

## CONTENIDO

	Portadilla .....	i
	Autoría .....	ii
	Página de Firmas .....	iii
	Dedicatoria .....	iv
	Agradecimientos .....	v
	Resumen .....	vi
	Nota de Prensa .....	vii
	Contenido .....	ix
	Índice de Cuadros .....	xi
	Índice de Figuras .....	xiii
	Índice de Anexos .....	xiv
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1	SITUACION ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA DEL MADREADO .....	1
1.2	PROPAGACION DE EL MADREADO Y LA TRANSMISION DEL FITOPLASMA .....	2
1.3	TRANSMISION DEL FITOPLASMA POR MEDIO DE VECTORES .....	4
1.4	JUSTIFICACION DEL ESTUDIOS .....	6
1.5	OBJETIVOS .....	6
1.5.1	Objetivo General .....	6
1.5.2	Objetivos Específicos .....	6
<b>2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
2.1	METODOLOGIA PARA EL PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO .....	7
2.2	IDENTIFICACION DEL INSECTO VECTOR .....	8
2.2	COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE SEMILLA .....	10
2.3	COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE MATERIAL VEGETATIVO .....	12
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>13</b>
3.1	IDENTIFICACION DEL INSECTO VECTOR .....	13
3.2	COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE SEMILLA .....	18
3.3	COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE MATERIAL VEGETATIVO .....	21

4.	CONCLUSIONES .....	24
5.	RECOMENDACIONES .....	25
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	27
7.	ANEXOS.....	29

## INDICE DE CUADROS

### Cuadro

1.	Primers universales y específicos para la detección de genes 16S ARN y 23S ARN de fitoplasmas.....	8
2.	Clasificación y nomenclatura de los árboles padres para las pruebas de transmisión.....	11
3.	Resumen de los resultados obtenidos en el bioensayo de identificación del insecto vector.....	15
4.	Analogía entre los Postulados de Koch y las fases del ensayo de transmisión de la EHPG por medio del insecto vector.....	17
5.	Resultados de la Prueba de PCR anidado realizado a la plántulas germinadas de semilla recolectada de árboles con distintos niveles de severidad de la enfermedad.....	18
6.	Porcentaje de transmisión del fitoplasma a plántulas germinadas de semilla recolectada de árboles con distintos niveles de severidad de la enfermedad.....	18
7.	Resultados de la Prueba de PCR anidado realizado a flores de <i>G. sepium</i> protegidas de insectos en jaulas de malla fina.....	19
8.	Porcentaje de transmisión del fitoplasma a flores de <i>G. sepium</i> protegidas de insectos en jaulas de malla fina.....	19
9.	Resultados de la Prueba de PCR anidado realizado a semilla inmadura de <i>G. sepium</i> protegidas de insectos en jaulas de malla fina...	20
10.	Porcentaje de transmisión del fitoplasma a semilla inmadura de <i>G. sepium</i> protegidas de insectos en jaulas de malla fina.....	20
11.	Resultados de la germinación de estacas de <i>G. sepium</i> obtenidas de árboles con diferente nivel de severidad de la enfermedad.....	21

12.	Resultados de la prueba de PCR directo y anidado para la detección del fitoplasma en las estacas germinadas.....	22
-----	--	----

## INDICE DE FIGURAS

### Figura

1.	Brote asintomático (a) y sintomático (b) de <i>G. sepium</i> .....	2
2.	Flujo del proceso para el ensayo de transmisión por insecto vector.....	9
3.	<i>Empoasca hastosa</i> (a) y <i>Ollariannus sp.</i> (b).....	10
4.	Jaula de malla fina en ramas de árbol enfermo (a) y jaula de malla fina para planta sana (b).....	10
5.	Flores (a) y vainas (b) protegidas contra insectos.....	12
6.	Resultados de la fase de exposición y adquisición del fitoplasma por parte de <i>Empoasca hastosa</i> y <i>Ollariannus sp.</i> .....	13
7.	Resultados de la fase de transmisión e incubación del fitoplasma por parte de <i>Empoasca hastosa</i> a la planta hospedera .....	15
8.	Diferencias fenotípicas ente estacas positivas y negativas para la prueba de PCR de detección del fitoplasma causante de la EHPG. PCR directo + (a, b,c,d,e); PCR anidado + (f); PCR negativo (g).....	23

## INDICE DE ANEXOS

	Anexo
1. <b>PROTOSCOLOS DE EXTRACCION DE ADN UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.....</b>	30
2. <b>PROTOSCOLOS DE PCR UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.....</b>	33

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. SITUACION ACTUAL DE LA PROBLEMATICA DE EL MADREADO

*Gliricidia sepium*, localmente conocido como madreado, es un árbol leguminoso de gran importancia dentro de los sistemas agroforestales del trópico Americano. Sus múltiples usos como cerca viva, sombra para cultivos, forraje, insecticida, raticida y planta medicinal, así como también, por sus cualidades de regeneración de suelo erosionado y gran adaptabilidad a condiciones ambientales adversas de sequía y sustrato pobre, lo han convertido en un componente con alto potencial para el desarrollo de un agroecosistema sostenible en el trópico (Duke, 1993).

El madreado es nativo de las zonas costeras con estación seca del Pacífico de México y Centro América. Esta hipótesis esta sustentada en la ecología de la especie, ya que ésta únicamente florece en regiones que tienen una estación seca bien definida. Tiene una amplia distribución, encontrándose actualmente en todo el trópico americano, Africa y Asia. El movimiento de germoplasma y cultivo del madreado se ha dado desde los tiempos precolombinos teniendo un fuerte impacto en los actuales patrones de variación genética de la especie; esto, combinado con el hecho de que casi todas las poblaciones nativas actuales *G. sepium* han sufrido algún tipo de perturbación por la actividad humana, sugiere que existe una alta probabilidad de que la diversidad genética existente no sea suficiente para asegurar una estabilidad ecológica de esta especie (Steward et al. 1996).

Desde mediados de 1970, debido a su gran versatilidad e importancia, el madreado, ha sido objeto de varios estudios internacionales relacionados con sus usos agroforestales y de reforestación. Como resultados de estos estudios, Boa y Lenné (1993), reportaron por primera vez en La Soledad, Honduras una enfermedad cuyos síntomas indicaban una infección por un fitoplasma. Los síntomas característicos de esta enfermedad son amarillamiento, reducción y distorsión de los folíolos, proliferación de brotes y muerte regresiva en estados severos de la enfermedad (Figura 1). A esta enfermedad se le dio el nombre de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia (EHIPG), (Boa y Lenné, 1993).

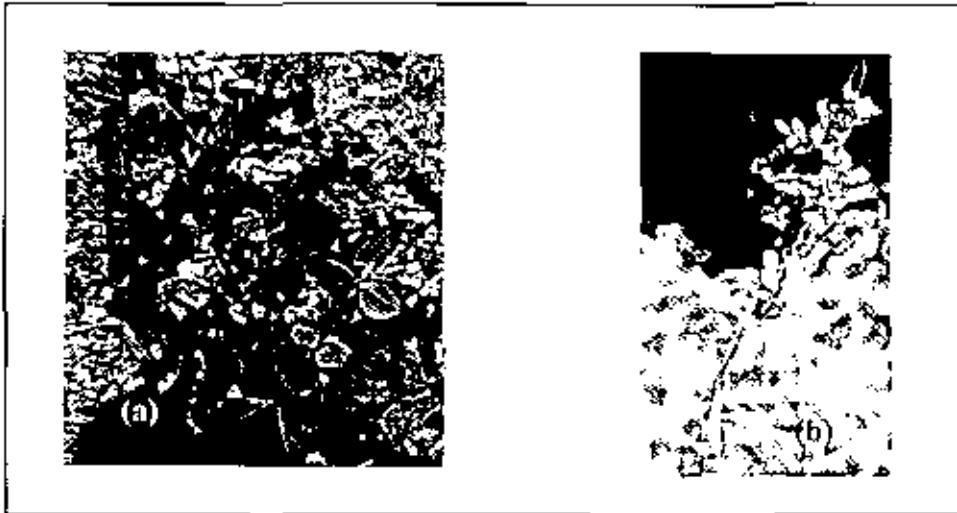


Figura 1. Brote asintomático (a) y sintomático (b) de *G. sepium*.

Kenyon, et al.(1996), confirmaron que el agente causal de la enfermedad era un fitoplasma similar al fitoplasma causante de la enfermedad de escoba de bruja en el frijol gandul (*Cajanus cajan*). Jordán (1996), inició estudios sobre la resistencia genética de *G. sepium* a la EHPG y su transmisión y desarrollo en Zamorano, Honduras. Se encontraron tres procedencias; Guayabillas en Honduras, Vaho Hondo en Guatemala y Belén en Nicaragua con tolerancia a la enfermedad. Saballos (1999) realizó un diagnóstico molecular y estudio de la epidemiología de la EHPG, utilizando como herramienta básica la técnica molecular de Polymerase Chain Reaction (PCR) y Electroforesis. Para la detección del ADN del fitoplasma se utilizaron los primers universales, P1 & P7 y los primers específicos para el grupo de fitoplasmas causantes de la escoba de bruja en *Cajanus cajan* y la EHPG PP/GLL f & r. Como conclusiones de este estudio se determinó que existe una relación directa entre la concentración del ADN del fitoplasma y la severidad de los síntomas en la planta. En observaciones generales, las procedencias de Vaho Hondo y Guayabillas continuaron mostrando mayor desarrollo de follaje y altura de las plantas, así como menor número de árboles muertos. Los estudios de transmisión de la enfermedad mediante material vegetativo y semillas, dieron resultados positivos, encontrándose el ADN del fitoplasma tanto en los brotes de estacas como en plántulas germinadas de semillas.

