

**ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE FITOPLASMAS de *Catharanthus roseus* POR
MEDIO DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE
TRANSMISIÓN Y BARRIDO LATERAL**

KELLY JOHANNA AVILA MENDEZ

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS, BIOLOGIA APLICADA
AREA DE FITOPATOLOGIA
BOGOTA
2006**

**ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE FITOPLASMAS de *Catharanthus roseus* POR
MEDIO DE TECNICAS DE MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRÓNICA DE
TRANSMISIÓN Y BARRIDO LATERAL**

KELLY JOHANNA AVILA MENDEZ

Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo

**Director
JUAN JOSE FILGUEIRA DUARTE
Biólogo M.Sc., Ph. D.**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS, BIOLOGIA APLICADA
AREA DE FITOPATOLOGIA
BOGOTA
2006**

A Dios, a mis padres, hermana y a Juan Carlos Sierra.

RESUMEN

El objetivo general planteado para éste trabajo consistía en describir mediante técnicas de microscopia óptica y electrónica (transmisión y barrido lateral), los microorganismos presentes en muestras de tejido floemático de *Catharanthus roseus* con síntomas de fitoplasmosis (fitoplasmas provenientes de árboles de Urapán ubicados en la Universidad Militar “Nueva Granada”), y adicionalmente evaluar tejido floemático de Urapán para comparar los cuerpos fitoplasmáticos detectados en ambos tejidos. Para cumplir tal objetivo, se realizó un estudio morfométrico donde se obtuvieron datos de diámetro promedio, grosor de membrana (una sola capa), abundancia y forma predominante de los fitoplasmas. Las técnicas histológicas realizadas, permitieron detectar y confirmar la presencia de fitoplasmas con forma y tamaño similares a los reportados en la bibliografía (Chapman, *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 2001; Pribylova *et al.*, 2001; Musseti *et al.*, 2002). Las características morfométricas que se encontraron para los fitoplasmas de *Catharanthus roseus* fueron las siguientes: rango de diámetro promedio (obtenido en las técnicas de microscopía óptica y electrónica): 0.6 μm a 1,5 μm ; forma predominante: circular, seguida de la ovalada y la pleomórfica.

Los ensayos realizados en extractos de floema de Urapán (tinción negativa) permitieron detectar fitoplasmas con un diámetro promedio de: 0.05 μm a 0.16 μm . Lo anterior, permitió establecer una clara diferencia entre los fitoplasmas que infectan los haces vasculares de *Catharanthus roseus* y Urapán siendo los de ésta última especie, de forma principalmente pleomórfica y de menor tamaño, lo cual se atribuyó posiblemente a la edad del fitoplasma y al estado de infección del Urapán, factores que pueden afectar la morfología y tamaño de los fitoplasmas (Chapman, *et al.*, 2001).

Finalmente, la técnica de barrido a pesar que permitió realizar un primer acercamiento de los fitoplasmas presentes en el tejido tanto de *C. roseus* y Urapán, no permitió hacer observaciones de tipo descriptivo debido a la imposibilidad que se presentó en el momento de realizar la técnica y al deterioro del tejido que se dio principalmente por las condiciones de bajo vacío del microscopio que ocasionaron un rápido desecamiento y daño de la muestra.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION.....	13
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	16
1.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Fraxinus</i> sp.....	16
1.2 DESCRIPCIÓN DE <i>Catharanthus roseus</i>	18
1.2.1 Síntomas de <i>Catharanthus roseus</i> asociados a fitoplasmas.....	19
1.3 FITOPLASMAS	19
1.3.1 Descripción general de los fitoplasmas.....	19
1.3.2 Síntomas asociados con fitoplasmas.	21
1.3.3 Vectores	21
1.3.4 Técnicas de detección de fitoplasmas	22
2. METODOLOGIA	24
2.1 ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO.....	24
2.1.1 Análisis sintomatológico de Urapán	25
2.1.2 Análisis sintomatológico de <i>Catharanthus roseus</i>	25
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO	26
2.2.1 Material vegetal.....	26
2.2.2 Recolección, selección y conservación del material vegetal	27
2.3 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	28
2.3.1 Detección mediante test DAPI.....	28
2.3.2 Registro de datos y toma de micrografías.....	28
2.4 MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCION	29
2.4.1 Tratamiento histológico.	29
2.4.2. Obtención de cortes semifinos.....	33
2.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	35

2.5.1 Microscopía electrónica de transmisión.....	35
2.5.2 Tinción negativa.....	36
2.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido	38
3. RESULTADOS Y ANALISIS	40
3.1 ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO.....	40
3.1.1 Síntomas de fitoplasmosis observados en Urapán (<i>Fraxinus</i> sp.)	40
3.1.2 Síntomas de fitoplasmosis observados en <i>Catharanthus roseus</i>	45
3.2 IDENTIFICACION DEL TEJIDO OBJETIVO MEDIANTE TEST DAPI	46
3.3 DETECCION MEDIANTE MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION	51
3.3.1 Tinción con azul de toluidina.....	51
3.3.2 Análisis morfométrico.....	54
3.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA	58
3.4.1 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION	58
3.4.2 TINCIÓN NEGATIVA.....	65
3.4.3 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO	69
4. DISCUSION	74
5. CONCLUSIONES	79
6. RECOMENDACIONES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	81

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Mapa representativo de la ubicación del Parque “El Virrey” ubicado en el nororiente de la ciudad de Bogotá	25
Figura 2. Diagrama de obtención de segmentos de peciolo y nervadura central de tejido de <i>C. roseus</i>	27
Figura 3. Representación esquemática de la metodología usada para la fase deshidratación del tejido	31
Figura 4. Representación de la metodología usada para el protocolo de solvente intermedio	31
Figura 5. Diagrama de ubicación de los árboles de la UMNG	37
Figura 6. Representación del montaje realizado en el portamuestras usado para microscopía electrónica de barrido con bajo vacío	39
Figura 7. Gráfica de porcentaje de Urapanes afectados con síntomas a fitoplasmas	42
Figura 8. Gráfica de porcentaje de Urapanes que presentan el síntoma de muerte apical	42
Figura 9. Fotografía de Urapán (Árbol No 2)	43
Figura 10. Fotografía de Urapán (Árbol No 9)	43
Figura 11. Fotografía de Urapán (Árbol No 13)	44
Figura 12. Fotografía de Urapán (Árbol No 14)	44
Figura 13. Gráfico de porcentaje de los síntomas presentados en <i>Catharanthus roseus</i>	46
Figura 14. Micrografía de corte longitudinal de nervadura central tratada con el reactivo DAPI. Tejido control; DAPI negativo, Planta control 16	47

Figura 15	Micrografía de corte longitudinal de nervadura central tratada con el reactivo DAPI. Tejido control; DAPI negativo, Planta control 22	48
Figura 16	Micrografía de corte longitudinal de nervadura central tratada con el reactivo DAPI. Tejido control; DAPI negativo, Planta control 16	48
Figura 17	Micrografía de corte longitudinal de nervadura central tratada con el reactivo DAPI. Tejido control; DAPI negativo, Planta control 16	49
Figura 18	Micrografía de corte longitudinal de nervadura central tratada con el reactivo DAPI. Tejido control; DAPI negativo, Planta control 16	49
Figura 19	Corte longitudinal de nervadura central de <i>C. roseus</i> teñido con Azul de toluidina. Planta 16	52
Figura 20	Corte longitudinal de peciolo de <i>C. roseus</i> teñido con azul de toluidina. Planta 16	52
Figura 21	Corte longitudinal de peciolo de <i>C. roseus</i> teñido con azul de toluidina. Planta 16	53
Figura 22	Corte longitudinal de nervadura central de <i>C. roseus</i> teñido con Azul de toluidina. Planta 16	53
Figura 23.	Corte longitudinal de nervadura central de <i>C. roseus</i> teñido con Azul de toluidina. Planta 17	54
Figura 24.	Micrografía electrónica de floema de <i>C. roseus</i>	59
Figura 25.	Micrografía electrónica de floema de <i>C. roseus</i>	59
Figura 26	Micrografía electrónica de floema de <i>C. roseus</i>	60
Figura 27	Micrografía electrónica de floema de <i>C. roseus</i>	60
Figura 28	Micrografía electrónica de floema de <i>C. roseus</i>	61
Figura 29	Micrografía electrónica de floema de <i>C. roseus</i>	64
Figura 30	Gráfico comparativo de diámetros obtenidos	64

Figura 31	Conteo de formas obtenidas en los análisis de microscopía Óptica de alta resolución	64
Figura 32	Conteo de formas obtenidas en los análisis de microscopía Electrónica de transmisión	65
Figura 33.	Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas	67
Figura 34.	Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas	67
Figura 35.	Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas	68
Figura 36.	Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas	68
Figura 37.	Micrografía electrónica de barrido de tejido de <i>C. rosues</i>	69
Figura 38.	Micrografía electrónica de barrido de tejido de <i>C. roseus</i>	70
Figura 39	Micrografía electrónica de barrido de tejido de <i>C. roseus</i>	70
Figura 40	Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán	71
Figura 41.	Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán	72
Figura 42.	Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán	72
Figura 43	Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán	73

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Formato de recolección de datos para el test DAPI	29
Tabla 2	Especificaciones de los componentes de la resina Spurr.	32
Tabla 3	Resultados obtenidos en el análisis sintomatológico realizado a 30 árboles de Urapán ubicados en el Parque “El Virrey” de Bogotá	41
Tabla 4	Resultados obtenidos en el análisis sintomatológico realizado a <i>C. roseus</i>	45
Tabla 5	Resultados obtenidos en el test DAPI realizado a peciolo y nervadura central de <i>C. roseus</i>	50
Tabla 6	Mediciones de diámetro promedio registradas en cuerpos fitoplasmáticos. Ensayos de tinción con azul de toluidina	55
Tabla 7	Medidas de diámetro en bacterias. Ensayo de tinción con azul de toluidina	56
Tabla 8	Conteo de las diferentes formas encontradas para los cuerpos fitoplasmáticos en los ensayos de azul de toluidina	56
Tabla 9	Conteo de fitoplasmas y bacterias por tubo criboso	57
Tabla 10	Abundancia de fitoplasmas y bacterias por tubo criboso.	58
Tabla 11	Mediciones de grosor de membrana de los fitoplasmas Técnica Microscopía electrónica de transmisión	62
Tabla 12	Mediciones de diámetro de los fitoplasmas Técnica microscopía electrónica de transmisión	63
Tabla 13	Conteo a las diferentes formas establecidas para fitoplasmas en microscopía electrónica de transmisión	63
Tabla 14.	Diámetro promedio de fitoplasmas obtenidos en tinción negativa	66

LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO 1. DATOS ORIGINALES DE LAS MEDIDAS TOMADAS A FITOPLASMAS EN MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION	86
ANEXO 2. DATOS ORIGINALES DE LAS MEDIDAS DE DIAMETRO TOMADAS A LAS BACTERIAS EN MICROSCOPIA OPTICA	87
ANEXO 3. MEDIDAS ORIGINALES DE DIAMETRO DE FITOPLASMAS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.	88
ANEXO 4. MEDIDAS ORIGINALES DE DIAMETRO DE BACTERIAS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.	89
ANEXO 5. DATOS ORIGINALES DE MEDICION DE GROSOR DE MEMBRANA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.	90
ANEXO 6 FORMATO RECOLECCION DE DATOS PARA EL ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO EN URAPÁN EN EL PARQUE EL VIRREY DE BOGOTÁ	91
ANEXO 7 FORMATO RECOLECCION DE DATOS PARA EL ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO REALIZADO A <i>Catharanthus roseus</i>	92
ANEXO 8 DATOS ORIGINALES DE CAMPO (TOMADOS EN EL PARQUE "EL VIRREY") DEL ANALISIS SINTOMATOLÓGICO REALIZADO A URAPAN	93

INTRODUCCION

El árbol de Urapán (*Fraxinus sp*), se introdujo en Colombia a lo largo de la zona Andina hace aproximadamente 50 años (Filgueira, *et al*, 2004). El grupo de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada, ha venido estudiando árboles del género *Fraxinus* debido a que se ha observado en un gran número de éstos (ubicados en Bogotá y en la Zona Cafetera), presentan síntomas asociados a fitoplasmas como decaimiento, amarillamiento de las hojas, patrones inusuales de crecimiento, entre otros (Filgueira, *et al*, 2004).

Debido a la imposibilidad de cultivar fitoplasmas en medios artificiales de cultivo, el estudio de estos microorganismos se ha llevado a cabo principalmente por medio de técnicas moleculares y genéticas. El uso de éstas técnicas, ha permitido detectar, identificar y clasificar fitoplasmas haciendo posible determinar asociaciones consistentes de éstos microorganismos con enfermedades específicas, reorganizarlas e identificar plantas afectadas por diferentes fitoplasmas (Davis y Sinclair, 1998).

Adicionalmente, otras herramientas de gran utilidad para el estudio de los fitoplasmas han sido las técnicas inespecíficas de detección como microscopía óptica (especialmente de fluorescencia), ó electrónica. Según Pribylova (2001), la microscopía electrónica de transmisión, ha sido utilizada tradicionalmente para demostrar la presencia de fitoplasmas en tejidos floemático.

A pesar de la gran utilidad de la microscopía como técnica de estudio, el grupo de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada ha enfrentado diferentes problemas para la identificación del fitoplasma que infecta el Urapán (*Fraxinus sp*) en Colombia. Pues no se ha logrado observar características específicas para su

identificación como forma, características membranales (condición trilaminar), entre otras.

Debido a los problemas de identificación a nivel microscópico anteriormente mencionados, éste trabajo busca aclarar en primer lugar la presencia de este microorganismo en tejido floemático de *Catharanthus roseus* (infectado con fitoplasmas provenientes de Urapán), y segundo, establecer parámetros morfométricos preliminares que permitan realizar descripciones morfológicas mas precisas de fitoplasmas brindando así información morfológica de éste microorganismo que afecta a los Urapanes de Colombia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica los microorganismos presentes en *Catharanthus roseus* con síntomas de decaimiento y determinar su pertenencia al grupo de los fitoplasmas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Establecer la morfología de los microorganismos presentes en *Catharanthus roseus* con el fin de aclarar su verdadera naturaleza.

