

## **Presentación oral**

**Tema:** Recursos naturales

**Autor responsable:** Dra. Arevik Poghosyan, Investigador Asociado  
CIBNOR, S.C. Mar Bermejo195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz,  
BCS, México, 23090. Tel.(612) 1238445. [arevik04@cibnor.mx](mailto:arevik04@cibnor.mx)

**Co-autor:** Dr. Vladimir Lebsky, Investigador Titular  
CIBNOR, S.C. Mar Bermejo195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz,  
BCS, México, 23090. Tel.(612) 1238445. [lebsky04@cibnor.mx](mailto:lebsky04@cibnor.mx)

## **Microscopía electrónica de barrido: una herramienta esencial para el diagnóstico de fitoplasmas**

**Arevik Poghosyan, Vladimir Lebsky**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste). Mar Bermejo195, Col. Playa Palo de Santa Rita,  
La Paz, BCS, México, 23090. [arevik04@cibnor.mx](mailto:arevik04@cibnor.mx)

**Introducción.** Los fitoplasmas, patógenos vegetales del grupo de *Mollicutes*, son agentes causales de más de 700 enfermedades de plantas [6]. El papel de los fitoplasmas es muy importante debido de su alta patogenicidad y severidad, muchas enfermedades asociadas con este patógeno se consideran como enfermedades cuarentenarias, algunas de cuales, como la punta morada de la papa, se han registrado también en México [1]. Hasta el 2004 en BCS no se habían realizado estudios sobre las enfermedades asociadas posiblemente con fitoplasma y cuyos síntomas eran atribuidos a un origen viral. Durante los últimos 4 años se hicieron recorridos fitosanitarios en las principales zonas agrícolas del Estado, en plantaciones y huertas de hortalizas (tomate, chiles, albahaca), frutales (papaya, granada, vid) y otras plantas (damiana, *Catharanthus roseus*, *Jasminum sambac*), incluyendo las plantas silvestres entre surcos y alrededor de plantaciones (cilantro, gloria de mañana, malva entre otras). Se observaron síntomas del tipo amarillamiento (reducción, clorosis y varias malformaciones de hojas apicales, necrotización de las hojas maduras, acortamiento de entrenudos y reducción de su espesor, anomalías florales, etc.), que hicieron sospechar su relación con fitoplasmas. Similares síntomas podrían ser provocados también por algunos virus y perturbaciones fisiológicas. El diagnóstico correcto de las enfermedades es una parte central en el monitoreo del estado fitosanitario, para definir su origen y elaborar las medidas preventivas y de combate, no solo en los cultivos agrícolas, sino también en los ecosistemas naturales, para conocer el impacto de patógenos en las comunidades vegetales.

**Objetivo.** Comprobar el origen infeccioso de los síntomas manifestados en el campo y diagnosticar el agente causal (fitoplasmas) en el floema de las plantas infectadas, aplicando la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB).

**Metodología.** Se colectaron muestras de plantas sintomáticas y asintomáticas de las plantas mencionadas

para realizar la indexación de los síntomas (mediante injertos de los brotes con síntomas a plantas indicadoras) y para la preparación de especímenes y el diagnóstico posterior de los fitoplasmas en los tejidos de floema mediante la técnica de MEB. Las muestras de plantas se colectaron en varias etapas de su crecimiento.

Las muestras de hojas (apicales y de entrenudos), de nervaduras y de pecíolos de las plantas, colectadas tanto en campo como de las plantas indexadas en invernadero, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2 M (pH 7.2-7.4) manteniéndolas a 4°C durante 24 horas, se lavaron en el mismo amortiguador (20 min.) y se deshidrataron en soluciones de etanol al 30, 50, 70, 96 y 100% para, finalmente, transferirlas en acetona al 100% o hexametildisilazano, con cambios cada 20 minutos respectivamente. Después de la deshidratación, las muestras se secaron en dióxido de carbono a punto crítico (Samdri PVT-3B), posteriormente, se cubrieron con paladio y se analizaron en el microscopio de barrido Hitachi S-3000N [5]. Como plantas control se utilizaron plantas micropropagadas de tomate, chile, papaya y damiana .

**Resultados.** El análisis de los especímenes mediante MEB, tanto de las muestras del campo como de las plantas indexadas, permitió detectar las partículas esféricas de fitoplasma en el tejido de floema de todas las plantas sintomáticas y algunas asintomáticas. El tamaño aproximado de las células fue 400-2000 nm. La morfología y tamaño de las estructuras, así como su localización en el floema correspondieron con los datos de otros autores en el caso de detección y estudio de fitoplasmas en varios cultivos aplicando misma técnica [4]. La concentración de los fitoplasmas fue variable en las distintas fases vegetativas en distintas plantas. No siempre se observó una correlación directa entre los síntomas manifestados y los patógenos observados: en las hojas malformadas a veces no se encontraron los fitoplasmas y en algunas muestras de las plantas asintomáticas colectadas en campo mostraron la infección latente. En la misma especie se observaron fitoplasmas de varios tamaños, separados o agrupados. Se observaron células de fitoplasma cercanas y entre los poros de los tubos cribosos, lo que sugiere su movimiento y transmisión de la infección a través de floema [5, 7]. En las plantas infectadas se observaron granos de almidón y cristales de sales, en particular, de oxalato de calcio. Los cristales estuvieron contenidos en estructuras especiales, los idioblastos. En el floema de cilantro además de las células de fitoplasma se distinguieron estructuras semejantes a espiroplasmas [2] con un tamaño aproximado de 6000x500nm.

**Conclusiones.** El diagnóstico de fitoplasmas en el tejido de floema de las plantas infectadas mediante MEB, tanto agrícolas como silvestres y la ausencia de estructuras similares en las plantas micropropagadas, así como la comparación de nuestros resultados con los datos existentes [4] es una evidencia del uso exitoso de la microscopía electrónica de barrido para el diagnóstico de fitoplasmas. Por su alta resolución, la capacidad de mostrar las estructuras en tres dimensiones y ser una técnica rápida y precisa, el MEB es muy recomendable para el diagnóstico rápido de fitoplasmas; para definir el agente causal antes de hacer la identificación de los fitoplasmas empleando métodos moleculares.

#### Referencias

- [1] EPPO/CABI (1992) Potato viruses (non-European). In: *Quarantine pests for Europe* (Ed. by Smith, I.M.; McNamara, D.G.; Scott, P.R.; Harris, K.M.). CAB International, Wallingford, UK.
- [2] Gasparich G.E. *Frontiers in Bioscience*, 7 (2002) 619-640.
- [3] Lebsky V. and Poghosyan A. *Bulletin of Entomology*, 60 (2007) 131-132.
- [4] Marcone C., Ragozzino A. *Petria*, 6 (1996) 125-136.
- [5] Poghosyan A., Lebsky V., Arce-Montoya M. and Landa L. *Journal of Phytopathology*, 152 (2004) 376-380.
- [6] Zhang I., Hogenhout S. A., Nault L.R., Hoy C.W. and Miller S.A. *Phytopathology*, 94 (2004) 843-849