## 1.2. PROPAGACION DE EL MADREAO Y LA TRANSMISION DEL FITOPLASMA

El madreao, es un árbol que se puede propagar tanto por vía sexual como asexual. La forma más común, es la propagación asexual, que se realiza por medio de estacas de ramas maduras. Se recomienda buscar material con un mínimo de 4 a 12 cm de diámetro y 30 cm de largo, con 1.5 a 2 años de edad (CATIE, 1991). El espaciamiento de la siembra dependerá del objetivo de la misma y uso que se le dará al madreao. La época

más adecuada para el corte y siembra del material es durante los meses de marzo y abril, después de que el árbol haya botado sus hojas y se prepare para florecer. La siembra debe realizarse antes que comience la época de lluvia ya que las estacas son muy susceptibles al ataque de hongos (Saballos, 1999). En condiciones apropiadas, se puede obtener arriba del 90% de germinación. La desventaja principal de este método de propagación es que ha reducido drásticamente la base genética de esta especie, incrementando así su inestabilidad ecológica (Stewart et al., 1996).

La floración de *G. sepium*, es inducida por el periodo seco. En sus zonas de origen, esta comienza a partir del mes de febrero hasta finales de marzo; se recomienda hacer la recolección de semilla a inicios de marzo o en el mes de abril. El almacenamiento de la semilla, si se desea preservarla por más de cuatro años, debe hacerse a una temperatura de 4°C con 12 al 14% de humedad. Si el periodo de siembra será menor a un año, la semilla se puede secar y mantener a temperatura ambiente, protegido adecuadamente de insectos perjudiciales y humedad relativa alta que favorece el crecimiento de hongos saprófitos. En los dos casos, el porcentaje de germinación es mayor al 90% (Gomez 1997).

El movimiento del madreño fuera de su zona de origen comenzó desde la época de la Colonia, extendiéndose actualmente por todo el trópico. A pesar de la amplia distribución que tiene la especie, varios factores indican una base genética reducida. Entre estos factores se puede citar, la falta de una recolección sistemática y apropiada de semilla y la extensa propagación por material vegetativo, especialmente en zonas no nativas en donde no hay producción de flores ni semillas (Stewart et al., 1996).

Es clara la importancia que tiene en una población la variabilidad genética, ya que esta asegura la estabilidad ecológica de la especie. En cuanto a la base genética de *G. sepium*, ésta es una especie de polinización cruzada, principalmente por medio de insectos polinizadores. Es por esto, que se recomienda recolectar semilla de por lo menos 25 árboles diferentes con una distancia mínima de 50 m entre cada uno para evitar consanguinidad. Si se prefiere la propagación por vía vegetativa, se debe tomar la mayor cantidad de árboles padres posible (Stewart et al., 1996).

La transmisión de enfermedades y agentes patógenos de una zona a otra, es otro de los problemas relacionados con el movimiento de germoplasma y propagación de material vegetativo. A lo largo de la historia, han ocurrido repetidos casos, en los cuales se ha introducido un patógeno exótico a nuevas regiones. Este problema en especial, es mayor cuando se refiere a la propagación por semillas o estacas de patógenos tales como virus, fitoplasmas y bacterias (Hawksworth, 1994).

Según Kenyon et al.(1996), la EHPG, se encuentra presente en El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua y probablemente llegue hasta las regiones de Chiapas en México y Costa Rica. El agente causal es un fitoplasma, que son organismos procariotes parecidos a las bacterias, que carecen de pared celular y se encuentran limitados a los tubos cribosos del floema de las plantas (Lee, 1998).

Hasta el momento no se ha podido establecer con claridad, cuáles son los mecanismos específicos de la transmisión de EHPG. Kenyon et al. (1996), concluyeron que la probabilidad de la transmisión por semilla es improbable, principalmente debido a que las semillas de árboles enfermos son poco viables. La literatura reporta que hasta la fecha no existe ningún caso de transmisión por semilla de un fitoplasma, esto se debe a que el embrión de las semillas no tiene conexión con los conductos del floema. Sin embargo, Saballos (1999), reportó la presencia del ADN del fitoplasma en plántulas germinadas de semillas de árboles enfermos. Todavía no se ha podido comprobar que este ADN sea de un fitoplasma infeccioso o viable, ya que no se observan síntomas de la enfermedad ni diferencias fenotípicas entre éstas y las plántulas sanas.

La transmisión de la enfermedad mediante estacas es la más probable, debido a la biología del patógeno, ya que éste se localiza y se restringe a los conductos del floema. Sin embargo, Kenyon et al. (1996), reportaron que en la mayoría de los casos, los brotes de las estacas de árboles enfermos murieron poco tiempo después de germinados. Saballos (1999), encontró ADN del fitoplasma en los brotes de las estacas, el porcentaje de enraizamiento en estacas de árboles afectados severamente disminuía, lo que puede limitar la transmisión del patógeno por este medio.

### 1.3. TRANSMISION DEL FITOPLASMA MEDIANTE VECTORES

Desde el primer reporte de la existencia de los fitoplasmas en 1967, se han atribuido a estos patógenos más de 200 enfermedades del grupo de los amarillamientos que antes se creían causadas por virus. Estas enfermedades se caracterizan por ser transmitidas por saltahojas, injertos y plantas parásitas como la *Cuscuta* sp (Mount y Lacy, 1982).

Se dice que los insectos pueden transmitir todas las clases de agentes patógenos; sin embargo, su papel en relación con el desarrollo de epidemias es más importante en el caso de virus, fitoplasma y espiroplasma (Andrews y Quezada, 1989). Los insectos vectores adquieren el organismo patógeno después de alimentarse de plantas infectadas durante varias horas o días. Usualmente los vectores no transmiten el fitoplasma inmediatamente, necesitan de un período de incubación que dura de 10 a 45 días dependiendo de varios factores, incluyendo aspectos genéticos del vector y condiciones climáticas. Este periodo se necesita para que el organismo se multiplique y distribuya dentro del insecto (Agrios, 1995).

Hasta el momento, solo se ha reportado que organismos habitantes del floema son transmitidos por insectos del orden Hemiptera, particularmente saltahojas de la familia Cicadellidae, que se alimentan de los conductos vasculares del floema (Castaño, 1994). Los fitoplasmas, además de utilizar los vectores para transportarse de planta a planta, los necesitan para penetrar al hospedero. Estos son inyectados al floema por la herida creada por los saltahojas (Mount y Lacy, 1982).

Según Castaño (1994), el patógeno tiene una transmisión circulativa, que implica el paso del organismo a través del aparato digestivo de los insectos y sistema circulatorio de la

glándulas salivares. Los fitoplasmas se desarrollan en el tracto digestivo, hemolinfa, glándulas salivales e intracelularmente en varios órganos corporales de sus insectos vectores (Agrios, 1995). Por lo general, los patógenos que tienen una transmisión circulativa son persistentes. Esto implica que el vector puede transmitir el fitoplasma por largo tiempo sin necesidad de volver adquirir más partículas de las plantas enfermas (Castaño, 1994).

Debido a que la forma de transmisión de los saltahojas es persistente, estos requieren de un periodo de incubación o latencia del patógeno dentro de su organismo; en este periodo es imposible la transmisión del fitoplasma (Nault y Rodriguez, 1985). Por lo general el periodo de incubación de los fitoplasmas va de ocho hasta sesenta días, este tiempo está determinado por las características del insecto vector, el microorganismo, y la planta hospedera (Castaño, 1994).

Dentro de los fitoplasma que causan enfermedades, es rara la transmisión transovárica del organismo en el vector, sin embargo, en los pocos casos que se da, reduce el número de la progenie de las hembras infectadas. La transmisión entre los diferentes estados ninfales es más frecuente (Nault y Rodriguez, 1985).

La interacción entre el insecto vector, el patógeno y el hospedero puede ser un simple proceso mecánico o un complejo sistema biológico. El proceso de transmisión de microorganismos mediante insectos vectores es una adaptación en los organismos involucrados en el mismo, que muchas veces ha implicado un proceso de evolución independiente tanto del insecto vector como del microorganismo transmitido. La tendencia en este proceso de evolución es hacia la especialización para reducir la competencia microbiana dentro de su hospedero; es por esto, que no todos los saltahojas que se alimentan del floema son vectores de enfermedades causadas por los fitoplasma y la eficiencia de transmisión del organismo varía dentro de las distintas especies de saltahojas. No es raro encontrar especie de saltahojas que contienen el fitoplasma en su organismo pero son incapaces de transmitirlo al hospedero (Mount y Lacy, 1982).

Siguiendo los estudios relacionados con la EHPG, se han realizados varios intentos por identificar el insecto vector de la misma. Jordan (1996), realizó estudios de transmisión de la enfermedad con dos especies de saltahojas, *Empoasca hastosa* y *Alconeura* sp., sin obtener resultados concretos. Saballos (1999) identificó cinco especies posibles de insectos vectores, que dieron resultados positivos a las pruebas realizadas de PCR que indicaron la presencia del fitoplasma en estas especies. Los insectos identificados son:

Se detectó ADN del fitoplasma causante de la enfermedad en cinco posibles insectos vectores:

- *Empoasca hastosa* Ross & Moore (Homoptera: Cicadellidae)
- *Lopidea murray* King & Schaffner (Heteroptera: Miridae)
- *Alconeura* sp. (Homoptera: Cicadellidae)
- *Ollarianus* sp. (Homoptera: Cicadellidae)
- *Hydatothrips gliricidiae* (Homoptera: Thripidae)

Para determinar cuál de estos insectos, es el vector de la EHPG, se deben realizar bioensayos de transmisión con cada una de las especies.