Comparar las características morfológicas de los microorganismos presentes en muestras floemáticas de *Catharanthus roseus* con muestras de Urapán (*Fraxinus* sp).

1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1.1 DESCRIPCIÓN DE *Fraxinus* sp.

El árbol de Urapán, reportado anteriormente como *Fraxinus chinensis*, ha sido reidentificado como *Fraxinus udhei* mediante estudios taxonómicos, realizados por E. Wallander en el 2004, estos estudios reportaron además a éste árbol como una especie nativa de México.

El Urapán, es un árbol caducifolio que alcanza una altura promedio de 30 m. Su copa es compacta y redondeada hacia la punta. La corteza es de color gris claro y puede variar hasta verde oscura. Sus hojas son compuestas, opuestas, de 20 a 30 cm de longitud y con 5 a 9 folíolos (Lingelsh, 1907 Cita Web).

Presenta sus flores son unisexuales, en panículas estaminadas y pistiladas. Los racimos estaminados son cortos y densos y los racimos pistilados de 5 cm de largo. La coloración floral varía de verde a roja, además de ser flores simpétalas. Sus frutos solo tienen una semilla que crece en racimos densos de 15 a 20 cm de largo. (Lingelsh, 1907 Cita Web).

En Colombia, el Urapán se encuentra localizado en zonas rurales y urbanas de ciudades de la zona cafetera (Manizales, Pereira y Medellín) y en la Ciudad de Bogotá. Tiene uso ornamental y también gran importancia ecológica, teniendo en cuenta que ayuda a amortiguar el impacto de la temperatura, la contaminación, y el ruido que se produce en las ciudades, mientras que en las zonas rurales se encuentra como parte del paisaje o como cercas vivas (Filgueira, *et al.*, 2004).

1.1.1 Enfermedad del Urapán “Ash Decline”.

En los últimos veinte años, especies del género *Fraxinus*, han cobrado gran importancia debido a la enfermedad que se ha observado en ellos, asociada con la presencia de fitoplasmas (Feeley, *et al.*, 2001).

Esta enfermedad, se reportó inicialmente en Norte América, en donde se estableció que los fitoplasmas afectaban especies del género *Fraxinus*, lo cual se detectó para 16 estados norteamericanos y en dos provincias Canadienses (Sinclair y Griffiths, 1994).

Sin embargo, desde hace mucho tiempo, se sabe que los fitoplasmas no sólo afectan especies del género *Fraxinus* (afectan especies de interés agrícola como *Daucus carota*, *Brassica oleracea*, entre otras) y que no es un parásito restringido para Norte América, por el contrario, en Sur América, específicamente para el caso de Colombia se ha detectado y observado la presencia de éste parásito en Urapanes de zonas rurales y urbanas de Bogotá y el Eje Cafetero (Lee I. *et al.*, 2003; Filgueira *et al.*, 2004).

Los síntomas que se encuentran asociados principalmente con la enfermedad del Urapán que se conoce como “Ash Decline” son: retardo en el crecimiento apical, ramificación delicuescente, supresión en el desarrollo de la raíz, escobas de brujas; en las hojas se produce un cambio de color verde a oliva generando la muerte del tejido, malformaciones de las hojas, muerte, entre otros (Sinclair y Griffiths, 1996; Bricker y Stutz, 2004).

En Colombia, los árboles de Urapán comenzaron a presentar síntomas tales como decaimiento, amarillamiento, pérdida de hojas, entre otros, a principios de los años 90, principalmente, estos síntomas se asociaron con la presencia de la chinche del Urapán (*Tropidosteptes chapingoensis*). Sin embargo, el grupo de investigación de

Biotecnología Vegetal de la Universidad Militar Nueva Granada descubrió la presencia de síntomas asociados con fitoplasma. Entre los síntomas se encontraron ramificación delicuescente, hojas pequeñas, muerte apical de las ramas y follaje en copos.

Otros síntomas, como amarillamiento, no se pueden atribuir a un agente en particular (Franco y Filgueira *et al.*, 2003, Griffiths *et al.*, 2003). Otros estudios realizados enfocados a la sintomatología, realizados en la Universidad Militar Nueva Granada mostraron que los síntomas más representativos son ramas muertas, amarillamiento, pérdida de hojas, marchitez, brotes epicórnico, falta de crecimiento y en menor medida se presentan enrollamiento foliar, “die back”, hojas pequeñas, ramificación delicuescente, corona transparente y descortezamiento (Rodríguez, 2004).

1.2 DESCRIPCIÓN DE *Catharanthus roseus*

Especie conocida vulgarmente como “periwinkle” o vinca, recibió una nueva clasificación taxonómica en 1966 por Stearn, en la cual esta especie recibió el nombre científico por el que actualmente se conoce *Catharanthus roseus* (L) G. Don; perteneciente a la familia Apocinaceae y a la subfamilia Plumenoideae (Acosta de la Luz y Rodríguez, 2002).

C. roseus se encuentra distribuida ampliamente en países tropicales y subtropicales de África del Sur, Asia del Sur y Sur América (Acosta de la Luz y Rodríguez, 2002).

En cuanto a sus características botánicas se encuentra entre las hierbas anuales, teniendo como característica su gran ramificación. Alcanza a tener una altura promedio de 80cm, sus hojas son opuestas, oblongas y simples enteras de color verde oscuro (Acosta de la Luz y Rodríguez, 2002).

En cuanto a sus flores, estas presentan variación del color, que va desde flores blancas hasta flores blancas con centro rojo; así mismo la intensidad del rojo puede ser diferente (Acosta de la Luz y Rodríguez, 2002).

1.2.1 Síntomas de *Catharanthus roseus* asociados a fitoplasmas

Los síntomas asociados a *Catharanthus roseus* que se relacionan con la presencia de fitoplasmas están principalmente: amarillamiento de las hojas, aberraciones en el crecimiento (enanismo), proliferaciones, acortamiento de entrenudos, malformaciones florales, entre otros (Sandrine *et al.*, 2001; Davis y Sinclair, 1998).

1.3 FITOPLASMAS

1.3.1 Descripción general de los fitoplasmas.

Los fitoplasmas, nombrados así desde 1994 (anteriormente conocidos como micoplasma-like organisms, MLO), fueron observados por primera vez en 1967 en los tubos floemáticos de plantas infectadas (Garnier *et al.*, 2001; Bové, 1984; Lee, *et al.*, 2000).

Éstos microorganismos fueron observados por primera vez por medio de técnicas de microscopía electrónica de transmisión donde se logró observar: morfología pleomórfica con un diámetro promedio de 400 a 500 nm y un grosor membrana de 8 nm (Garnier, *et al.*, 2001). Los diferentes estudios en microscopía electrónica de fitoplasmas han generado reportado diferencias en cuanto a las características morfológicas de éstos organismos, existiendo reportes de análisis morfológicos donde los identifican con variedad de formas (ovaladas, circulares y espirales), variación de diámetro de 20 nm a 500 nm y alcanzado dimensiones hasta de 1.2 μm (Waters y Hunt, 1979, Ammar, *et al.*, 2004; Lee, *et al.*, 2000).

Además, ultraestructuralmente se ha observado la similitud que los fitoplasmas presentan con los micoplasmas que infectan a los animales de ahí que recibieran inicialmente el nombre de Micoplasma-like organism (MLO), (Garnier *et al.*, 2001; Waters y Hunt, 1979; Bové, 1984).

En cuanto a las características taxonómicas, los fitoplasmas son eubacterias que pertenecen a la clase Mollicutes, un grupo de organismos filogenéticamente relacionados con las bacterias Gram positivas (Garnier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998).

Las características principales de estos microorganismos son la carencia de pared celular, habitan principalmente los tubos cribosos del floema y que poseen una triple membrana plasmática (Lee *et al.*, 1998 y 2000).

Los dos grupos de Mollicutes conocidos actualmente son Spiroplasma; los cuales pueden ser cultivados en medio de cultivo y Fitoplasmas; los cuales no permiten su cultivo en medio artificial (Sandrine *et al.*, 2001; Puay y Whidow, 2001; Bové, 1984). Muchos espiroplasmas y fitoplasmas puede ser transmitidos a otros hospederos como por ejemplo *Catharanthus roseus*, por medio de plantas parásitas como *Cuscuta spp* (Sandrine *et al.*, 2001).

En cuanto a sus características genéticas los fitoplasmas presentan un tamaño pequeño del genoma (580- 2000 kbp), un bajo contenido de G y C, un bajo número de vías metabólicas (de ahí su dificultad para poder crecer en medios de cultivo). Únicamente presentan uno ó dos operones ribosomales y una baja cantidad de tRNA (Garnier *et al.*, 2001; Barros, *et al.*, 2002).

1.3.2 Síntomas asociados con fitoplasmas.

Los fitoplasmas se consideran como un grupo de patógenos responsables de cientos de enfermedades en plantas de interés comercial y ornamental distribuidas en diferentes partes del mundo (Khadjair *et al.*, 1999; Sandrine *et al.*, 2001; Lee, *et al.*, 2000).

Debido a que los fitoplasmas se localizan exclusivamente en los tubos cribosos del floema, estos microorganismos necesitan de un vector transmisor (Bové, 1984). El insecto una vez succiona el floema de una planta contaminada y se dirige a una nueva planta transmite el fitoplasmas; ubicando entonces al fitoplasmas en un nuevo hospedero, iniciándose un nuevo ciclo de infección (Bové, 1984; Khadhair *et al.*, 1999; Feeley, *et al.*, 2001; Sandrine *et al.*, 2001; Garnier *et al.*, 2001).

Los fitoplasmas inducen diferentes síntomas en las plantas que infectan entre los que se resaltan principalmente: amarillamientos de las hojas, acortamiento de entrenudos, proliferaciones anormales de ramas, malformaciones florales, esterilidad floral, reducción del tamaño del fruto y deformaciones, entre otros (Garnier *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 2001).

Así mismo, cabe resaltar que una planta puede ser infectada por varios tipos de fitoplasmas y adicionalmente una especie de fitoplasma puede infectar diferentes especies de plantas lo que está fuertemente asociado con los hábitos alimenticios del insecto vector (Lee *et al.*, 1998; Siddique *et al.*, 2001).

1.3.3 Vectores

El orden al cual pertenecen los principales vectores de fitoplasmas es el Orden Hemiptera, los cuales se consideran vectores eficientes debido a características relacionadas a los hábitos alimenticios; como por ejemplo, en diferentes estados

de desarrollo, ninfa y adulto tienen el mismo régimen alimenticio, además de ser especies específicas y selectivas para la alimentación (Weintraub y Beanland, 2006). Otra característica que presentan las especies vectoras de éste género es la correlación persistente que mantienen con el fitoplasma, la cual les permite crear una relación simbiótica con éste y asegurar el paso del fitoplasma a la planta hospedera (Weintraub y Beanland, 2006).

Las cuatro familias de fulgoridos más conocidas como vectores son Cixiidae, Delphacidae, Derbidae y Flatidae (Weintraub y Beanland, 2006; Garnier *et al.*, 2001; Khadhair *et al.*, 1999; Feeley, *et al.*, 2001).

1.3.4 Técnicas de detección de fitoplasmas

El estudio de los fitoplasmas se ha desarrollado principalmente por medio de técnicas moleculares específicas como PCR (Polimerase Chain Reaction), “Nested” PCR, hibridación de sondas (Sinclair y Griffiths, 1992; Barros; *et al.*, 2002; Bricker y Stutz, 2004;).

También se utilizan pruebas menos específicas de microscopia de fluorescencia como DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol-2HCL) y microscopía electrónica; ya que algunos por fitoplasmas pueden estar suficientemente bien caracterizados para permitir el diagnóstico por prácticas microscópicas (Davis y Sinclair, 1992; Bricker y Stutz J, 2004).

Como se mencionó anteriormente, la imposibilidad de cultivar éstos microorganismos en condiciones *in vitro* ha llevado a utilizar herramientas de estudio alternativas como las técnicas genéticas y moleculares de estudio, que para el caso particular de los fitoplasmas se han adelantado estudios del gen 16S rRNA y de la región espaciadora entre el 16S y el 23S rRNA han brindado información valiosa sobre la naturaleza de éste patógeno (Lee *et al.*, 1998; Siddique *et al.*, 2001).

La caracterización molecular de genes conservados ha presentado una solución parcial al problema de establecer la construcción de la clasificación de los caracteres fenotípicos para esta especie (Davis y Sinclair, 1998).

Las técnicas de microscopía óptica, electrónica de transmisión y barrido han sido también de gran ayuda para la identificación de estos microorganismos y así mismo a la determinación de sus características ultraestructurales. Como se mencionó anteriormente, el rango de tamaño reportado para éstos microorganismos en los diferentes estudios es variable, donde su diámetro promedio puede variar de 120nm a 240 nm resultados reportados por Champman y colaboradores (2001); 400 nm por Pribylova y colaboradores (2001) y 1.2 μm Mussetti y Favali (2004).

Así mismo, las formas predominantes observadas en cortes ultrafinos de tejido floemático afectado con fitoplasmas varia en formas circulares, elípticas, ovoides y esféricas inclusive se han observado arreglos en cadenas similares a los estreptococos (Chapman, *et al.*, 2001; Pribylova *et al.*, 2001; Mussetti *et al.*, 2002).

Los estudios de microscopía electrónica de barrido por su parte son muy escasos y los realizados se han dirigido principalmente a extractos o purificados de espiroplasmas (provenientes de tejido floemático infectado con éste tipo de microorganismo); que son el otro grupo de Mollicutes patógenos que si permiten ser cultivados *in vitro* (Poghosyan y Lebsky, 2004).

2. METODOLOGIA

2.1 ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO

Debido a la similitud de síntomas de fitoplasmosis que presenta *C. roseus* con los manifestados por Urapán (Sandrine, *et al.*, 2001) se pretendía entonces por medio de ésta metodología observar la correlación de síntomas presentados por ambas especies.

El análisis sintomatológico que se realizó en Urapán se llevó a cabo en 30 árboles de Urapán ubicados en el Parque “El Virrey” de la ciudad de Bogotá (Ver figura 1), los síntomas asociados a fitoplasmas que se observaron, se tomaron con base al trabajo realizado en la Universidad Militar “Nueva Granada” por Aldana y Castro en el 2003.