Dentro de las formas de transmisión de los fitoplasmas, esta la utilización de *Cuscuta* sp, que es una planta parásita fanerogámica. La transmisión del patógeno se realiza cuando éste es adquirido de los vasos vasculares de la planta infectada por medio de los haustorios de la cuscuta. El patógeno pasa al floema de la planta parásita y de nuevo es introducida en la planta sana mediante los haustorios que se ponen en contacto con el sistema vascular de la planta inoculada (Castaño, 1994). Utilizando este puente biológico, se puede realizar reservorios de cualquier fitoplasma en plantas susceptibles. Los reservorios son de gran ayuda para la investigación y caracterización de enfermedades causadas por fitoplasma, ya que estos no pueden ser cultivados en medios artificiales.

#### 1.4. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Dentro de los parámetros para poder desarrollar un plan de manejo adecuado de una enfermedad, conocer la etiología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad es de vital importancia.

La EHPG es una enfermedad que ha estado presente en Honduras por más de 10 años (Kenyon et. al,1996), tiene un avance lento y esta distribuida en casi toda Centro América. La combinación de estos dos aspectos ha hecho que el agricultor no la asocie como una enfermedad infecciosa por lo que no ha tenido los cuidados necesarios para manejarla. Esto, combinado con un ecosistema inestable y vulnerable como el nuestro, ha convertido a la EHPG en una grave amenaza. Es aquí, donde radica la importancia de desarrollar los conocimientos básicos que nos sirvan para elaborar un plan de manejo de la enfermedad apropiado para el agricultor y el medio ambiente. Estos ensayos son continuación del estudio iniciado por Saballos (1999), en donde se encuentra información más detallada del problema.

#### 1.5. OBJETIVOS

##### 1.5.1. Objetivo General

Continuar con los estudios de la epidemiología de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia, utilizando técnicas moleculares y bioensayos.

##### 1.5.2. Objetivos Específicos

1. Identificar el o los insectos vectores, a través de técnicas moleculares y bioensayos.
2. Confirmar si la EHPG es transmitida por semilla y/o material vegetativo.
3. Comprobar indirectamente la patogenicidad del fitoplasma basado en los postulados de Koch, a través de bioensayos(Castaño, 1994).

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 METODOLOGIA PARA EL PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Para el procesamiento de las muestras en el laboratorio, se utilizó el método de Extracción de ADN con CTAB (Doyle and Doyle) modificado por el Dr. Nigel Harrison de la Universidad de Florida (Saballos, 1999), tanto para las muestras de material vegetal como para las pruebas con insectos. Los protocolo del proceso se encuentra en los Anexos 1 y 2.

Todas las reacciones de PCR (Smith, 1999) se realizaron utilizando el producto comercial "PCR Beads Ready To Go"<sup>TM</sup> de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech, Inc. Piscataway, NJ, USA. Cada perla de reactivo, que contiene aproximadamente 1.5 unidades de Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 200 µM de cada dideoxinucleótido trifosfato (dNTPs o bases nitrogenadas), 10 mM de Tris-HCl (pH 9.0) y estabilizadores, incluyendo albúmina de suero bovino (ASB) se disolvió en 24 µl de agua doblemente destilada y 0.5 µl de cada primer. Posteriormente se dividió la mezcla de cada perla para dos reacciones, cada una de 12.5µl. Se utilizó 1 µl de ADN de cada muestra. Como control positivo para la reacción de PCR directo se usó ADN de Amarillamiento Letal y para el PCR anidado una dilución de 1: 40 de ADN de una muestra de madreado positiva para EHPG.

Para la prueba de PCR directo, se utilizaron los primers universales, P1 & P7 que amplifican la región del gen 16s ARNr, la región espaciadora del gen 16S ARN y el gen 23S ARN y 30 bases del extremo 5' del gen 23S ARNr, presente en todos los fitoplasma. Para la identificación específica de la EHPG, se utilizó la prueba de PCR anidado, en donde se utilizaron los primers específicos PP/GLL f & r que amplifican una región interna del gen 16S rARN, por lo que puede ser usado para PCR anidado de producto de amplificación con los iniciadores P1 y P7. (Saballos, 1999). La secuencia de nucleótidos de cada primer y el correspondiente tamaño del producto de PCR están dados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Primers universales y específicos para la detección de genes 16S ARN y 23S ARN de fitoplasmas.

Primer	Secuencia (5'-3') <sup>1</sup>	Tamaño de Producto de PCR (Kb)
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTAGGATT	1.8
P7	GCTCCTTCATCGGCTCTT	
PP/GLLf	GTCGAACGGAAACCTTAG	1.4
PP/GLLr	ACGGCTCCTCTTCTAAC	

<sup>1</sup> Proporcionados por Dr. Nigel Harrison, Universidad de Florida.

Para asegurar un diagnóstico correcto sobre la presencia o ausencia del fitoplasma, todas las muestras negativas para el PCR directo, fueron expuestas a una reamplificación de ADN utilizando la prueba de PCR anidado. Dependiendo de la intensidad de la banda obtenida en la prueba inicial, se realizaron las siguientes diluciones del producto del PCR directo en agua estéril. Sin banda, 1:40; banda débil 1: 100. Estas reacciones fueron expuestas al mismo ciclo de temperaturas utilizado para los primers universales.

El procedimiento de amplificación de ADN del fitoplasma, en caso de estar presente, se llevó a cabo por el termociclador Perkin Elmer 480, Norwalk, CT, USA. Cada reacción de PCR fue sometida a un primer ciclo para su desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido por la fase de ligamiento a 54 °C por 50 segundos y por último en la fase de extensión la temperatura a 72 °C por 2 minutos. A este primer ciclo siguieron 28 ciclos de 94°C por un minuto, 54°C por 50 segundos y 72°C por 2 minutos. Para finalizar, el último ciclo, fue de 94°C por un minuto, 54°C por 50 segundos y 72°C por 5 minutos.

Para visualizar los resultados de las pruebas, la Electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.75% con una concentración de bromuro de etidio del 0.5 µg/ml, con una corriente eléctrica de 85 voltios por 30 a 45 minutos, para luego ser expuestas a luz ultravioleta.

## 2.2 IDENTIFICACION DEL INSECTO VECTOR

Este ensayo se realizó en los meses de febrero y marzo del 2000 en los campos del Zamorano. Se trabajó con individuos de las especies *Empoasca hastosa* y *Ollariannus* sp. que fueron recolectados en el banco de proteína sembrado con madrcado de la sección de ganado porcino de Zamorano.

La primera fase de este ensayo, exposición y adquisición del fitoplasma por el posible insecto vector, se realizó en jaulas de malla fina colocadas en ramas de árboles enfermos (Figura4). De la especie *E. hastosa* (Figura 3) se colocaron tres jaulas, cada una con un tiempo de exposición y adquisición del fitoplasma de 5, 10, y 15 días respectivamente. Dentro de cada jaula se colocaron alrededor de 20 individuos. De la especie *Ollariannus* sp (Figura 3) solo se pudo recolectar del campo 4 individuos, por lo que solo se trabajó con una jaula con un periodo de exposición y adquisición del fitoplasma de 10 días. Las

jaulas fueron removidas de las ramas al finalizar el periodo respectivo de exposición y adquisición de cada una. Se extrajeron muestras de insectos y hojas de cada jaula para realizar las pruebas de PCR y electroforesis para la detección del fitoplasma. Se utilizó el método con CTAB (Doyle & Doyle) para la extracción de ADN y los primers universales y específicos P1 & P7 y PPWB/GLL f & r para las pruebas de PCR directo y anidado respectivamente.

Para la segunda fase, de transmisión e incubación del fitoplasma por medio del posible insecto vector a un hospedero sano. Se colocaron tres jaulas de malla fina cada una con una plántula (Figura 4) a las cuales se le realizó la prueba de PCR para asegurarnos que se encontraban libre del patógeno. Dentro de cada jaula, se colocaron alrededor de 10 individuos extraídos de las jaulas utilizadas en la primera fase de este ensayo. Nuevamente cada jaula con un tiempo de exposición de 5, 10 y 15 días respectivamente. Es decir, los individuos que fueron expuestos cinco días al fitoplasma tuvieron cinco días de transmisión e incubación en la planta sana y del mismo modo con el resto de las jaulas. Este ensayo solo se pudo realizar con la especie *E. hastosa* debido a que no se logró obtener individuos de la especie *Ollariannus* sp. para continuar con el ensayo. A partir de la culminación del tiempo de transmisión de cada jaula, se les dio un mes de incubación al patógeno en la planta hospedera, después del cual se volvió a obtener muestras de insectos y follaje. La toma de muestras y procesamiento en el laboratorio fue igual al utilizado en la fase anterior. Ver flujo del proceso en la Figura 2.