Los datos recolectados para *Catharanthus roseus* fueron de plantas sembradas bajo condiciones de laboratorio, (Laboratorio de Biotecnología, Universidad Militar “Nueva Granada”), de éstas plantas posteriormente y con base en el análisis sintomatológico, se tomaron muestras de tejido de peciolo y nervadura central para análisis histológico de microscopía óptica de alta resolución, electrónica de transmisión y barrido.

Adicionalmente es importante anotar que se decidió evaluar histológicamente muestras de *C. roseus* (y no solamente de Urapán) debido a los problemas histológicos que se presentaron en trabajos anteriores con ésta especie.

2.1.1 Análisis sintomatológico de Urapán

El análisis sintomatológico se realizó por medio de observaciones (no se tomaron muestras de ninguno de los árboles observados). Se identificaron síntomas asociados a: fitoplasmas, insectos y otros; éstos últimos se relacionan principalmente con factores ambientales como temperatura, humedad, lluvia, entre otros (Ver planilla de registro, Anexo 6).

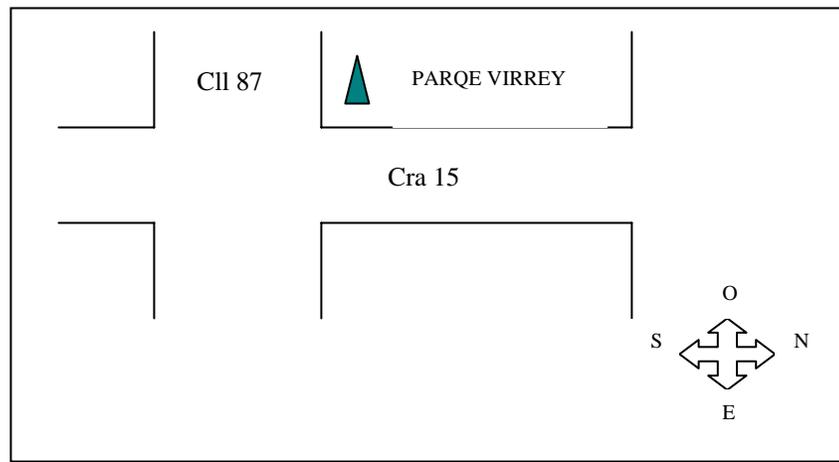


Figura 1. Mapa representativo de la ubicación del Parque “El Virrey” ubicado en el nororiente de la ciudad de Bogotá, El triángulo verde representa la zona de muestreo (30 árboles). Posición geográfica del Parque 4°40’ 26.75 “ N, 74° 03’ 21.81 “ W

2.1.2 Análisis sintomatológico de *Catharanthus roseus*

Se analizaron 9 plantas las cuales correspondían a la totalidad de plantas del laboratorio de Biotecnología con presencia de síntomas asociados con fitoplasmas.

Estas plantas fueron infectadas previamente con la ectoparásita *Cuscuta* sp. la cual a su vez provenía de árboles infectados de fitoplasmas de Urapán. Dicho procedimiento se describe a continuación:

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1 Material vegetal.

Las muestras de tejido vegetal de *C. roseus* fueron tomadas del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Militar Nueva Granada, las cuales fueron infectadas previamente con fitoplasmas provenientes de Urapán de la zona urbana de Bogotá (Ubicados en la Universidad Militar Nueva Granada, ver figura 4), por medio de la planta ectoparásita *Cuscuta* sp.

Las plantas de *C. rosues* fueron obtenidas bajo condiciones de laboratorio germinadas a partir de semillas (este procedimiento se realizó anteriormente para otros estudios del laboratorio) de la siguiente manera:

1. En turba húmeda autoclavada se sembraron semillas de vinca y se incubaron a 27°C por dos días.
2. La bandeja de incubación luego se llevó a temperatura ambiente. La bandeja de incubación no estuvo directamente expuesta a la luz
3. Una vez obtenidas las plántulas éstas se transfirieron a matera y se mantuvieron con una frecuencia de riego de dos veces por semana con fertilizante (100 gr/L de fertilizante).
4. Una vez las plántulas alcanzaron una altura promedio de 30 cm se infectaron con la ectoparásita *Cuscuta* sp.

El procedimiento de obtención de plántulas de *Cuscuta* sp. fue el siguiente:

1. Semillas de *Cuscuta* sp. se agitaron en ácido sulfúrico al 98% hasta que la solución tomara un color café.
2. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua para removerles la testa y se sembraron en arena fina estéril y húmeda

3. Cuando alcanzaron el estado de plántula, se transfirieron a tubos Eppendorf con 2 mL de agua destilada estéril.
4. Las plántulas se enredaron en tallos de Urapán ubicados en la Universidad Militar Nueva Granada (Figura 4).

Para el procesamiento y análisis histológico para microscopía (óptica, electrónica y barrido), se trabajó con pecíolo y nervadura central de *C. roseus* sintomático de fitoplasmosis.

2.2.2 Recolección, selección y conservación del material vegetal

Una vez realizada la identificación y el reconocimiento de síntomas se procedió a tomar muestras de hojas basales y apicales y bajo vista en estereoscopio y se removió la lamina foliar para aislar el pecíolo y la nervadura central.

Adicionalmente, se tomó una planta sana como control negativo para hacer el reconocimiento de las estructuras principales del tejido objetivo: Floema.

El pecíolo y la nervadura central fueron lavados en agua destilada estéril, una vez lavados, estos tejidos se cortaron transversalmente en tres segmentos con el fin de evaluar los extremos con el reactivo DAPI y preservar el segmento medio para análisis histológicos posteriores. El segmento medio se preservó en buffer fosfato de potasio 0.2 M pH 7.3 con glutaraldehído al 2.5% (v/v) a 4°C.

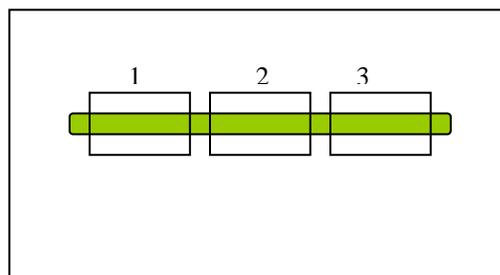


Figura 2. Diagrama de la obtención de segmentos del pecíolo y nervadura central de tejido de *C. roseus*. Los segmentos 1 y 3 corresponden a los extremos a los cuales se les realizó el test DAPI y el segmento 2 corresponde al segmento medio que se preservó en buffer.

2.3 MICROSCOPIA ÓPTICA

2.3.1 Detección mediante test DAPI.

La presencia de fitoplasmas en las muestras de *C. roseus* se evaluó por medio del test DAPI (4'.6' diamino – 2- fenilindole – 2HCL). Esta prueba se llevó a cabo sobre cortes longitudinales de pecíolo y nervadura central. Una vez seleccionados, éstos se colocaron individualmente en un cubo de icopor de 1 cm³ aproximadamente, el tejido se cortó a mano alzada con cuchillas estériles, (la cuchilla se cambió cada cuatro cortes). Los cortes obtenidos fueron depositados en una caja de Petri con agua destilada estéril para evitar la desecación y daño del tejido y para posterior tratamiento con el reactivo DAPI.

Finalmente, se realizó una selección visual de los cortes (delgados y sin daño aparente en el tejido), los cuales se fijaron en buffer fosfato con glutaraldehído al 4% (Fosfato de potasio dibásico 0.2M pH 7.3). Los cortes seleccionados se ubicaron en un portaobjetos, se trataron con el reactivo DAPI (0.2 µg/mL) durante 30 min bajo condiciones de oscuridad a 4°C. Transcurrido este periodo de tiempo, se lavó el exceso de reactivo con agua destilada estéril y bajo condiciones de oscuridad se observaron los cortes empleando un microscopio de fluorescencia Axioskop 2 Plus ® a diferentes aumentos.

2.3.2 Registro de datos y toma de micrografías.

Los datos fueron registrados en la planilla de registro de datos que se muestra a continuación. y se tomaron micrografías con una cámara digital Canon G5 de 5.0 Mega Pixeles.

El registro de datos se realizó con base en la presencia ó ausencia de cuerpos fitoplasmáticos, adicionalmente también se registró cuando por condiciones de

grosor o de conservación del tejido no se pudo determinar la presencia o ausencia de éstos cuerpos (Tabla 1).

Tabla 1. Formato de recolección de datos para el Test DAPI. Primera columna se registró el número de la planta (ésta se tomo de la numeración que tenían las plantas en el laboratorio) y el número de la hoja tomada de cada planta. Segunda columna número del corte evaluado; en la tercera y cuarta columna se marcó con una X de que parte provenía el corte, peciolo o nervadura. Cuarta columna resultado del Test marcando con los siguientes signos: (+) positivo presencia de fitoplasmas, (-) negativo ausencia de fitoplasmas y (0) cero no se pudo determinar presencia o ausencia.

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA				
Registro de Observaciones para el TEST DAPI en la especie <i>Catharanthus roseus</i>				
ESTUDIO MORFOMETRICO DE FITOPLASMAS PRESENTES EN <i>Catharanthus roseus</i> POR MEDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA Y DE BARRIDO				
Fecha		KELLY AVILA MENDEZ		
Planta	Corte No	Parte de la hoja		Resultado
		Nervadura	Peciolo	

2.4 MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION

2.4.1 Tratamiento histológico.

La preparación del tejido (fijación, lavado, deshidratación, inclusión, polimerización y obtención de cortes, se hizo con el protocolo adaptado de Bozzola y Russel (1999), y teniendo en cuenta la técnica empleada por Pribylova y colaboradores (2001).

Se tomaron segmentos de peciolo y nervadura central conservados en buffer fosfato con glutaraldehído al 4% (Fosfato de potasio dibásico 0.2M pH 7.3) y se cortaron con una cuchilla estéril para obtener nuevos fragmentos de tejido de aproximadamente 1 mm³.

Estos nuevos fragmentos, con una pinza estéril se sumergieron en tubos Eppendorf de 1 mL en buffer de fijación primaria fresco (con Buffer fosfato de potasio 2% (p/v) pH 7,3 con glutaraldehído 5% (v/v) y sacarosa 4% (p/v) 5%.

2.4.1.1 Fijación Primaria

El tejido se fijó por medio de una inmersión total en buffer de fijación primaria (Buffer fosfato 0.2M, glutaraldehído 5%, sacarosa 4%), durante 3 horas a 4°C en cámara de vacío. Lo anterior se realizó con el fin de desgasificar el tejido y evitar el daño posterior que se puede ocasionar en el tejido debido a los siguientes pasos de tratamiento histológico

2.4.1.2 Lavado.

Con el fin de remover el exceso de glutaraldehído que permanece en el tejido luego de la fijación primaria y preservar los ácidos nucleicos, se lavó el tejido a 4°C durante 30 min con el mismo buffer vehiculo (buffer fijación primaria), más una solución 0.5 mM de CaCl₂, Una vez realizado este lavado los tejidos se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf para iniciar el proceso fijación secundaria.

2.4.1.3 Fijación Secundaria.

Los fragmentos de tejido se sumergieron en una solución de Tetróxido de Osmio al 1% (p/v) en agua destilada estéril durante dos horas a 4°C en cámara de vacío. Lo anterior, con el fin de fijar y contrastar la membrana (el tetróxido de osmio reacciona con las moléculas lipídicas de la membrana).

2.4.1.4 Deshidratación.

El acondicionamiento del tejido para la infiltración de las resinas Epoxi se inició con la deshidratación del mismo utilizando como disolvente intermedio el etanol.

El protocolo de deshidratación se llevó a cabo en series ascendentes (de menor a mayor concentración), empezando en etanol al 25% y terminando en etanol al 100% por periodos de 30 minutos cada uno.

Todo el procedimiento de ésta fase se realizó a temperatura ambiente y se explica en la siguiente figura (Gráfica 3).

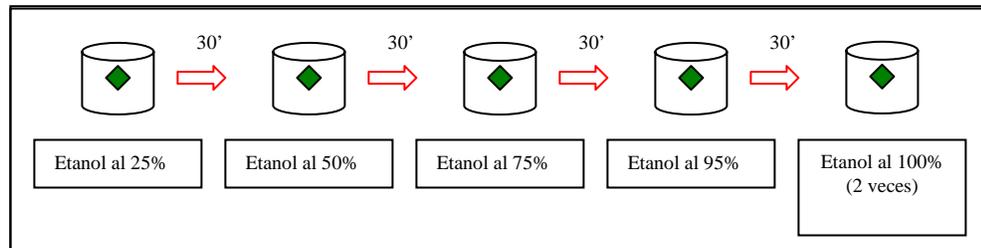


Figura 3. Representación esquemática de la metodología usada para la fase de deshidratación del tejido. Flechas rojas indican la transferencia del tejido a un alcohol de mayor concentración. Cada segmento de tejido (representado aquí como un rombo verde) estaba en un tubo Eppendorf (representado aquí como un cilindro).

2.4.1.5 Solvente Intermedio.

Al igual que en la fase anterior de deshidratación, esta fase se realizó en series ascendentes por periodos de 20 minutos cada una a temperatura ambiente. Las concentraciones de óxido de propileno utilizadas fueron 25%, 50%, 75% y 95%.

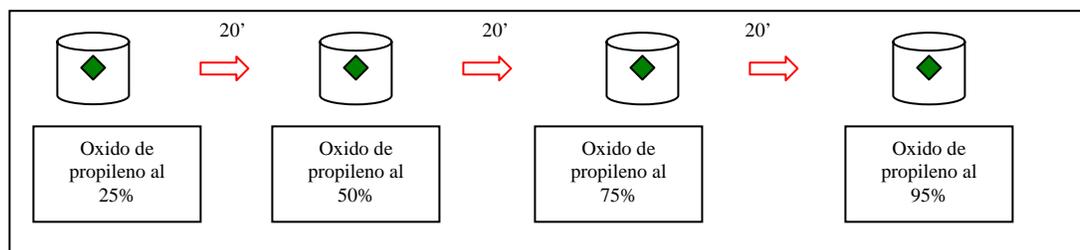


Figura 4. Representación de la metodología usada para el protocolo del solvente intermedio. Flechas rojas indican la transferencia del tejido a una concentración mayor de óxido de propileno. Cada segmento de tejido (representado aquí como un rombo verde) estaba en un tubo Eppendorf (representado aquí como un cilindro).