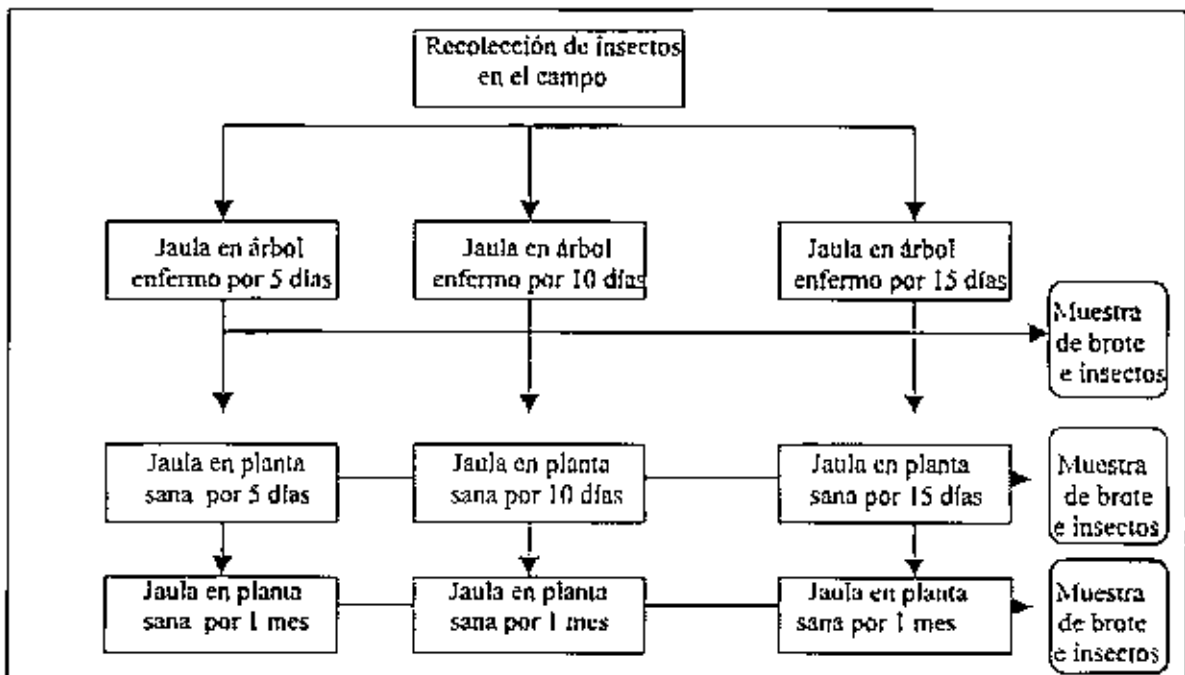


Figura 2. Flujo del proceso para el ensayo de transmisión por insecto vector.

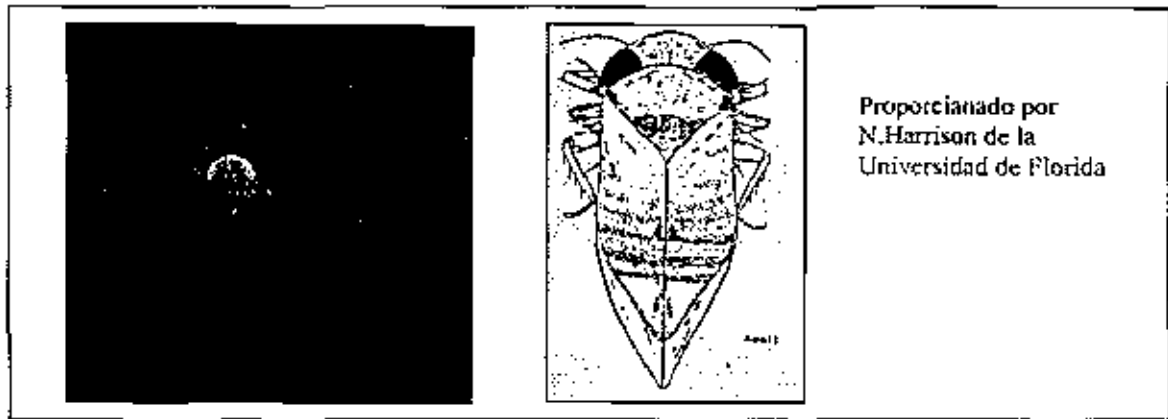


Figura 3. *Empoasca hastosa* (a) y *Ollariannus* sp. (b)

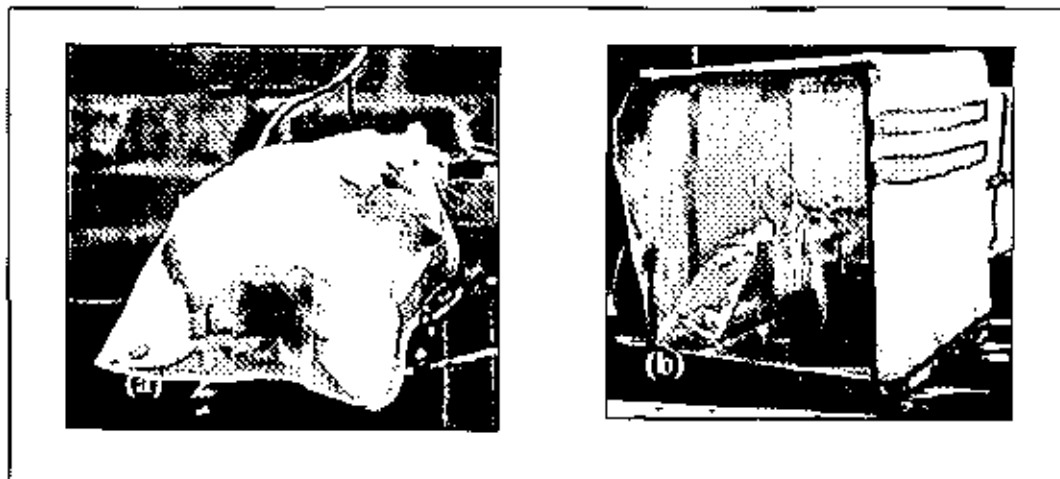


Figura 4. Jaula de malla fina en ramas de árbol enfermo (a) y jaula de malla fina para planta sana (b).

### 2.3 COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE SEMILLA

El objetivo de este estudio fue confirmar, los resultados obtenidos en el ensayo realizado por Saballos (1999). Como primer paso, se escogieron 12 árboles bajo diferentes niveles de severidad de la enfermedad, tres por cada nivel (Cuadro 2). Los individuos escogidos se encontraban en los terrenos de Zamorano y la clasificación se realizó utilizando un sistema de evaluación de la enfermedad (Boa y Lenné, 1993). Para asegurar la presencia del patógeno en los árboles padre, se les aplicó la prueba de PCR directo con los primers universales para fitoplasma, P1 y P7; y la prueba de PCR anidado con los primers específicos PP/GLLF y PP/GLLR.

Cuadro 2. Clasificación y nomenclatura de los árboles padres para las pruebas de transmisión.

Asintomáticos (1)			Daño Menor (2)			Daño Moderado (3)			Daño Severo (4)		
# árbol	PCR directo	PCR anidado	# árbol	PCR directo	PCR anidado	# árbol	PCR directo	PCR anidado	# árbol	PCR directo	PCR anidado
T1-1	(-)	(+)	T2-1	(-)	(+)	T3-1	(-)	(1)	T4-1	(+)	No se hizo
T1-2	(-)	(+)	T2-2	(-)	(+)	T3-2	(+)	(+)	T4-2	(+)	No se hizo
T1-3	(-)	(+)	T2-3	(-)	(+)	T3-3	(-)	(+)	T4-3	(+)	No se hizo

El estudio de transmisión por semilla se dividió en dos ensayos; en el primero se evaluó la presencia del fitoplasma en plántulas germinadas de semillas recolectadas de los árboles padre. Se sembraron cinco maceteros por cada árbol con dos semillas cada uno, para obtener un total de 15 maceteros por nivel de severidad. En el nivel de daño menor solo se sembraron 10 maceteros y para el nivel de daño severo seis por la baja producción de semilla. Se realizó un raleo al azar para trabajar con una plántula por macetero. En total se trabajó con 46 plántulas germinadas.

La semilla fue recolectada entre los meses de marzo y abril de 1999. Estas fueron secadas y almacenadas a temperatura ambiente. La siembra se realizó el 16 de octubre, obteniendo una germinación del 100%. El ensayo se realizó en la casa malla del Departamento de Protección Vegetal del Zamorano. Para eliminar el riesgo de contaminación por el insecto vector, los maceteros fueron puestos en una jaula de malla fina totalmente cerrada.

La extracción de ADN y la aplicación de las pruebas de PCR se realizaron en la semana del 6 al 12 de diciembre a los 56 días de germinadas las plántulas. En este caso solo se evaluó la presencia o ausencia del fitoplasma, como indicador de la transmisión de la enfermedad. Se realizó una tabla de contingencia ( $\chi^2$ ) para probar la hipótesis nula de que no existe relación entre el nivel de severidad de la enfermedad y la transmisión del fitoplasma. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS © "Statistical Analysis System", versión 6.12 (1996), con un nivel de significancia de  $p=0.05$ .

En el segundo ensayo, se evaluó la presencia del fitoplasma directamente en la semilla recolectada de los mismo árboles. Para esto se protegió las inflorescencias con bolsas de malla fina (Figura 5) para evitar la posibilidad de que el insecto vector se alimente directamente de las flores o vainas, transmitiendo así el patógeno a estas.



Figura 5. Flores (a) y vainas (b) protegidas contra insectos.

El ensayo se realizó entre los meses de febrero y marzo del 2000. Se tomaron dos muestras de semillas y dos muestras de flores de cada árbol, nuevamente solo se evaluó la presencia o ausencia del fitoplasma como indicador de la transmisión de la enfermedad; las muestras y los datos fueron procesados y analizados igual que en el primer ensayo.

#### 2.4 COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE MATERIAL VEGETATIVO

Para el estudio de transmisión por material vegetativo, se utilizaron los mismos árboles padres del estudio de transmisión por semilla, sacando dos estacas por cada uno. El ensayo se realizó en los terrenos del Departamento de Protección Vegetal del Zamorano, entre los meses de julio y octubre de 1999.

Se sembraron las estacas, de aproximadamente 1 m de largo y 10 cm de diámetro, a una distancia de 60 cm entre surcos y 60 entre estaca. La siembra se realizó el 20 de julio de 1999 inmediatamente después de extraer el material de los árboles. La toma de datos y muestreo de las estacas se realizó el 20 de octubre de 1999, a los 4 meses de sembradas las estacas.

Se evaluó el porcentaje de las estacas enraizadas entre los diferentes niveles de la enfermedad y la presencia o ausencia del fitoplasma en los brotes de las estacas. Los datos se analizaron con una de tabla de contingencia ( $\chi^2$ ) para probar la hipótesis nula de que no existe relación entre la transmisión de la enfermedad ni en el porcentaje de estacas enraizadas con los diferentes niveles de severidad de la enfermedad. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS ® "Statistical Analysis System, versión 6.12 (1996), con un nivel de significancia de  $p=0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 IDENTIFICACION DEL INSECTO VECTOR

Los resultados de la prueba de PCR anidado para la detección del patógeno en las muestras de follaje de las jaulas y los tejidos de los insectos al finalizar el periodo de exposición y adquisición del fitoplasma de cada jaula, se pueden observar en la Figura 6.

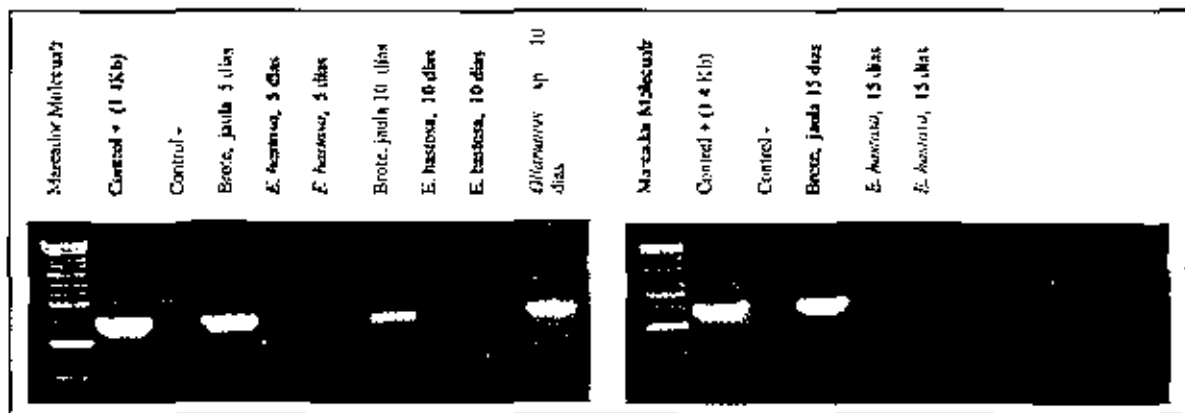


Figura 6. Resultados de la Fase de Exposición y Adquisición del Fitoplasma por parte de *Empoasca hastosa* y *Ollarianus* sp.

Los brotes extraídos de las jaulas presentaron bandas bien definidas que indican la presencia del fitoplasma en el tejido vegetal examinado. Esto confirma que todos los insectos en las jaulas fueron expuestos al fitoplasma. Las muestras de los insectos de la especie *E. hastosa* resultaron negativas a las pruebas de PCR anidado, mientras que en la muestra de *Ollarianus* sp. sí se pudo detectar la presencia del fitoplasma.

Estos resultados se pueden deber al reducido tamaño de la especie *E. hastosa* que dificulta la extracción de ADN, por lo que suelen obtenerse bajas concentraciones del mismo, impidiendo la visualización de la banda en las geles de agarosa después de realizar la prueba de PCR. Este problema se puede solucionar con la prueba de PCR anidado que reamplifica el ADN obtenido en la prueba de PCR directo aumentando así su concentración. A pesar de esto, cabe la posibilidad que la concentración inicial de ADN en las pruebas a los insectos sea tan pequeña o ninguna, que inclusive después de la prueba de PCR anidado todavía no exista suficiente ADN como para poder ser visualizado. En el caso de *Ollarianus* sp, este es un insecto que en tamaño es casi el

doble del de *E. hastosa*, por lo que no es extraño que este haya resultado positivo y el resto de los insectos no.

Según Agrios (1995), los insectos vectores necesitan un tiempo de incubación del patógeno dentro de su organismo que dura de 10 a 45 días para que el mismo se propague y distribuya dentro del insecto, esto depende de varios factores que incluye aspectos genéticos del vector y condiciones climáticas; esta puede ser una razón por la cual no se pudo detectar el fitoplasma en los insectos al finalizar los periodos de exposición y adquisición al patógeno. La literatura reporta que los fitoplasma requieren de una transmisión circulativa que generalmente es también persistente. Esto implica que el vector necesita adquirir el fitoplasma una vez, para que este se reproduzca dentro de su organismo, antes de poder transmitirlo a plantas sanas. Se puede deducir entonces que los insectos estudiados puedan necesitar de un periodo mayor a 15 días de exposición al patógeno.

A pesar de que en este ensayo, se identificó el fitoplasma en la muestra de insectos de la especie *Ollariannus* sp. no se puede asumir que éste sea un vector de la enfermedad, ya que según Mount y Lacy (1982), no es raro encontrar especies de saltahojas que contengan el fitoplasma en su organismo, pero estos son incapaces de transmitirlo al hospedero. Debido a la interacción entre el insecto vector, patógeno y hospedero la tendencia evolutiva es hacia la especialización para reducir la competencia microbial. Lamentablemente, no se pudo obtener individuos de esta especie para continuar con los estudios de transmisión y comprobar si esta especie es capaz de transmitir el fitoplasma a plantas sanas de gliricidia. El Dr. Jim Tsai, de la universidad de Florida, ha comprobado que una especie del género *Ollariannus* es el vector de la enfermedad de la escoba de bruja en el frijol gandul. Tomando en cuenta la similitud entre los fitoplasma que causan la EHPG y la enfermedad de la escoba de bruja en el frijol gandul, nos hace pensar que individuos de este género, pueden ser también vectores para la EHPG. Sin embargo, para comprobarlo se debe terminar el ensayo de transmisión con esta especie.

Los resultados obtenidos en la segunda fase del ensayo, transmisión e incubación del patógeno se pueden observar en la Figura 7.

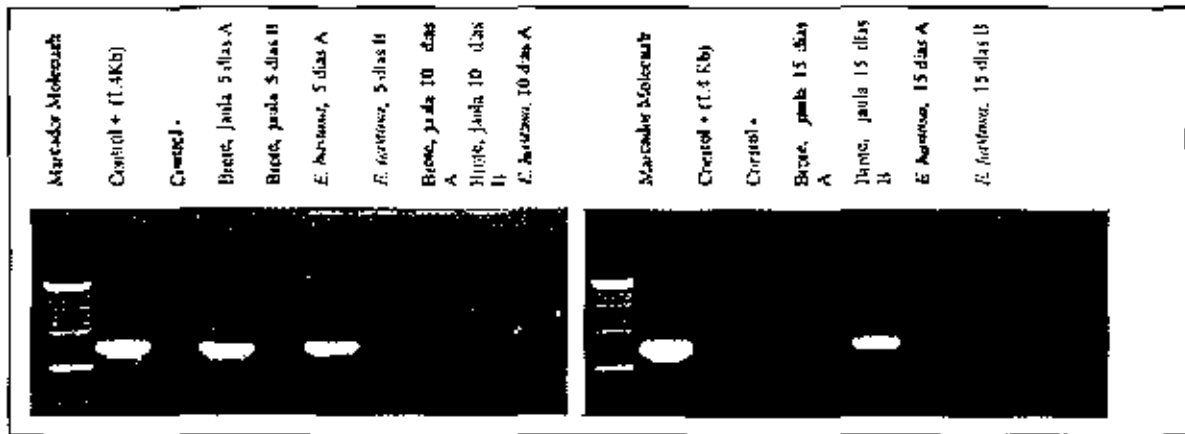


Figura 7. Resultados de la Fase de Transmisión e Incubación del Fitoplasma por parte de *Empoasca hastosa* a la Planta Hospedera.

Las muestras de follaje e insectos extraídas de la jaula con un tiempo de transmisión e incubación de cinco días resultaron positivas para la prueba de PCR anidado y se pudo detectar también el fitoplasma en la muestra de insectos extraídos de la jaula con un tiempo de 15 días para la transmisión e incubación del fitoplasma.

En las pruebas realizadas para la detección del fitoplasma después de un mes de incubación del patógeno en la planta hospedera no se detectó el fitoplasma en ninguna de las muestras. Ver el resumen de los resultados obtenidos en el bioensayo en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos en el bioensayo de identificación del insecto vector.