2.4.1.6 Inclusión en resina.

El acondicionamiento del tejido para cortes semifinos se realizó utilizando la resina Spurr (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Especificaciones de los componentes de la resina Spurr.

COMPONENTE	DENSIDAD (g/cm ³)	FUNCION
ERL 4296 (VCD) Vinil-4- Cyclohexene Diepoxide	1.10	Resina
DMAE 2-(Dimethylamino) ethanol	0.89	Acelerador
NSA Noenyl Succinic Anhydride Modified	1.03	Endurecedor
DER 736 Resina Epoxy	1.14	Flexibilizador

Para obtener la dureza adecuada para la inclusión del tejido se tomaron primero 8.2 mL de VCD, se mezcló con 4.8 mL de DER 736, una vez homogenizada ésta mezcla se añadió 23.1 mL de NSA, finalmente se añadieron 400 µL de DMAE y se homogenizó nuevamente la mezcla. La determinación del volumen de cada componente se determinó teniendo en cuenta la densidad de cada uno.

La infiltración del tejido en resina se hizo bajo agitación constante usando una solución de óxido de propileno y resina de la siguiente manera: 2 partes de óxido de propileno: 1 parte de Resina Spurr por 1 hora; 1 parte de óxido de propileno: 1 parte de Resina Spurr por 1 hora (se repitió 2 veces con la misma duración), y finalmente resina pura toda la noche; ésta última fase se realizó a 4°C. Las primeras infiltraciones se realizaron a temperatura ambiente.

2.4.1.7 Inclusión y Polimerización.

Se tomaron cápsulas BEEM de plástico (Better Equipment for Electron Microscopy), a las cuales se les añadió 0.5 mL de la mezcla de resina pura.

El tejido fue introducido en la parte inferior de la cápsula para la obtención de cortes semifinos. El proceso de polimerización se llevó a cabo dejando las cápsulas de plástico en horno por 24 horas a 60°C.

2.4.2. Obtención de cortes semifinos.

Con el fin de realizar la valoración del tejido y poder determinar los tejidos que serían procesados por microscopia electrónica de transmisión se realizó el protocolo sugerido por Bozzola y Russel (1999), en el cual, los bloques se acondicionan dejando la muestra expuesta, y se corta la superficie de la resina con forma trapezoidal; lo anterior se realizó bajo vista en estereoscopio y con cuchillas estériles.

Los cortes semifinos se realizaron en un ultramicrotomo Sorvall MT-1 Porter Blue., se hicieron aproximadamente de 5 a 7 cortes por bloque de tejido con un grosor aproximado de 1µm.

2.4.2.1 Tinción con azul de toluidina.

Una vez obtenidos los cortes, éstos se situaron en un portaobjetos cubierto con una gota de agua destilada estéril, los cuales se dejaron secando en una plancha de calentamiento a 50°C por un tiempo de 5 a 10 min.

Una vez secos, se trataron con una solución concentrada de azul de toluidina (1%), por un tiempo aproximado de 1 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar en la plancha de calentamiento nuevamente aproximadamente 30 seg.

Finalmente, se cubrieron con una laminilla y una gota de Entellan® y se dejaron secar a temperatura ambiente.

2.4.2.2 Toma de micrografías por microscopía óptica de alta resolución.

El estado de conservación del tejido y la calidad del mismo se valoró realizando observaciones en un microscopio de luz de alta resolución Axioskop 40 FL Plus Carl Zeiss a diferentes aumentos.

Se realizó un registro fotográfico de los tejidos (Cámara Digital Canon G5) y se tomaron mediciones de diámetro de los cuerpos fitoplasmáticos observados, con la reglilla microscópica del equipo.

Sobre las mediciones realizadas, es importante aclarar que se tomaron tres medidas: Diámetro mayor, diámetro menor y la transversal; para obtener el diámetro promedio estas medidas se sumaron y se dividieron por tres, teniendo en cuenta la diversidad de formas presentadas por los fitoplasmas.

Es importante resaltar que la magnificación obtenida de las micrografías de éste trabajo corresponden al producto del objetivo (100X), por el foto tubo (4X) y el aumento de la cámara (Cámara Digital Canon G5) que varió según la resolución necesaria de la imagen (vario entre 5.1X a 8.1X).

2.4.2.3 Análisis de micrografías

Se realizó una selección visual de las micrografías y se seleccionaron aquellas donde se pudiera encontrar cuerpos fitoplasmáticos para realizar una identificación preliminar de las diferentes formas presentadas por los fitoplasmas, y adicionalmente donde se pudiera realizar un conteo de los cuerpos fitoplasmáticos observados en los tubos cribosos para establecer de manera cuantitativa su distribución.

2.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

2.5.1 Microscopía electrónica de transmisión.

El acondicionamiento histológico para microscopía electrónica de transmisión se hizo por medio del protocolo modificado de Reynolds (1963), en donde cuya característica principal es el contraste que se le hace al tejido con nitrato de plomo a pH básico.

Los bloques seleccionados por medio de microscopía óptica de alta resolución se perfilaron con cuchillas minora estériles hasta obtener una pirámide que sólo tuviera el segmento de tejido y lo dejara expuesto para la observación en cortes ultrafinos por medio de microscopía electrónica de transmisión.

En el ultramicrotomo (se utilizó el mismo equipo que para los cortes semifinos), se obtuvieron de 6 a 10 cortes con un grosor promedio de 250 nm; una vez obtenidos los cortes éstos se pescaron de arriba hacia abajo con una rejilla de colodión para llevarlas a secado en papel del filtro (las rejillas se secaron por el lado que no tiene el corte para evitar el deterioro de éste).

Una vez ubicados los cortes en las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y nitrato de plomo de la siguiente manera: En una caja de Petri, se realizó una cámara húmeda (papel de filtro humedecido con etanol al 70%) y se colocó parafilm dentro de ésta. Posteriormente, se añadieron gotas de uranilo; una gota de uranilo por cada rejilla y con unas pinzas estériles se depositó la rejilla con el lado del corte hacia el colorante por 10 min., en condiciones de oscuridad.

Luego, se lavaron las rejillas con gotas de agua destilada estéril por 20 segundos y se secaron con papel de filtro sólo se secaba el lado de la rejilla, no se seca el lado donde está el corte.

Seguido de esto, se colocó un nuevo parafilm en la cámara húmeda con gotas de citrato de plomo (al igual que con el uranilo el número de gotas depende del número de rejillas a contrastar) y se dejaron los cortes expuestos al colorante por 6 min se lavaron y se secaron como en el procedimiento anterior: Se dejaron un tiempo de 10 min antes de poder hacerles observaciones al microscopio electrónico.

Finalmente, se hicieron observaciones en un microscopio electrónico de transmisión (MET), Hitachi HU-12^a a 75 KV.

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos por microscopía óptica, al igual que en el caso anterior se tomaron las medidas anteriormente establecidas para dichos microorganismos y se realizó igualmente el análisis morfométrico.

2.5.2 Tinción negativa

2.5.2.1 Extracción floema de Urapán (*Fraxinus* sp.)

Para comparar los resultados obtenidos en *C. roseus* con Urapán se tomaron muestras de hojas de Urapán de la Universidad Militar Nueva Granada (árboles 96, 97, 98 y 100; ver figura 5).

Las hojas de los árboles se lavaron agua destilada estéril y para la extracción del floema, se oprimió a lo largo de la nervadura hacia el peciolo con una barra de vidrio, de manera, que al final se lograba obtener el extracto.

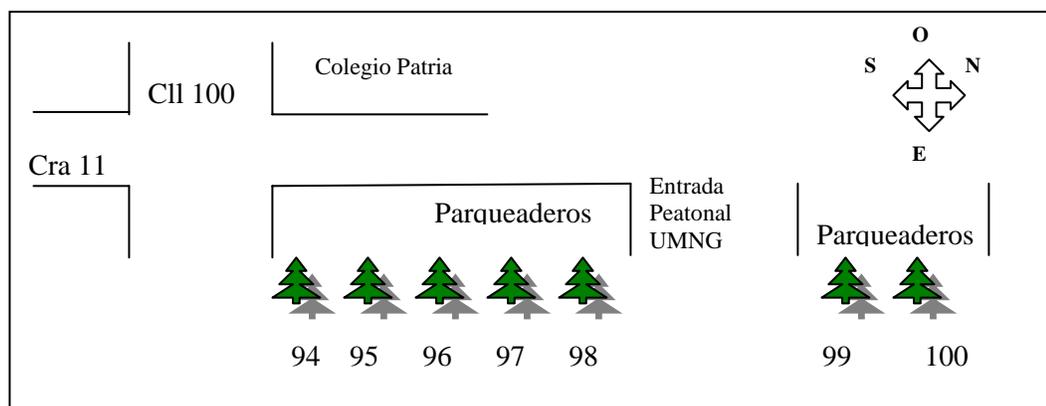


Figura 5. Diagrama de ubicación de los árboles de Urapán de la UMNG. Tomados para la recolección de muestras de hojas infectadas.

Debido a la poca cantidad obtenida de floema por medio de este procedimiento, éste se realizó en aproximadamente 300 hojas para poder obtener un volumen de 0.5 mL, el cual era suficiente para el procedimiento de tinción. El floema extraído se preservó en 1 mL de buffer de fijación primaria (buffer fosfato 0.2M, glutaraldehído 5%, sacarosa 4%) a 4°C.

2.5.2.2 Preparación de las rejillas

Las rejillas para la tinción negativa se recubrieron con colodión (nitrocelulosa en amilacetato al 0.1%).

En un vaso deprecitado con agua destilada estéril se añadieron dos gotas de colodión. Pasados aproximadamente 2 min, y luego de hacer una revisión visual de la membrana de colodión se ponía sobre ésta con unas pinzas estériles de 4 a 5 rejillas, éstas eran retiradas del vaso deprecitado con un portaobjetos, el cual, al sumergirse provocaba que la membrana junto con las rejillas giraran 180° y quedaran adheridas al porta objetos.

Finalmente la calidad del cubrimiento de la rejilla con la membrana de colodión se revisó por observación al estereoscopio en donde se examinaba que la totalidad

de la rejilla hubiese quedado cubierta y que ésta no estuviera plegada o con estrías.

2.5.2.3 Procedimiento de tinción negativa.

En un porta muestras se colocaron las rejillas y se les añadió 5 µL del extracto de floema de Urapán, el cual se dejó secar en cámara extractora por un tiempo de 30 minutos.

Transcurrido este tiempo y una vez estuvieron secas las rejillas, el extracto se contrastó con una solución de ácido fosfotungstico (AFT) en acetona al 1%. Las rejillas se dejaron con el colorante, no fueron lavadas con agua destilada estéril debido a la baja concentración del AFT (Procedimiento mencionado por Santander originalmente sugerido por Hampton 1964).

2.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido

Los análisis de microscopía electrónica de barrido se realizaron en un Microscopio FEI Quanta 200 y las condiciones del equipo a la cual se sometieron las muestras fueron: 0.95 Torr, vapor de agua, temperatura interna del equipo 18°C..

El análisis de muestras por medio de ésta técnica se realizó con tejido floemático de *C. roseus* (tejido de las plantas utilizadas en los ensayos anteriores) y árboles de Urapán de la Universidad Militar Nueva Granda (ver figura 5).

Para el análisis de los segmentos de las muestras vegetales se procedió a realizar cortes longitudinales a mano alzada. Los cortes se colocaron en un porta muestras (éste permite el manejo de 7 muestras de 1 cm²), el cual se introdujo en una cámara de muestras motorizada adecuado para las condiciones de bajo vacío del microscopio al cual fueron sometidas las muestras. Es importante resaltar que para el proceso de barrido el grosor de la muestra era irrelevante, por lo tanto sólo

se tomó en cuenta para los cortes que el área del corte fuera el adecuado para el porta muestra. (Ver Figura 6)

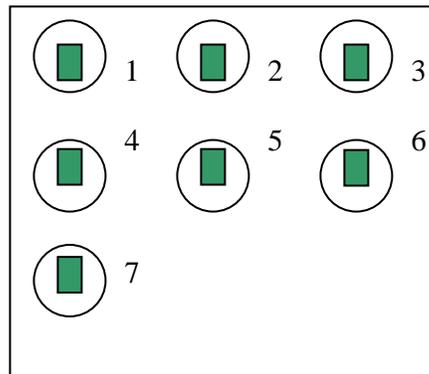


Figura 6. Representación del montaje realizado en el porta muestras usado para microscopía electrónica de barrido con bajo vacío. En cada círculo se montaban dos muestras de cortes longitudinales de peciolo y nervadura central (simbolizado aquí como rectángulo verde). Los números indican las marcas del portaobjetos las cuales se utilizaban como guía para realizar el barrido total de las muestras.

Una vez introducidas las muestras en el microscopio de barrido, se dejaron un tiempo aproximado de 5 min., con el fin de ajustar el equipo a las condiciones de bajo vacío requeridas para la observación de las muestras.

Una vez ubicado el tejido objetivo (floema), éste se barrió en su totalidad y se tomaron micrografías a diferentes magnificaciones.

Para este tipo de microscopía no se realizaron mediciones ya que el objetivo de realizar esta técnica era observar la morfología externa de los fitoplasmas.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO

El análisis sintomalógico realizado en Urapán y *C. roseus* permitió detectar una correlación de los síntomas causados por los fitoplasmas en ambas especies vegetales. A pesar que hay síntomas similares presentados por las dos especies, como amarillamiento y acortamiento de entrenudos, no se puede afirmar con certeza que esta similitud sea una respuesta exclusiva frente a la infección de los fitoplasmas, pues la fisiología de las dos especies y su respectiva respuesta a un ataque (así sea producida por el mismo agente causal) puede llegar a ser diferente.

3.1.1 Síntomas de fitoplasmosis observados en Urapán (*Fraxinus* sp.)

La Tabla No 3 muestra los resultados obtenidos en el análisis de síntomas, relacionado con la presencia de fitoplasmas (Datos originales de los otros síntomas ver Anexo No 8).