Recolección en el campo							
I. Fase de Exposición y Adquisición del Fitoplasma							
<i>Empoasca hastosa</i>						<i>Ollariannus sp.</i>	
Follaje	Insectos	Follaje	Insectos	Follaje	Insectos	Follaje	Insectos
Jaula 5 días		Jaula 10 días		Jaula 15 días		Jaula 10 días	
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
II. Fase de Transmisión e Incubación del Fitoplasma al hospedero sano							
<i>Empoasca hastosa</i>							
Follaje	Insectos	Follaje	Insectos	Follaje	Insectos		
Jaula 5 días		Jaula 10 días		Jaula 15 días			
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)		
Incubación del Fitoplasma en planta hospedera							
<i>Empoasca hastosa</i>							
Follaje	Insectos	Follaje	Insectos	Follaje	Insectos		
Jaula 5 días		Jaula 10 días		Jaula 15 días			
(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)		
Detección del Fitoplasma							

Los resultados obtenidos en la fase de transmisión e incubación del patógeno en un hospedero sano, sugieren que la especie *Empoasca hastosa* es capaz de transmitir el fitoplasma a un hospedero sano. Si bien es cierto, que esta especie se encuentra en altas poblaciones en los bancos de proteína de *G. sepium* severamente afectados del Zamorano, no es raro encontrarla igualmente en altas poblaciones en plantaciones, bosques o colecciones sanas de *G. sepium*. Esto sugiere que la especie *Empoasca hastosa* no es un vector eficiente de la EHPG.

Hasta el momento no se pudo comprobar que el patógeno se esté propagando dentro del hospedero sano. La explicación de este resultado puede deberse a que el fitoplasma requiere de un mayor tiempo de incubación dentro del hospedero o que las condiciones dentro del mismo no son las óptimas para su desarrollo y reproducción. La literatura reporta que la mayoría de las enfermedades causadas por fitoplasma no se expresan en plantas jóvenes, como es el caso del amarillamiento letal del cocotero. Este estudio se realizó en plantas jóvenes de madreado, y es posible que esta condición impida la propagación del fitoplasma dentro del individuo y la visualización de los síntomas. La EHPG tiene un avance sectorial dentro de los individuos afectados, por lo que se puede inferir que al momento del muestreo en el estudio, se obtuvieron muestras de una sección de la planta libre todavía del patógeno. Para responder estas interrogantes, se debe estudiar más a fondo la relación entre el hospedero y el fitoplasma, ya que ésta es independiente de la relación entre el fitoplasma y el insecto vector.

Uno de los objetivos específicos de este estudio, fue comprobar indirectamente la patogenicidad del fitoplasma basado en los postulados de Koch a través de Bioensayos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Analogía entre los Postulados de Koch y las fases del ensayo de transmisión de la EHPG por medio del insecto vector.

Postulados de Koch	Fase del Ensayo de transmisión
I. Debe haber una asociación constante entre un organismo y el hospedero enfermo.	Fase de exposición y adquisición del fitoplasma
II. Se debe aislar el patógeno sospecho del hospedero enfermo y obtenerlo en cultivo puro.	Las jaulas fueron puestas en un árbol enfermo con síntomas típicos de la EHPG. Se comprobó la presencia del fitoplasma en el individuo mediante la prueba de PCR.
III. Se debe inocular un hospedero sano con el cultivo puro del organismo sospechoso y reproducir los síntomas típicos de la enfermedad.	Se detectó el fitoplasma en insectos obtenidos de las jaulas en el árbol enfermo mediante la prueba de PCR
IV. Se debe reaislar el patógeno en cultivo puro a partir del hospedero inoculado y enfermo y sus características deben ser exactamente iguales a las observadas en el cultivo obtenido en el segundo postulado	Fase de transmisión e incubación del patógeno
	Se logró detectar la transmisión del fitoplasma por medio del insecto vector, mediante la prueba de PCR. No fue posible la visualización de los síntomas típicos de la EHPG

La dificultad en comprobar directamente los postulados de Koch, radica principalmente en la biología del patógeno que impide que éste sea cultivado en medios artificiales y que se transmita mecánicamente. Los fitoplasmas, requieren de insectos vectores, injertos o puentes biológicos para poder ser transmitidos de una planta a otra y por lo general el avance de la enfermedad es lento y los síntomas solamente se pueden apreciar en plantas adultas.

Mediante la detección del ADN del fitoplasma causante de la EHPG en las diferentes fases del ensayo de transmisión por insecto vector, se logró obtener evidencias que nos permiten sugerir indirectamente que se ha comprobado la patogenicidad del fitoplasma y su relación con la EHPG. La comprobación total de los postulados de Koch con respecto al fitoplasma de la EHPG, se obtendrá cuando se puedan visualizar los síntomas característicos de la enfermedad en la planta inicialmente sana y libre del patógeno

### 3.2 COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE SEMILLA

En la primera fase de este ensayo, de las 46 plántulas muestreadas, se pudo detectar el fitoplasma en 10 de ellas (Cuadro 5), lo que significa 22% de transmisión por semilla (Cuadro 6). Se descartó cualquier probabilidad de contaminación por vector dentro de la jaula, ya que en ningún momento existió la presencia de insectos dentro de la misma. Estos resultados confirman los obtenidos en los estudios realizados en Zamorano por Saballos en 1999, en donde detectó el fitoplasma en 3 de las 40 plántulas germinadas.

No se encontró ninguna relación significativa entre el nivel de severidad de la enfermedad y el número de plántulas positivas en cada uno ( $\chi^2=3.092$ ;  $g=3$ ;  $p=0.378$ ). Esto indica que la transmisión del fitoplasma a las semillas, es independiente del grado de severidad de la enfermedad

Cuadro 5. Resultados de la Prueba de PCR anidado realizado a las plántulas germinadas de semilla recolectada de árboles con distintos niveles de severidad de la enfermedad.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad				Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	Daño Severo	
PCR anidado (+)	1	3	4	2	10
PCR anidado (-)	14	7	11	4	36
Total	15	10	15	6	46

Cuadro 6. Porcentaje de transmisión del fitoplasma a plántulas germinadas de semilla recolectada de árboles con distintos niveles de severidad de la enfermedad.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad				Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	Daño Severo	
Total de plántulas	15	10	15	6	46
PCR anidado (+)	1	3	4	2	10
% de transmisión	7	30	27	33	22

En la segunda fase del ensayo, se analizaron flores y semillas inmaduras, protegidas con jaulas de malla fina, para evitar la entrada de insectos vectores que pudieran transmitir la enfermedad directamente a las flores y vainas cuando estos se alimentan de ellas.

En el análisis de las flores recolectadas, de 24 analizadas se logró detectar el fitoplasma en ocho de ellas (Cuadro 7), lo que significa 33% de transmisión del fitoplasma a las

flores (Cuadro 8). Dentro de las jaulas no se encontró ningún insecto lo que elimina la posibilidad de que éste haya podido transmitir el fitoplasma a las flores analizadas.

No se pudo encontrar una relación significativa entre el nivel de severidad de la enfermedad y la presencia del fitoplasma en las flores ( $\chi^2=4.500$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.212$ ), esto quiere decir que la transmisión del fitoplasma a las flores es independiente del nivel de severidad de la enfermedad.

Cuadro 7. Resultados de la Prueba de PCR anidado realizado a flores de *G. sepium* protegidas de insectos en jaulas de malla fina.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad			Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	
PCR anidado (+)	3	3	2	8
PCR anidado (-)	3	3	4	16
Total	6	6	6	24

Cuadro 8. Porcentaje de transmisión del fitoplasma a flores de *G. sepium* protegidas de insectos en jaulas de malla fina.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad			Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	
Total de flores	6	6	6	24
PCR anidado (+)	3	3	2	10
% de transmisión	50	50	33	33

En el análisis de semilla inmadura obtenidas de las jaulas, se detectó el fitoplasma en 14 de las 24 muestras (Cuadro 9), esto indica 58% de transmisión del fitoplasma a la semilla (Cuadro 10).

En este caso tampoco se encontró relación significativa entre el nivel de severidad de la enfermedad y la presencia del fitoplasma en las semillas analizadas ( $\chi^2=6.171$ ;  $gl=3$ ,  $p=0.1$ ). Esto quiere decir que la presencia del fitoplasma en las semillas inmaduras, es independiente del grado de severidad de la enfermedad.

Cuadro 9. Resultados de la Prueba de PCR anidado realizado a semillas inmaduras de *G. sepium* protegidas de insectos en jaulas de malla fina.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad				Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	Daño Severo	
PCR anidado (+)	1	4	4	5	14
PCR anidado (-)	5	2	2	1	10
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>24</b>

Cuadro 10. Porcentaje de transmisión del fitoplasma a semillas inmaduras de *G. sepium* protegidas de insectos en jaulas de malla fina.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad				Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	Daño Severo	
Total de semillas	6	6	6	6	24
PCR anidado (+)	1	4	4	5	14
<b>% de transmisión</b>	<b>17</b>	<b>66</b>	<b>66</b>	<b>83</b>	<b>58</b>

Hasta el momento, no se ha podido identificar el patógeno ni en flores, ni en semillas, ni en plántulas utilizando solamente la prueba de PCR directo, lo que indica que las cantidades de ADN del fitoplasma en estos tejidos es muy baja, infiriéndose entonces, que es muy poca la cantidad del patógeno que logra alcanzar estos tejidos.

Debido al hecho de que la semilla se desarrolla a partir de tejido meristemático, sin conexión directa con los conductos vasculares, existe una barrera fisiológica que impide el paso del patógeno hacia la semilla, es por esto, que la literatura indica que los fitoplasma no son transmitidos a través de reproducción sexual.