La figura 7 permite ver el porcentaje calculado de la presencia de cada uno de los síntomas registrados y observados. En ésta gráfica se puede destacar que para los árboles evaluados el síntoma más frecuente en éstos corresponde al de crecimiento epicórnico y hojas pequeñas; mientras en menor porcentaje se observa el síntoma de descortezamiento (sólo se observó en un árbol, ver tabla 3). La figura 7 no incluye el síntoma de muerte apical, pues éste fue registrado de forma diferente (en fracciones según el grado de intensidad, ver Anexo 6), y se calculó el porcentaje de éste síntoma de manera individual (Ver figura 8).

Tabla 3. Resultados obtenidos en el análisis sintomatológico realizado a 30 árboles de Urapán ubicados en el Parque “El Virrey” de Bogotá.

Arbol No	ASOCIADOS A FITOPLASMAS					
	CE	HP	MA	RC	DL	DC
1	1	1	1/3	1	0	0
2	1	1	2/3	0	1	0
3	1	1	0	0	0	1
4	1	1	1/3	1	1	0
5	1	1	1/3	0	1	0
6	1	1	0	0	0	0
7	0	1	2/3	0	1	0
8	1	1	1/3	0	1	0
9	1	1	0	1	0	0
10	1	1	1/3	1	1	0
11	1	0	1	1	1	0
12	1	1	0	1	1	0
13	1	1	1/3	1	1	0
14	1	1	0	1	0	0
15	1	1	0	1	0	0
16	0	1	1/3	0	1	0
17	0	1	2/3	1	1	0
18	1	1	0	1	1	0
19	1	1	1/3	1	1	0
20	1	1	2/3	1	1	0
21	1	1	1/3	1	1	0
22	1	1	1/3	0	1	0
23	1	1	1	0	1	0
24	1	1	2/3	1	1	0
25	1	1	1/3	0	0	0
26	1	1	1/3	0	1	0
27	1	1	1/3	0	1	0
28	1	1	2/3	1	1	0
29	1	1	1/3	1	1	0
30	1	0	1/3	0	0	0

El número 1 indica la presencia del síntoma y el 0 indica la ausencia del síntoma.

CE: Crecimiento epicórnico. HP: Hojas pequeñas. MA Muerte apical. RC: Ramas en copo. DL: Delicuescencia. DC Descortezamiento. El 1 que se registra en el síntoma de MA es el equivalente a 3/3.

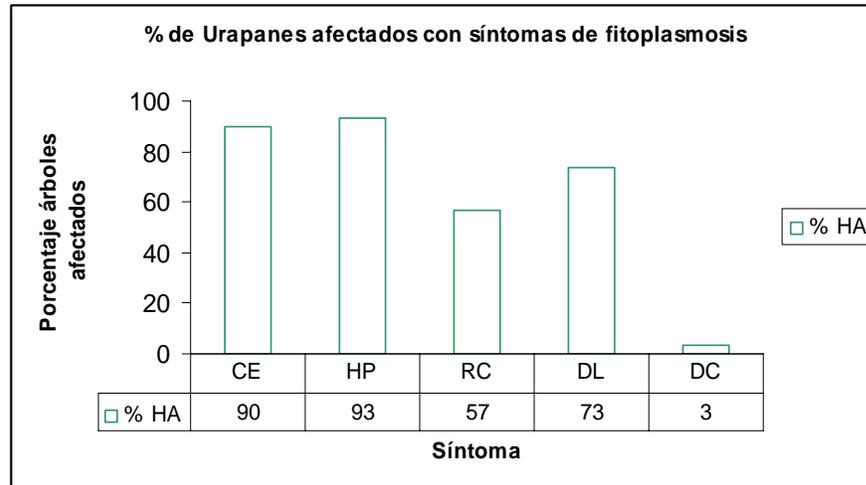


Figura 7: Gráfica de porcentaje de Urapanes afectados con síntomas asociados a fitoplasmas. Datos provenientes de 30 árboles observados para cada síntoma. CE: Crecimiento epicórnico. HP: Hojas pequeñas. RC: Ramas en copo. DL: Delicuescencia. DC: Descortezamiento. MA: Muerte apical.

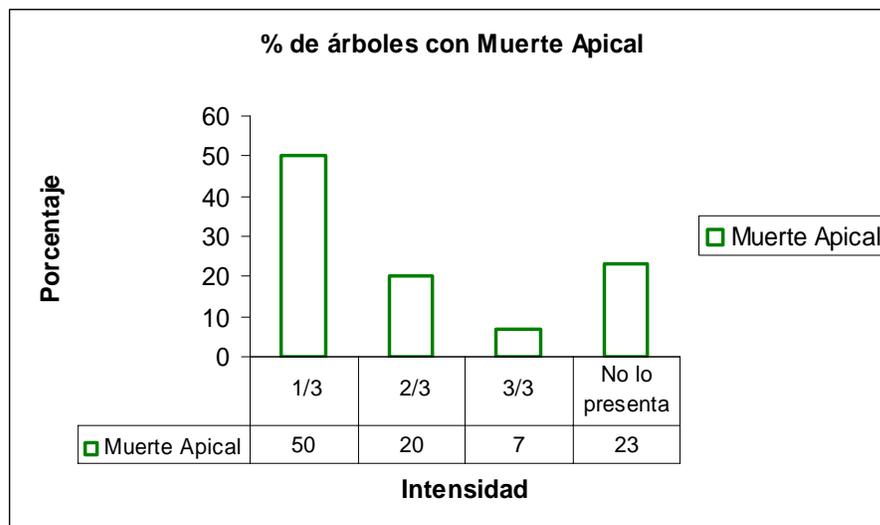


Figura 8: Gráfica de porcentaje de Urapanes que presentaron el síntoma de muerte apical. Número de árboles evaluados: 30.

La Figura 8, muestra que la mayoría de árboles presentaron el síntoma de muerte apical (77%), siendo 1/3 la intensidad mas comúnmente encontrada (50%). A nivel general, éste síntoma comparado con la incidencia de los otros síntomas relacionados con fitoplasmosis no mostró tener una incidencia mayor respecto a los otros síntomas evaluados (aproximadamente el 15%).

Las siguientes figuras (Figura 9 a la 12) muestran fotografías tomadas a los árboles estudiados donde se observan ejemplos de la sintomatología presentada por éstos.



Figura 9: Fotografía de Urapán (Árbol No 2). Nótese en este árbol la muerte apical señala con los círculos rojos.



Figura 10: Fotografía de Urapán (Árbol No 11). Nótese en este árbol el crecimiento epicórnico que se manifiesta en brotes de ramas en posiciones anormales en el árbol. Recuadro rojo.



Figura 11: Fotografía de Urapán (Árbol No 13). Nótese en este árbol las ramas en copo (Círculos rojos) en la parte apical y la muerte apical del mismo.



Figura 12: Fotografía de Urapán (Árbol No 14). Síntoma de amarillamiento.

Finalmente, cabe resaltar que a pesar del análisis sintomatológico realizado en estos árboles, no se tomaron muestras vegetales de éstos para el análisis histológico realizado, pues esta parte del trabajo se realizó primordialmente con el

fin de comprender la manifestación de la enfermedad en una muestra dada de árboles de Urapán y correlacionarla con la que se desarrolla *C. roseus*.

3.1.2 Síntomas de fitoplasmosis observados en *Catharanthus roseus*

La tabla 4 contiene los resultados que se obtuvieron del análisis realizado a las 9 plantas sintomáticas del laboratorio de Biotecnología.

La figura 13 por su parte, muestra el porcentaje de la presencia de cada uno de los síntomas observados, en donde se puede resaltar que para las plantas evaluadas los síntomas más frecuentes son: hojas pequeñas, rebrotes, acortamiento de entrenudos y pérdida de dominancia apical; en menor porcentaje la virescencia, amarillamientos y flores pequeñas y no se observó en ninguna planta filodia.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis sintomatológico realizado a *C. roseus*.

SINTOMAS PRESENTES EN VINCA ASOCIADOS A FITOPLASMAS											
Planta No	No Lab	HP	F	V	R	AE	PA	A	FP	HD	D
1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
2	Dic 5/04	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
3	Jul 14/04	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
4	4	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
5	30	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
6	29	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
7	17	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
8	22	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
9	16	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
10	CONTROL NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

El número 1 indica la presencia del síntoma, el 0 indica la ausencia del síntoma. Debido a que las plantas tenían una numeración arbitraria como lo indica la segunda columna se les otorgó una numeración ascendente para facilidad de reconocimiento. HP: Hojas pequeñas. F: Filodia. V: Virescencia. R: Rebrotos. AE: Acortamiento entre nudos PA: Pérdida dominancia apical. A: Amarillamiento. FP: Flores pequeñas. HD: Hojas. Deformes. D: Decaimiento.

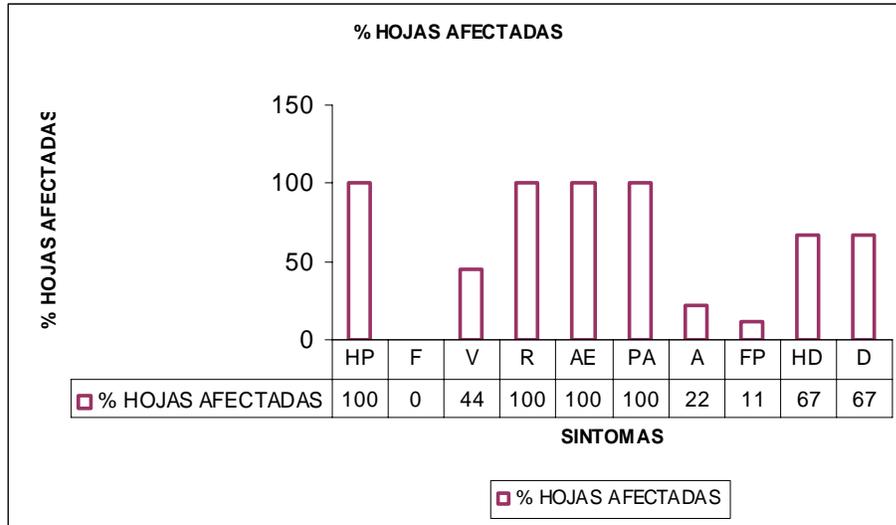


Figura 13. Gráfica de porcentaje de los síntomas presentes en *Catharanthus roseus*. HP: Hojas pequeñas. F: Filodia. V: Virescencia. R: Rebrotos. AE: Acortamiento entrenudos. PA: Pérdida de dominancia apical. A: Amarillamiento. FP: Flores pequeñas. HD: Hojas deformes. D: Decaimiento

3.2 IDENTIFICACION DEL TEJIDO OBJETIVO MEDIANTE TEST DAPI

Las observaciones histológicas realizadas al tejido floemático de *C. roseus* no expuesto a fitoplasmas (control negativo, Planta 10) permitieron observar las estructuras características de este tejido. Se logró identificar y observar estructuras características del floema como: tubos cribosos, células acompañantes, parénquima y lamina cribosa, además se observaron estructuras celulares del xilema como las traqueidas (Ver figura 14).

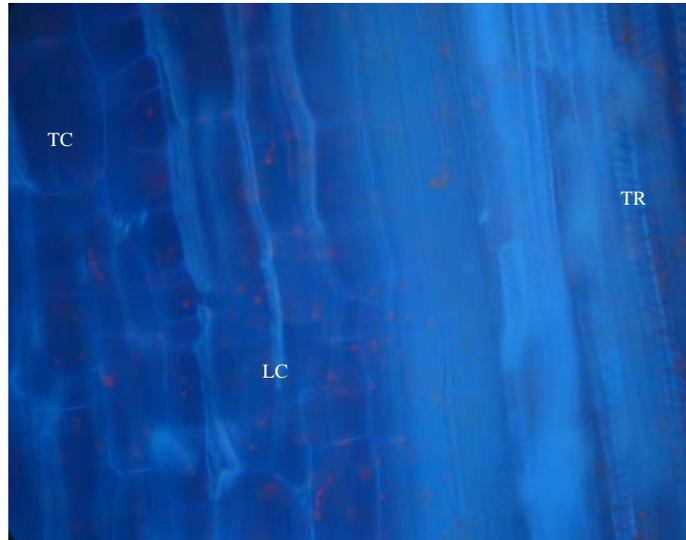


Figura 14. Micrografía de corte longitudinal de nervadura central tratada con el reactivo DAPI. Tejido control; DAPI negativo, Planta control. Nótese las estructuras celulares características del tejido objetivo y la ausencia de cuerpos fitoplasmáticos presentes en los tubos cribosos TC. Tubo criboso del floema. LC Lamina cribosa. TR Traqueidas. Magnificación 2040X.

Las figuras que se presentan a continuación (Figuras 15 a la 18) muestran las características de un tejido DAPI positivo en cortes de nervadura central y pecíolo de diferentes plantas sintomáticas de *C. roseus* obtenidas en el laboratorio.

Por otra parte, el tejido DAPI positivo se caracterizó por la presencia de cuerpos morfológicamente alargados y fluorescentes en los tubos cribosos del floema. Además, se observó en el tejido la presencia de cuerpos circulares, los cuales se identificaron inicialmente como posibles bacterias, se excluyó que fueran núcleos celulares cuando se encontraban ubicados en los tubos cribosos, pues éste es un tejido anucleado; por el contrario, cuando se encontraron células circulares en las células acompañantes sí se determinaron como núcleos celulares (Ver figura 15 y 16).

Para ésta prueba no se tomaron medidas de las células consideradas como posibles cuerpos fitoplasmáticos, debido a la inespecificidad de la prueba.

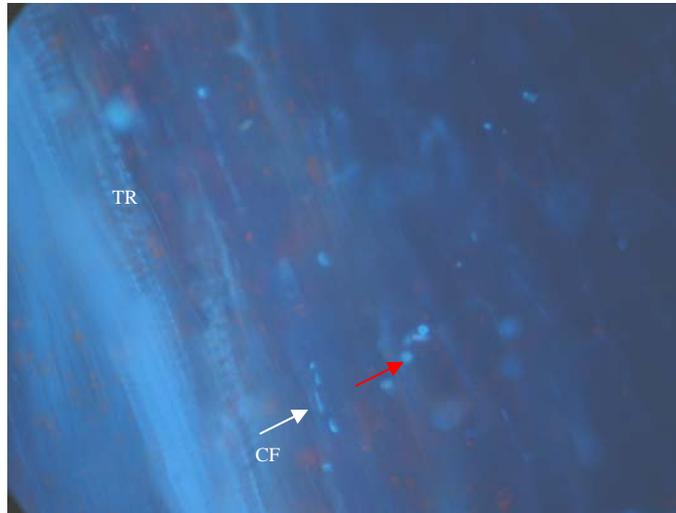


Figura 15. Micrografía de corte longitudinal de *C. roseus* de nervadura central tratada con el reactivo DAPI, Planta 22. DAPI positivo nótese la presencia de cuerpos fitoplasmáticos (CF, Flecha blanca), alargados fluorescentes que se ubican en los tubos cribosos. Flecha roja cuerpos circulares más fluorescentes, posiblemente otras bacterias. TR Traqueidas. Magnificación 2040X.

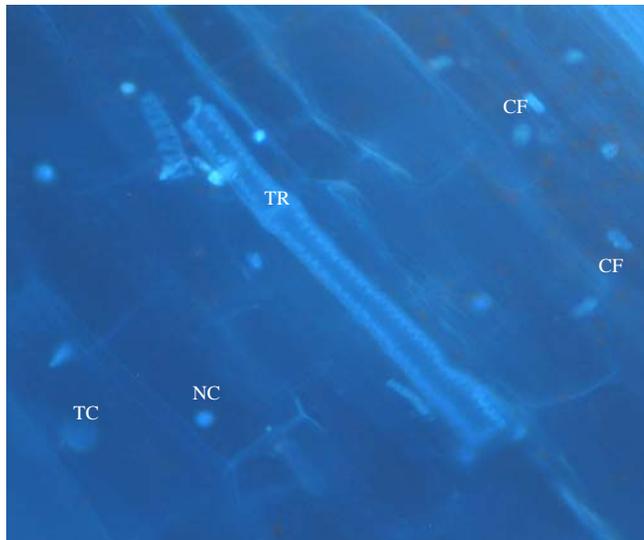


Figura 16. Micrografía de corte longitudinal de *C. roseus* de peciolo tratado con el reactivo DAPI, Planta 16. Nótese la presencia de cuerpos fitoplasmáticos (CF) alargados fluorescentes que se ubican en los tubos cribosos. TC: Tubo criboso. TR Traqueidas. NC: Núcleo celular. Magnificación 2600X.

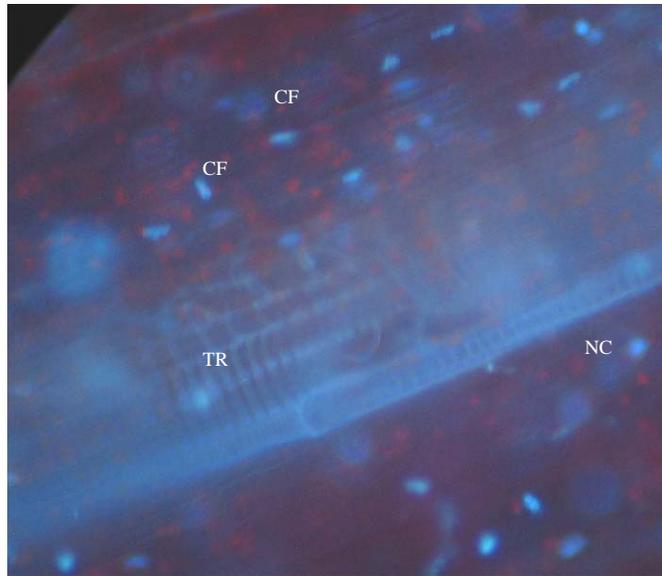


Figura 17. Micrografía de corte longitudinal de *C. roseus* de peciolo tratado con el reactivo DAPI, Planta 16 Obsérvese en la micrografía presencia de cuerpos fitoplasmáticos (CF) alargados fluorescentes que se ubican en los tubos cribosos. TR Traqueidas. NC Núcleo celular. Las manchas rojas observadas en la micrografía son degradación de clorofila producida en el tiempo del tratamiento del tejido con el reactivo DAPI. Magnificación 2600X.

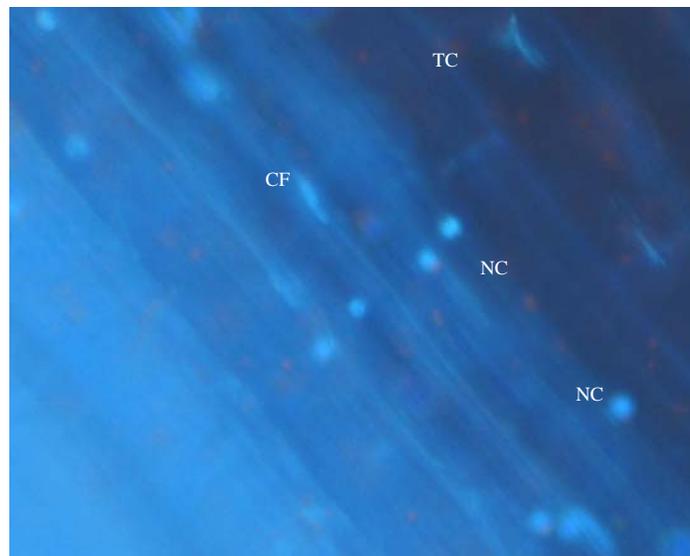


Figura 18. Micrografía de corte longitudinal de *C. roseus* de peciolo tratado con el reactivo DAPI, Planta 22. Nótese la presencia de cuerpos fitoplasmáticos (CF,) alargados fluorescentes que se ubican en los tubos cribosos. TC Tubo criboso. NC Núcleo celular. Magnificación 2600X.

Cómo se mencionó en la metodología, se registraron los resultados obtenidos para el test DAPI con el fin de llevar un control de cada corte y así mismo determinar qué plantas serían las adecuadas para el tratamiento histológico para procesamiento por microscopía electrónica de transmisión y barrido.

La Tabla 5 muestra los resultados de DAPI obtenidos de los 80 cortes realizados en las diferentes plantas sintomáticas de *C. roseus*. Los resultados permiten ver que del total de cortes realizados, en el 28% de éstos no se pudo determinar la ausencia o presencia de fitoplasmas en el corte debido al grosor y calidad del mismo; el 45% de cortes obtenidos se encontraron DAPI negativos y el 25% se encontraron DAPI positivos.

Tabla 5. Resultados obtenidos por test DAPI realizado a peciolo y nervadura central de *C. roseus*. Primera columna registra el número de planta y el número de hoja tomada de la misma. Segunda y tercera columna corresponden a la parte del tejido tomado para los cortes evaluados con el reactivo DAPI (se marcó una X). Últimas columnas (8, resultado por corte), indican el resultado obtenido del test (+) positivo, (-) Negativo ò (0) no se pudo determinar. No todas las casillas aparecen llenas pues no en todos los segmentos se logró obtener 8 cortes. Los espacios en blanco corresponden a cortes no efectuados.

PLANTA	PARTE DE LA HOJA		RESULTADO POR CORTE							
	Nervadura	Peciolo	1	2	3	4	5	6	7	8
H1/22	X		0	0	0	0	0			
H2/22	X		-	-	-	-	-	-		
H3/22		X	-	0	0	-	-			
H1/16		X	-	-	-	-	-		+	
H2/16	X	X	-	-	-	-	-			
H2/16	X		+	+	0	0	-	+	+	0
H3/16		X	0	+	+	0	0	+		
H1/1		X	0	0	0	0	0	0	0	
H1/17		X	+	+	+	+	+	+	+	+
H2/17			+	+	0	+	0	0	+	+
CONTROL	X		-	-	-	-	-	-	-	-
CONTROL		X	-	-	-	-	-	-	-	-

3.3 DETECCION MEDIANTE MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION

3.3.1 Tinción con azul de toluidina

Este procedimiento permitió la observación de cuerpos fitoplasmáticos y de bacterias en el tejido objetivo, coincidiendo con las observaciones realizadas en tejido tratado con DAPI.

Estas observaciones indicaron que las plantas contenían mas de un tipo de microorganismo, posibles bacterias endófitas, y no únicamente fitoplasmas como se considero inicialmente por la evaluación sintomatológica realizada a *C. roseus*.

Las micrografías que se muestran a continuación (Figuras 19 a la 23) son ejemplos de cortes longitudinales obtenidos a partir de floema de *C. roseus* infectados con fitoplasmas y bacterias endófitas teñidos con azul de toluidina. En estas diferentes micrografías se observa la distribución de los fitoplasmas en los vasos del floema, la cual es irregular pues se observaron vasos vacíos, mientras que vasos adyacentes están infectados con fitoplasmas. Así mismo la cantidad de los fitoplasmas no es homogénea dentro de los vasos.

Es importante aclarar, que la diferenciación que se realizó entre bacterias y fitoplasmas se basó principalmente en la densidad observada en cada uno de los microorganismos, los fitoplasmas se observaron como cuerpos menos densos respecto a las bacterias que se observaron cuerpos densos (círculos azules).

Además, se pudieron observar las diferentes formas que presentaron los cuerpos fitoplasmáticos, resaltándose principalmente formas circulares, ovaladas y formas completamente amorfas consideradas como cuerpos pleomórficos.

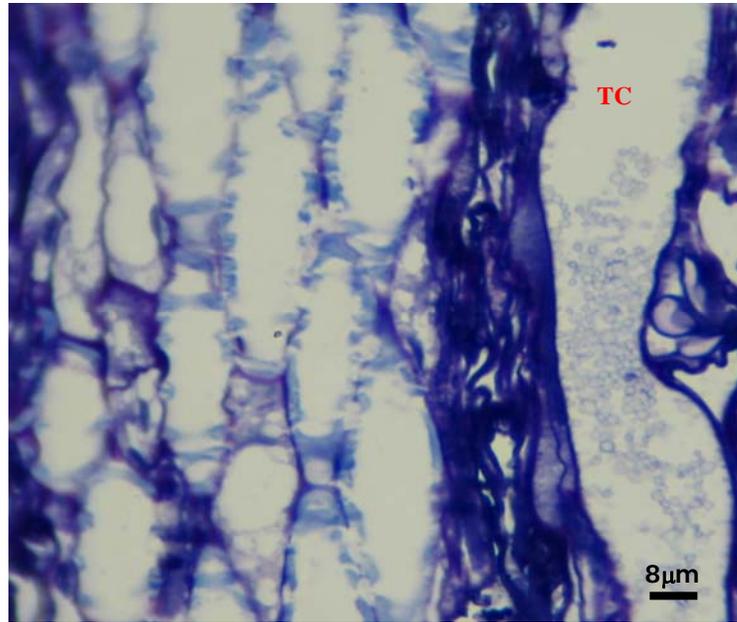


Figura 19. Corte longitudinal de nervadura central de *C. roseus*, teñido con azul de toluidina, Planta 16. Nótese en el tubo criboso (TC), cuerpos fitoplasmáticos. Véase la diferencia en formas, tamaño de los fitoplasmas y su distribución a lo largo del tubo. Magnificación 2600X.

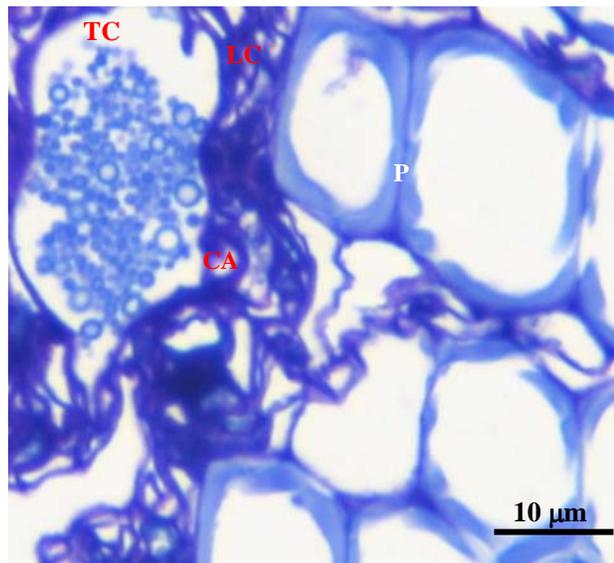


Figura 20. Corte longitudinal de peciolo de *C. roseus*, teñido con azul de toluidina, Planta 16. Obsérvese los cuerpos fitoplasmáticos ubicados dentro del tubo criboso (TC). Véase la diferenciación de las formas y tamaño de los fitoplasmas y su distribución a lo largo del tubo. LC Lámina Cribosa. CA Célula acompañante. P. Parénquima. Magnificación 3240X.

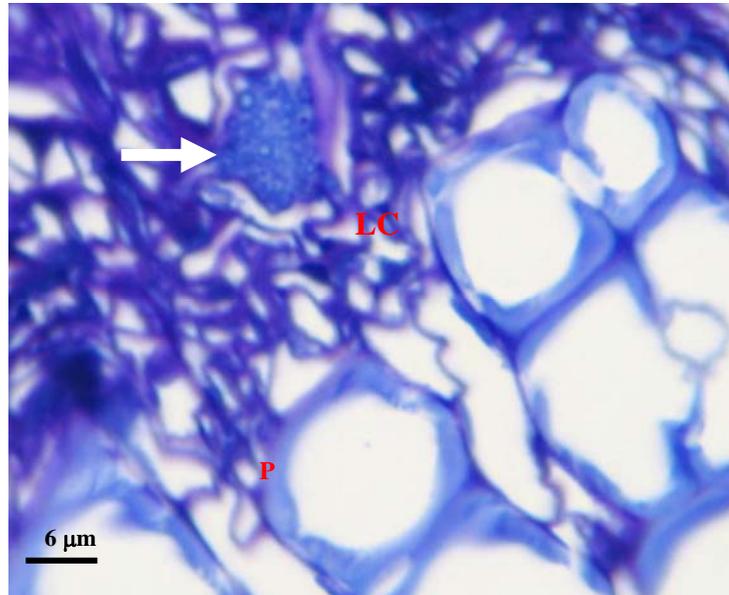


Figura 21. Corte longitudinal de peciolo de *C. roseus*, teñido con azul de toluidina, Planta 16. Flecha blanca señala los cuerpos fitoplasmáticos ubicados dentro de un tubo criboso del floema. En la que se resalta una agrupación de éstos. LC Lámina Cribosa. P Parénquima Magnificación 2600X.