Si analizamos los resultados obtenidos en las pruebas de detección del patógeno tanto en semilla inmadura como en plántulas, podemos ver que hay una reducción en el porcentaje de transmisión del 58% al 22% respectivamente, esto se puede deber a que los conductos del floema llegan únicamente hasta la nucela y no al embrión. Esto sugiere, que en uno de cada dos casos la barrera fisiológica natural en las semillas no impide el paso del organismo al embrión. En el ensayo realizado se obtuvo 100% de germinación de la semilla obtenida de los árboles enfermos, esto combinado con los resultados que confirman la presencia del fitoplasma en la semilla, nos permite inferir que el patógeno no interfiere con el desarrollo y germinación de la semilla.

A pesar que se ha logrado identificar la presencia del patógeno en las plántulas germinadas, no podemos asegurar que éste se encuentra viable y que eventualmente presentará síntomas de la enfermedad en la planta. Nuevamente, comprobando los resultados obtenidos por Saballos (1999), las plántulas que resultaron positivas para la

prueba de PCR anidado no muestran diferencia fenotípica con las que resultaron negativas en las primeras etapas de desarrollo. Esto sugiere dos cosas: que los síntomas de la enfermedad no se presentan en plantas jóvenes, como ocurre en el amarillamiento letal del cocotero, o que el fitoplasma presente se encuentra en una forma latente que impide que éste desarrolle la enfermedad.

### 3.3 COMPROBACION DE LA TRANSMISION DE LA EHPG POR MEDIO DE MATERIAL VEGETATIVO

De las 24 estacas sembradas en el ensayo, 18 enraizaron y rebrotaron, obteniéndose un porcentaje de rebrote total del ensayo del 75% (Cuadro 11). Se pudo observar una disminución en el rebrote de las estacas a partir del nivel de daño moderado, donde se obtuvo 67% de rebrote y 33% en el nivel de daño severo. No se encontró dependencia entre el nivel de severidad de la enfermedad y el número de estacas germinadas ( $\chi^2=6.821$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.078$ ).

Cuadro 11. Resultados de la germinación de estacas de *G. sepium* obtenidas de árboles con diferente nivel de severidad de la enfermedad.

Rebrote	Nivel de Severidad			Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	
Estacas sembradas	6	6	6	24
Estacas rebrotadas	6	6	4	18
% de Rebrote	100	100	67	75

A pesar de no encontrar diferencia significativa, se puede observar una tendencia a la reducción del rebrote de las estacas, con el aumento de la severidad de la enfermedad en los árboles padre. Esta relación se explica debido a la biología del patógeno, en la cual el fitoplasma coloniza los vasos del floema impidiendo el transporte de nutrientes. Esto puede influir directamente en la falta de vigor de la estaca lo que disminuye la probabilidad de enraizamiento y germinación de la misma.

De las 18 estacas rebrotadas, 16 resultaron positivas con la prueba de PCR para la detección del fitoplasma. Sin embargo, no se encontró relación significativa entre el nivel de severidad de la enfermedad y la transmisión del fitoplasma a las estacas ( $\chi^2=1.969$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.579$ ).

Analizando la respuesta a las pruebas de PCR directo y anidado, no se encontró una relación entre nivel de severidad de la enfermedad y la respuesta a cada prueba. Esto indica que la concentración del fitoplasma en los brotes de las estacas no depende del nivel de severidad de la enfermedad; sin embargo, 11 de las 16 estacas positivas fueron detectadas utilizando la prueba de PCR anidado (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados de la prueba de PCR directo y anidado para la detección del fitoplasma en las estacas germinadas.

Presencia del Fitoplasma	Nivel de Severidad			Total
	Asintomático	Daño Menor	Daño Moderado	
PCR directo (+)	1	3	1	5
PCR anidado (+)	4	2	3	11
PCR (-)	1	1	0	2
Total	6	6	4	18

Combinando los resultados obtenidos en el análisis del porcentaje de rebrote y la detección del fitoplasma en los ensayos, se puede inferir que las estacas obtenidas de árboles enfermos, son viables para su propagación siempre y cuando posean una concentración baja del fitoplasma en los vasos vasculares.

El rebrote de la mayoría de las estacas en el ensayo fue vigoroso; incluso en dos de las cinco estacas que resultaron positivas para la prueba de PCR directo (Fig 8. a, b). Sin embargo en las tres restantes (Fig 8. c, d, e) el rebrote fue débil y con escaso follaje. En estas estacas ya se puede apreciar los primeros síntomas de la enfermedad como lo son deformación de hojas y clorosis.

El rebrote de las estacas que resultaron negativas (Fig 8. g) fue vigoroso y abundante. A pesar de esto, si comparamos el rebrote de las estacas negativas para la prueba de PCR, positivas para la prueba de PCR directo y positivas para la prueba de PCR anidado (Fig 8. g, a, f) no podemos encontrar claras diferencias fenotípicas que nos ayuden a identificar y diagnosticar la enfermedad oportunamente para lograr formular un plan de manejo adecuado.

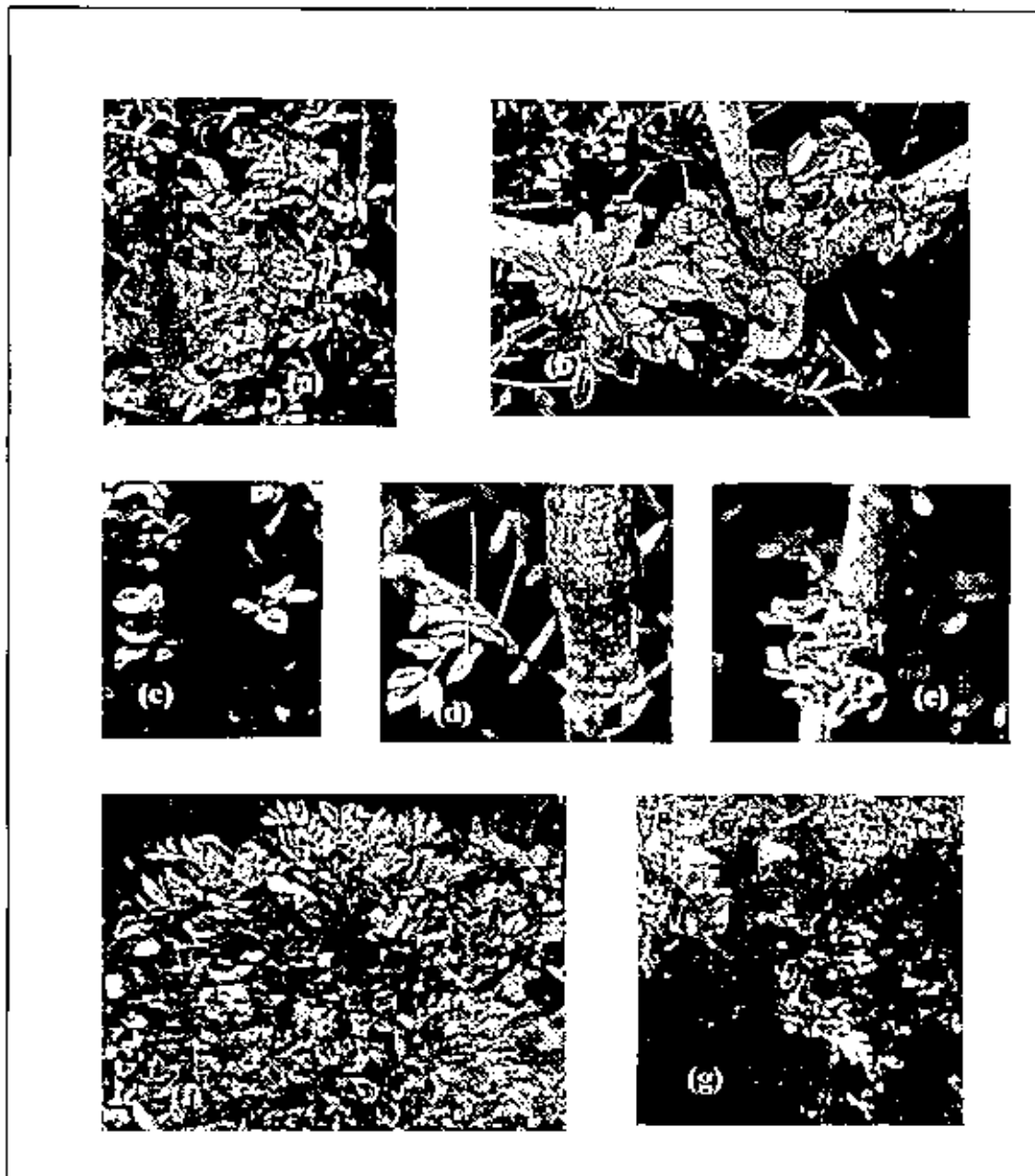


Figura 8. Diferencias fenotípicas entre estacas positivas y negativas para la prueba de PCR de detección del fitoplasma causante de la EHPG. PCR directo + (a,b,c,d,e); PCR anidado ÷ (f); PCR, negativo (g)

#### 4. CONCLUSIONES

Se comprobó que la especie *Empoasca hastosa* es capaz de transmitir el fitoplasma causante de la EHPG, sin embargo, no se pudo comprobar que éste se propagó en la planta.