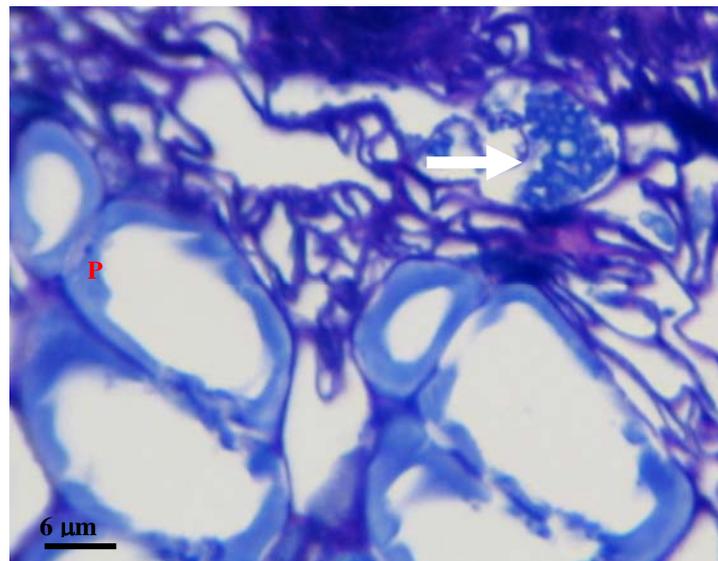


Figura 22. Corte longitudinal de nervadura central de *C. roseus*, teñido con azul de toluidina, Planta 17. La flecha blanca señala los cuerpos fitoplasmáticos ubicados dentro de un tubo criboso del floema. TC Tubo criboso. P Parénquima. Magnificación 2600X.

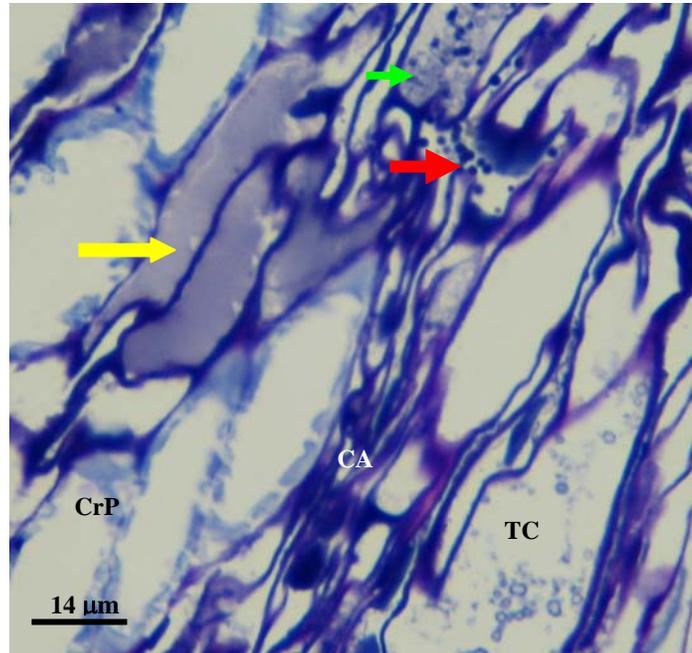


Figura 23. Corte longitudinal de nervadura central de *C. roseus*, teñido con azul de toluidina. Planta 17. Obsérvense fitoplasmas dentro del tubo criboso (TC), nótese la distribución, tamaño y formas de éstos. Flecha roja: bacterias asociadas a los fitoplasmas dentro del tubo criboso. Flecha verde muestra dicha asociación. Flecha amarilla: posibles exudados producidos por la planta como mecanismo de defensa por la presencia de fitoplasmas y bacterias. TC Tubo criboso. CrP Crenaciones de la pared. CA Célula acompañante: Magnificación 2040X

3.3.2 Análisis morfométrico

El análisis de las micrográficas de microscopía óptica de alta resolución permitió establecer que para los fitoplasmas presentes en *C. roseus* presentaron características morfológicas de pleomorfismo, así como de tipo simétrico como circular y ovalada. Lo anterior permitió entonces determinar los tres tipos de formas predominantes encontrados en fitoplasmas provenientes de tejido floemático de *C. roseus* los cuales se mencionan a continuación:

- Circular: las tres medidas tomadas (diámetro mayor, diámetro menor y transversal) son iguales.
- Ovalado: con base a las tres medidas tomadas el diámetro mayor y la transversal son iguales.

- Pleomórfico debido a la discontinuidad de su forma sus tres dimensiones son diferentes.

Las tablas 6 y 7 registran los resultados del promedio del diámetro obtenido para fitoplasmas (la medida reportada corresponde al valor promedio de las tres mediciones originales Anexo 1) y para bacterias que para las cuales sólo se tomó una medida debido a su forma circular.

Las medidas del diámetro tomadas a los dos tipos de microorganismos encontrados coinciden con el reportado por Mussetti y Favali (2004), Esta tabla también muestra que hay medidas fuera del rango lo cual sugiere que posiblemente existen fitoplasmas que debido a su carácter pleomórfico presentan dimensiones mayores a las que se encuentran actualmente reportadas en la bibliografía.

Tabla 6. Medidas de diámetro promedio registrados en cuerpos fitoplasmáticos. Ensayos de tinción con azul de toluidina. Medidas registran el valor promedio obtenido de las tres mediciones realizadas en el plano de corte a diferentes cuerpos fitoplasmáticos. Valores aparecen en orden ascendente. Valores repetidos se omitieron en esta tabla pero se tuvieron en cuenta para el promedio. Promedio del diámetro total para fitoplasmas 1.320 μm

DIAMETRO PROMEDIO (μm)	
0,733	1,367
0,80	1,400
0,80	1,433
0,867	1,633
0,867	1,633
0,90	1,667
0,90	1,667
0,90	2,00
0,933	2,00
0,967	2,333
1,00	2,333
1,033	2,667
1,067	3,00
1,10	3,00
1,10	3,333
1,333	3,667
1,367	
Rango 0.733 - 3.667 μm	

Tabla 7. Medidas de diámetro en bacterias. Ensayo de tinción con azul de toluidina. Medidas registran el valor promedio obtenido para cada microorganismo en el plano de corte. Valores aparecen en orden ascendente. Valores repetidos se omitieron en esta tabla (se tuvieron en cuenta en el promedio). Promedio diámetro 1.25 μm .

DIAMETRO PROMEDIO (μm)	
0,80	1,40
0,85	1,45
0,90	1,50
0,95	1,80
1,00	1,85
1,10	1,90
1,20	2,00
1,25	2,00
1,30	2,80
	2,50
Rango 0,80 - 2,50 μm	

La tabla 8 por su parte, registra el número total de formas evaluadas de fitoplasmas en las que se puede concluir que la forma predominante es la circular, y en menor cantidad la pleomórfica.

Tabla 8. Conteo de las diferentes formas encontradas para los cuerpos fitoplasmáticos en los ensayos de azul de toluidina. El total registra el número total de cuerpos evaluados.

NÚMERO DE MORFOTIPOS	
CIRCULAR	75
OVALADO	60
PLEOMORFICO	44
TOTAL	239

La tabla 9 muestra los datos del conteo que se realizó de bacterias y fitoplasmas por tubo criboso; este conteo permitió calcular la abundancia como se muestra en la tabla 12.

Tabla 9. Conteo de fitoplasmas y bacterias por tubo criboso. Primera columna número de corte evaluado. Segunda columna número de bacterias por tubo criboso. Tercera columna número de fitoplasmas por tubo criboso. Número total de cortes examinados 30. Los espacios en blanco se deben a la ausencia del microorganismo en el corte observado.

CORTE	BACTERIAS	FITOPLASMAS
1	3	
2	2	
3	3	
4	2	
5	6	
6	7	8
7	2	9
8	4	
9	4	
10	4	
11	6	
12	18	10
13	9	46
14	18	6
15	11	16
16	35	19
17	5	14
18	4	4
19	4	2
20		18
21	3	39
22	2	27
23	2	34
24	2	31
25		39
26	45	136
27	47	134
28	82	72
29	90	153
30	2	32
TOTAL	422	849

La tabla 9 del conteo de fitoplasmas y bacterias muestra que el tejido objetivo se encontraba principalmente infectado por fitoplasmas, éstos datos a su vez, permitieron concluir que los fitoplasmas se encuentran en número dos veces más que las bacterias por lo tanto su abundancia por tubo criboso es mayor como lo indica la tabla 10.

Adicionalmente, los conteos realizados a los fitoplasmas permitieron establecer que su distribución no es homogénea, hay lugares de los tubos cribosos, donde se

observan mayores agrupaciones del fitoplasmas y así mismo hay lugares donde su número es menor o nulo.

Tabla 10. Abundancia de fitoplasmas y bacterias por tubo criboso. El cálculo de la abundancia se determinó con base al promedio de cuerpos encontrados por corte; el corte representa el tubo criboso.

ABUNDANCIA (Número promedio de fitoplasmas o bacterias por tubo cribosos)	
BACTERIAS	FITOPLASMAS
14.066	28.30

3.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA

3.4.1 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Las micrografías electrónicas que se presentan a continuación (figuras 24 a la 29) permiten ver en detalle características morfológicas y anatómicas de los fitoplasmas; tales como la organización del ADN en el interior de éstas células y el grosor de la membrana, en la cual no se logró observar la condición triple de la membrana reportada para fitoplasmas por Lee y colaboradores en 1998 y 2000 y sólo se observó una condición doble de la misma.

En las micrografías de mayor aumento (magnificaciones mayores a 20000X), se realizaron mediciones de la membrana para compararla con la reportada por Chapman y colaboradores en el 2001, que reportan que el grosor de membrana promedio de 8 nm (una sola capa).

En estos ensayos, también se logró diferenciar claramente las bacterias (Microscopía óptica de alta resolución) de los fitoplasmas, pues las micrografías permiten ver diferencias morfológicas y anatómicas de éstos dos microorganismos

y que a su vez confirman la “doble infección” que presenta en tejido floemático de *C. roseus*.

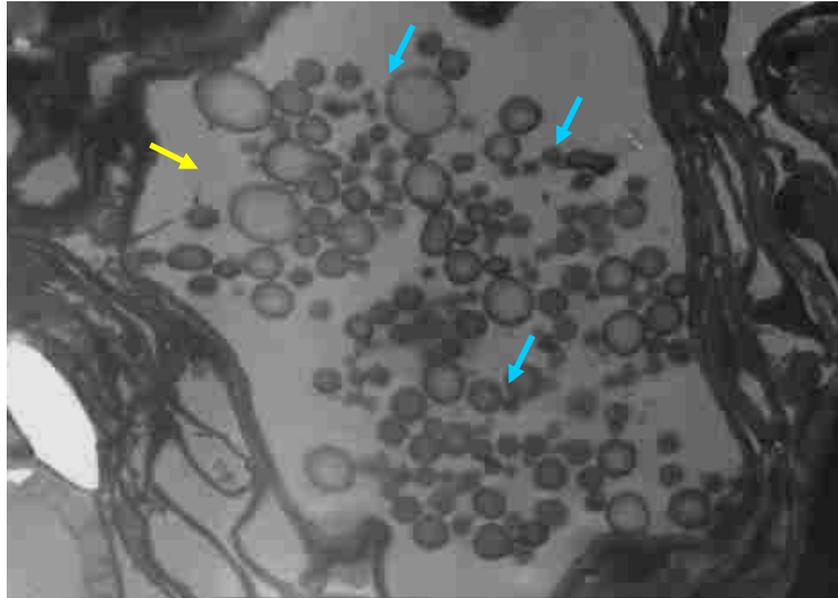


Figura 24. Micrografía electrónica de floema de *C. roseus*. Nótese el tubo criboso (Flecha amarilla), infectado con fitoplasmas (flechas azules), que presentan diferentes formas y tamaños. Magnificación 3500X

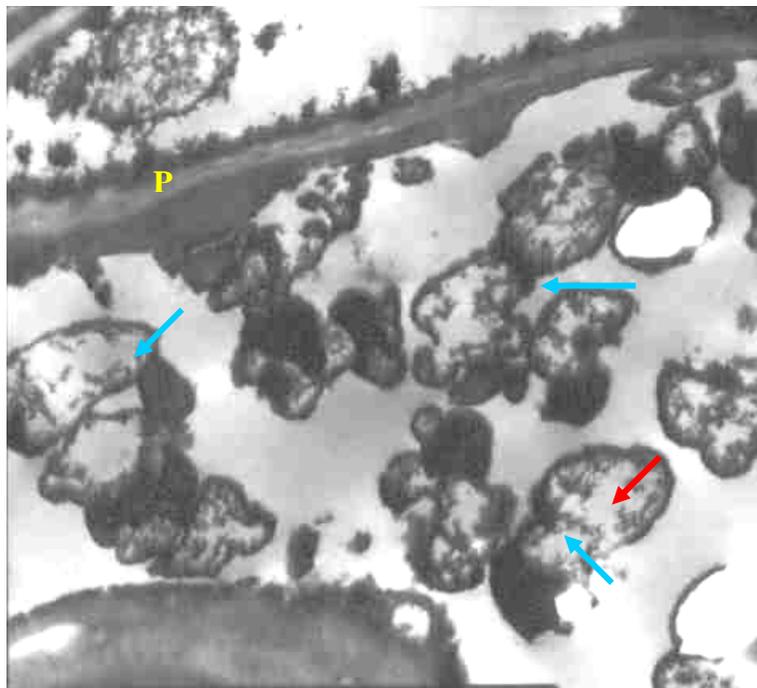


Figura 25. Micrografía electrónica de floema de *C. roseus*. Nótese la diversidad de formas en los fitoplasmas (flechas azules). Flecha Roja señala la molécula de ADN del fitoplasma. P. Pared del tubo criboso. Magnificación 5000X