Se detectó el ADN del fitoplasma causante de la EHPG en la especie *Ollariannus* sp. al finalizar el periodo de exposición y adquisición del fitoplasma de 10 días. De las tres especies de saltahojas que hasta el momento se cree que son posibles vectores de la EHPG, se considera a ésta especie la de mayor potencial. Esto concuerda con estudios en la Universidad de Florida donde se ha comprobado que una especie del género *Ollariannus* es el vector del fitoplasma que causa la enfermedad de la escoba de bruja del frijol gandul, el cual es muy similar al fitoplasma de la EHPG<sup>1</sup>.

El fitoplasma de la EHPG es transmitido por medio de semilla de madreado, independientemente del nivel de severidad de la enfermedad. Las concentraciones del fitoplasma que llegan a éstos órganos reproductivos son bajas e independientes del nivel de severidad de la enfermedad. Una de cada dos semillas que contienen el fitoplasma pueden transmitirlo al embrión. No se encontró diferencia fenotípica entre las plántulas sanas y en las que se detectó el fitoplasma, lo que indica que la sintomatología de la enfermedad solamente se puede apreciar en plantas adultas o que el fitoplasma no se encuentra en condiciones para desarrollar la enfermedad.

La EHPG, es transmitida por estacas de madreado independientemente del nivel de severidad de la enfermedad. El rebrote de las estacas no depende del nivel de severidad de la enfermedad en los árboles padre; sin embargo, los niveles de daño moderado (3) y severo (4) presentan un menor número de estacas enraizadas y rebrotadas que los niveles asintomático (1) y de daño menor (2).

Con los resultados obtenidos en el ensayo de identificación del insecto vector, se obtuvo evidencia que nos permite comprobar indirectamente lo postulados de Kock, con los cuales se comprueba la patogenicidad del fitoplasma de la EHPG.

---

<sup>1</sup> Comunicación personal, N.Harrison, Universidad de Florida, 1999.

## 5. RECOMENDACIONES

Continuar los estudios de transmisión por vector de la enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia con la especie *E. hastosa* para confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

Realizar estudios de transmisión de la enfermedad por vector con las especies *Olluriannus spp.*, *Alconeura spp.*, *Lopideu murray* e *Hiponothrips gliricidae*, para determinar si estas especies de insectos son capaces de transmitir la enfermedad. Para estos estudios se recomienda utilizar los primers P1& P7 y PP/GLL f&r para las pruebas de PCR directo y anidado respectivamente, debido a las bajas concentraciones de ADN del fitoplasma que se obtiene en la extracción de ADN de insectos.

Mantener las plántulas germinadas de árboles enfermos donde se detectó ADN del fitoplasma aisladas de insectos, para seguir muestreandolas y determinar si la concentración del fitoplasma aumenta y éste pueda ser identificarlo mediante la prueba de PCR directo. Si esto sucede, indicará que el patógeno se está reproduciendo dentro del hospedero y que fue transmitido a la plántula en un estado viable, capaz de desarrollar la enfermedad. Es importante observar si se desarrolla la sintomatología en estas plántulas y cuando lo hacen.

Determinar el desarrollo de la sintomatología en estacas donde se identifique la presencia del fitoplasma causante de la enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia; procurando mantenerlas aisladas para evitar el contacto con el insecto vector de la enfermedad.

Repetir el ensayo de transmisión por estacas, protegido totalmente contra insectos, para evitar la contaminación del vector. Para esto se puede diseñar un estudio con estacas pequeñas en maceteros dentro de la casa malla del Departamento de Protección Vegetal.

Evaluar el avance actual de la enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia y su impacto socioeconómico en Honduras y otras regiones de Centro América.

Diseñar y validar un plan de manejo apropiado para la enfermedad.

Dentro del plan de manejo, se recomienda hacer énfasis en los siguientes puntos:

Distribución de información sobre la EHPG a los usuarios de la *G. sepium* mediante seminarios, giras de promoción en el campo, etc. Enfocándose en la importancia, sintomatología, reconocimiento y manejo de la enfermedad. Buscar el apoyo de

organizaciones de desarrollo como ONG's y organizaciones gubernamentales para abarcar tanto a pequeños como grandes productores.

- Disminución de la diseminación de la enfermedad mediante la propagación por estacas de esta especie arbórea. Recomendar a los productores el establecimiento de un rodal de *G. sepium* apropiadamente manejado y comprobado que se encuentra libre del patógeno para ser usado como banco de estacas. De esta manera se busca controlar la reducción de la base genética de la especie y la diseminación de la enfermedad. La comprobación de que éstos árboles se encuentran sanos debe realizarse por medio de pruebas altamente específicas como la prueba de PCR anidado ya que incluso árboles asintomáticos pueden transmitir el patógeno.
- Certificación de semilla de *G. sepium* libre del patógeno, nuevamente utilizando pruebas altamente específicas como la prueba de PCR anidado. Establecimiento de rodales semilleros libres del patógeno.
- Control y legislación del traslado de germoplasma para evitar la introducción del patógeno en zonas libres del mismo.
- Eliminación de árboles enfermos para reducir las fuentes de inóculo.
- Identificación y valoración de procedencias tolerantes y resistentes a la EHPG. Promoción y distribución de las mismas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. Editorial Limusa, México. 838 p.
- ANDREWS, K; QUEZADA, J. 1989. Manejo Integrado de Plagas Insectiles en la Agricultura: Estado Actual y Futuro. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 623 p.
- BOA, F; LENNÉ, J. 1993. Final Report R4852 pilot assesment of diseases of important woody legumes in Central America and Mexico. Reino Unido. Natural Resources Institute. 125 p.
- CASTAÑO, J. 1994. Principios Básicos de la Fitopatología. 2 ed. Zamorano, Honduras. 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.
- DUKE, J. 1993. Handbook of energy crops: *Gliricidia sepium*. <http://Gliricidia-sepium.html>.
- GOMEZ, M. 1997. Arboles y arbustos forrajeros utilizados en la alimentación animal como fuente proteica. Cali, Col. CIPAV. 80 p.
- HAWKSWORTH, D. 1994. The identification and characterization of pest organisms. CAB International. Reino Unido. 501 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.
- KENYON, L; BLACK, R. DOYLE, P. 1996. Diseases of *Gliricidia sepium* in Latin America. Reino Unido. Natural Resources Institute. 50 p.
- LEE, M. Phytoplama home page. 1998. <http://plantpath.wisc.edu/~soyhome.pp/phyhome.htm>.
- MOUNT, M; LACY, G. 1982. Phytopathogenic Procaryotes. Academic Press. EEUU. 541 p.

NAULT, L; RODRIGUEZ, J. 1985. The leafhoppers and planthoppers. John Wiley&Sons, Inc. EEUU. 499 p.

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

SAS Institute Inc. SAS/STAT<sup>®</sup> User's Guide., Version 6. 4 ed. vol 2. Cary, NC:SAS Institute Inc. 1989. 846 p.

SMITH, D. 1999. PCR: polymerase chain reaction.  
<http://www.biology.ucsd.edu/others/dsmith/classes/pcr.html>.

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

## 7. ANEXOS

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

### Método CTAB modificado por Harrison.<sup>2</sup>

#### Buffer CTAB de Extracción 1

Calentar a 60°C antes de usar

2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

100mM Tris-HCl pH 8 (trisma base)

20mM EDTA pH 8 (ácido etilnodiaminotetraacético)

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            240ml

Alcohol isoamílico    10ml

#### 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 ultra pura de cuarzo

Micropipetas

Puntasde micropipetas

Tanque de baño María

Tubos de microcentrífuga

Microcentrífuga

---

<sup>2</sup> Comunicación personal. N. Harrison, Universidad de Florida, 1998.

### 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
3. Incube a 60 °C por 30 min
4. Añada igual volumen de cloroformo: isoamílico alcohol 24:1
5. Mezele bien
6. Centrifugue por 5 minutos a 5000rpm
7. Remueva el sobrenadante y colóquelo en otro tubo
8. Añada 1/10 de volumen del buffer CTAB 2 al sobrenadante
9. Repita los pasos 4,5,6,7
10. Añada 2/3 de volumen de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos
11. Centrifuge 5 min a 5000rpm
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. Deje precipitar 30 min a 4°C
17. Centrifuge por 5 min
18. Descarte el líquido, dejando el sedimento en el fondo del tubo
19. Seque el sedimento al aire por 30 min
20. Resuspenda el sedimento en agua bidestilada.

Método de extracción de ADN de insectos<sup>3</sup>

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

---

<sup>3</sup> Comunicación personal. N. Harrison. Universidad de Florida, 1998.

## Apexo 2 PROTOCOLOS DE PCR UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

Reacción en cadena de la polimerasa: primers P1 y P7 (Saballos, 1999).

### Mezcla para la reacción

2 µl del templete de ADN  
 0.5 µM de cada iniciador (P1 y P7)  
 100 µM de cada dNTP  
 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 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
Extención	72 °C	2 min

#### 28 ciclos

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

#### Ciclo final

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

Número total de ciclos= 30

Reacción en cadena de la polimerasa : primers PP/Glf y PP/Glr (Saballos, 1999).

Mezcla para la reacción

2 µl del template de ADN  
 0.5 µM de cada iniciador (PP/Glf y PP/Glr)  
 100 µM de cada dNTP  
 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 unidad de Taq polimerasa  
 1x buffer de PCR

Aceite mineral

Equipo

Micropipetas y puntas esteriles  
 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
Extención	72 °C	2 min

28 ciclos

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

Ciclo final

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