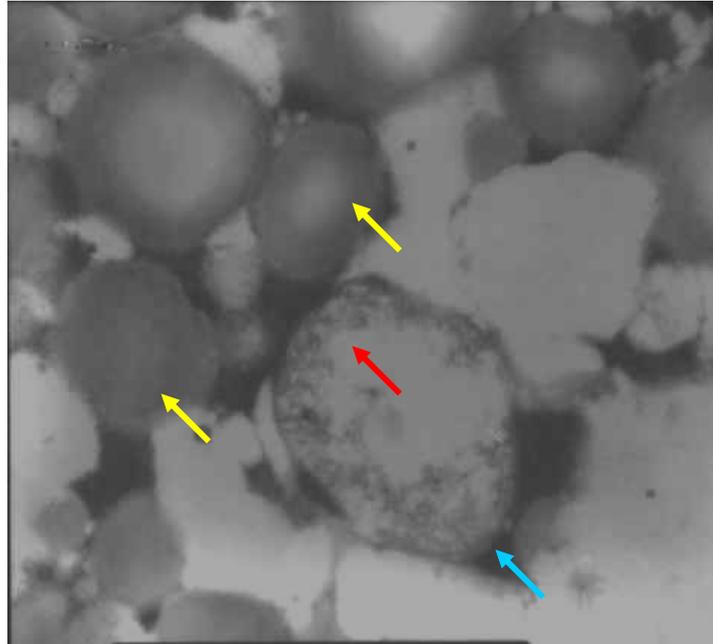


Figura 26. Micrografía electrónica de floema de *C .roseus*. Nótese la presencia de fitoplasmas (flecha azul), asociados bacterias endófitas (Flechas amarillas), en el tejido floemático. Flecha roja ADN del fitoplasma. Magnificación 25000X

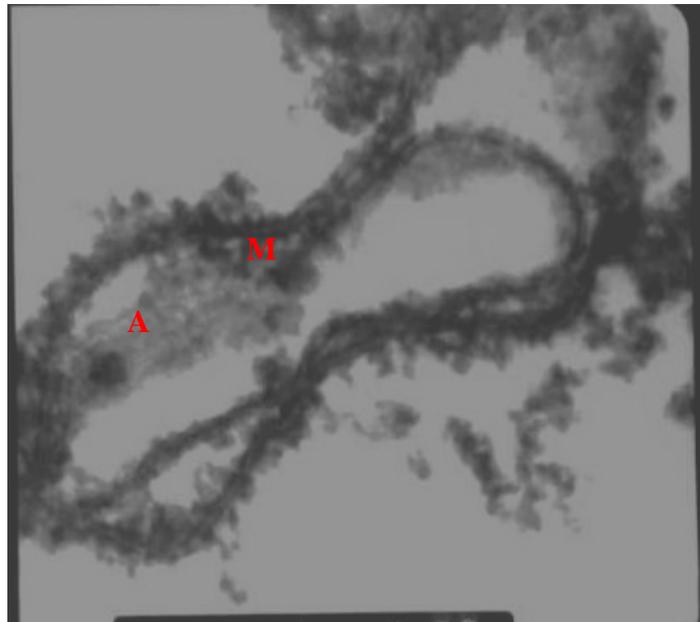


Figura 27. Micrografía electrónica de floema de *C .roseus*. Detalle de la morfología del fitoplasma. M. membrana plasmática, nótese la asimetría de esta estructura y la variación del grosor de la misma;, indicando una posible membrana trilaminar. Grosor promedio de membrana 8.14 nm. A: Molécula de ADN. Magnificación 70000X.

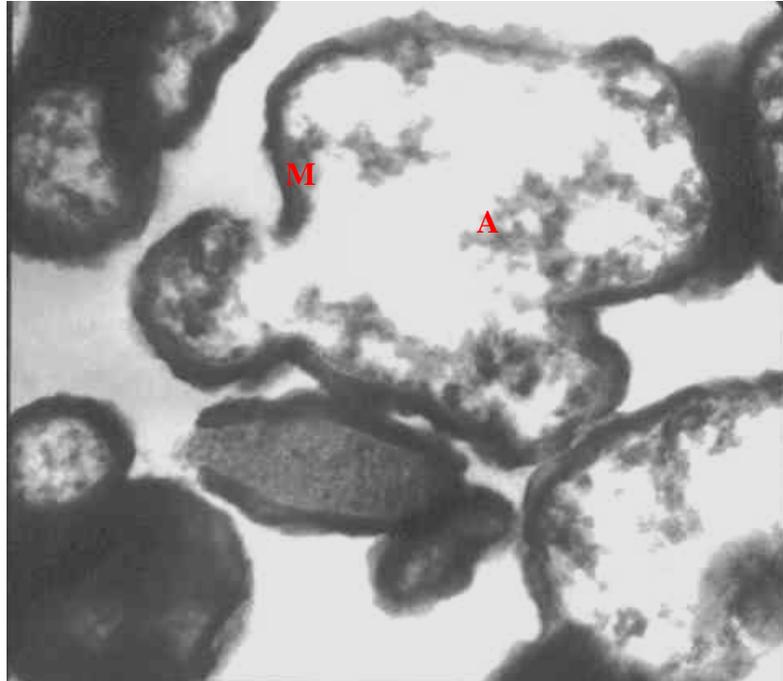


Figura 28. Micrografía electrónica de floema de *C .roseus*. Detalle de la morfología del fitoplasma. M. membrana plasmática, nótese la asimetría de esta estructura; Grosor promedio de membrana 5.83 nm. A Molécula de ADN. Magnificación 60000X

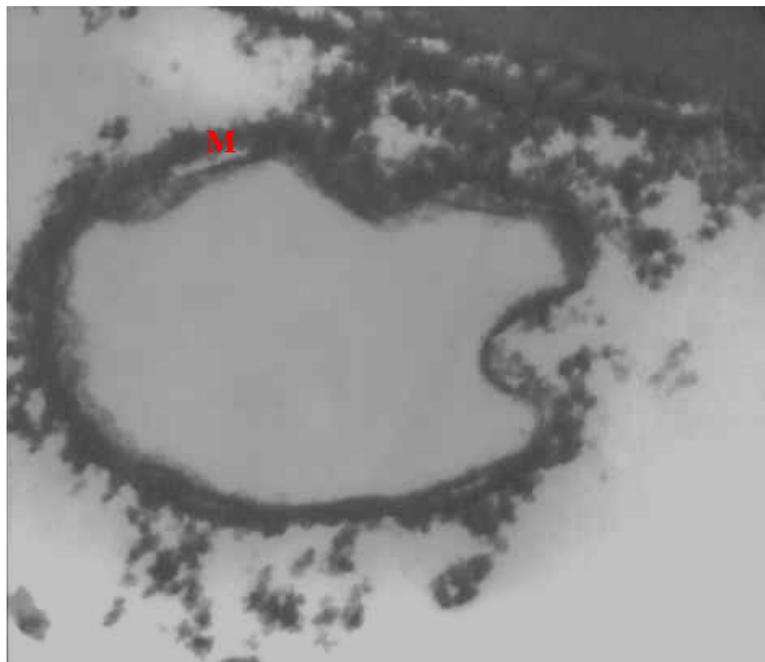


Figura 29. Micrografía electrónica de floema de *C .roseus*. Detalle de la morfología del fitoplasma. M. membrana plasmática, nótese la asimetría de esta estructura y la variación del grosor de la misma; indicando una posible membrana trilaminar Grosor promedio de membrana 6.21 nm. Magnificación 45000X

Debido a que no se logró observar la membrana trilaminar, pero en algunas micrografías se alcanzó a detallar una condición doble de la misma se considero que las limitaciones presentadas en este trabajo para observar ésta estructura se presentaron principalmente por el plano de corte como lo sugieren Waters y Hunt, en 1980.

Las mediciones realizadas a la membrana muestran que el rango del tamaño promedio esperado para los fitoplasmas es muy reducido lo que se atribuye a las características asimétricas de la membrana. (Ver Tabla 11)

Tabla 11 Mediciones de grosor de membrana de los fitoplasmas. Técnica Microscopía Electrónica de Transmisión. Medidas reportadas en nm. Promedio 6.84 nm.

GROSOR (nm) MEMBRANA	
7,11	5,4
6,22	6,20
6,67	6,20
6,89	4,60
7,50	4,60
8,50	6,40
6,50	8,60
6,50	5,83
8,00	5,00
8,00	6,67
8,50	6,17
5,50	8,14
7,50	8,86
8,50	8,71
5,60	7,57
5,6	
Rango 4,60 nm - 8,86 nm	

La Tabla 12, registra las medidas de diámetro promedio realizadas a los fitoplasmas observados en el tejido del floema. Las medidas se realizaron con la misma metodología que las mediciones para microscopía de alta resolución.

Tabla 12 Mediciones de diámetro de los fitoplasmas. Técnica microscopía electrónica de transmisión. Los valores repetidos se omitieron en esta tabla pero fueron tomados en cuenta para el cálculo del promedio. Medidas reportadas en μm . Promedio diámetro fitoplasmas 0.974 μm

DIAMETRO (μm)	
0,300	1,000
0,433	1,033
0,476	1,048
0,500	1,067
0,600	1,095
0,633	1,143
0,667	1,200
0,683	1,233
0,700	1,238
0,714	1,286
0,74	1,300
0,762	1,333
0,767	1,467
0,800	1,500
0,810	1,567
0,833	1,81
0,867	1,902
0,933	2,000
0,952	
Rango 0,300 - 2,000 μm	

Finalmente, se compararon los resultados de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión, por lo tanto, se consideró importante realizar en las micrografías electrónicas un nuevo conteo de las formas predominantes, dicha comparación permitió encontrar similitud en los datos obtenidos entre las formas circulares y pleomórficas, en la forma ovalada no se encontró dicha similitud numérica lo que se presentó probablemente a errores en el conteo.

Tabla 13 Conteo a las diferentes formas establecidas para fitoplasmas en microscopía electrónica de transmisión. Total de cuerpos evaluados 102.

NUMERO TIPO DE FORMAS	
CIRCULAR	45
OVALADO	26
PLEOMORFICO	31
TOTAL	102

Estas comparaciones entre las dos técnicas de microscopía, permitieron establecer la tendencia del diámetro para los fitoplasmas el cual oscila principalmente 0.6 μm y 1.5 μm (ver grafico 30), el tamaño promedio obtenido por medio de estas dos técnicas fue de 1.147 μm el cuales concuerdan con el reportado en la bibliografía (Mussetti y Favali, 2004).

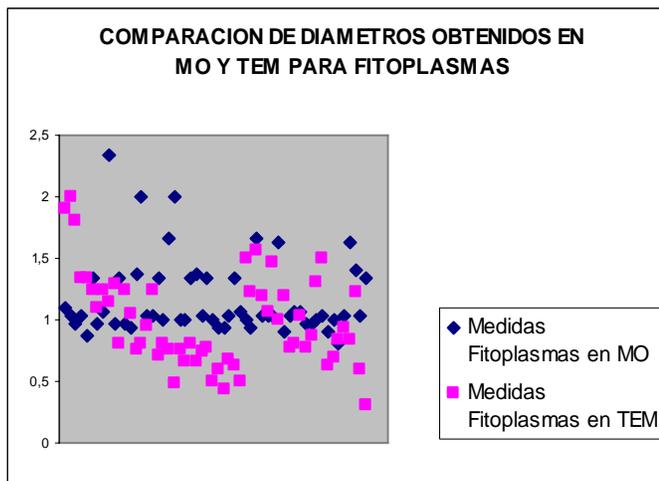


Figura 30. Grafico comparativo de diámetros obtenidos. MO (Microscopía óptica del alta resolución, rombos azules) y TEM (Microscopía electrónica de transmisión, cuadrados fucsia).

Las siguientes gráficas (Figura 31 y 32), contrastan lo observado por microscopía óptica y electrónica de transmisión, ya que debido a la diferencia de magnificación que se obtienen con las dos técnicas se consideró importante comparar los números de formas obtenidas.

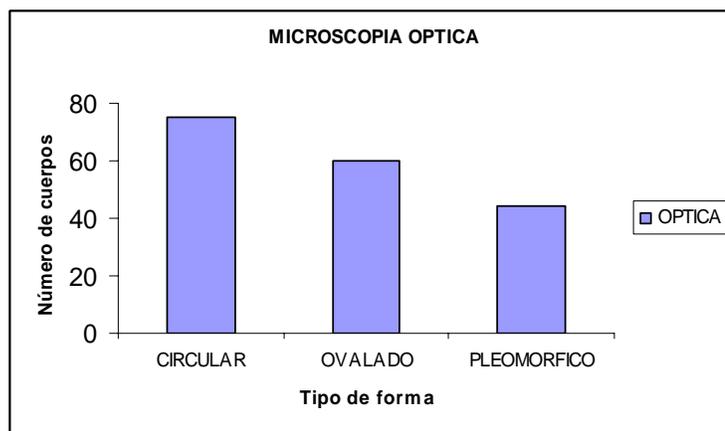


Figura 31. Cuento de formas obtenidas en los análisis de microscopía óptica de alta resolución.

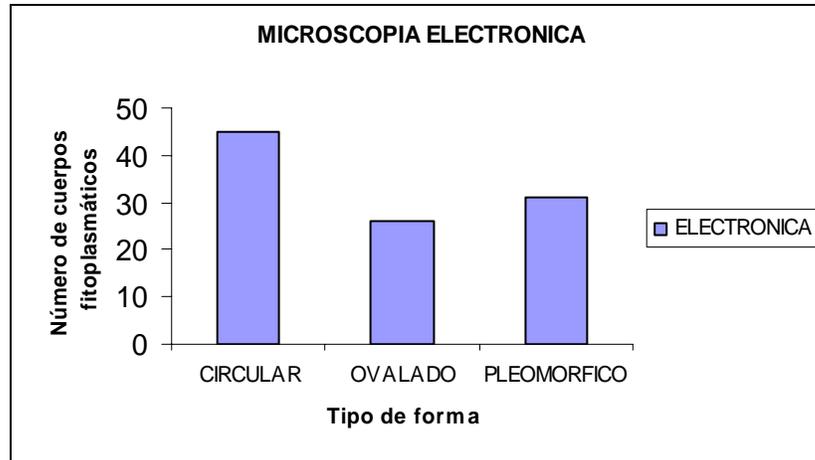


Figura 32. Cuento de formas obtenidas en los análisis de microscopía electrónica de transmisión.

Adicionalmente, se realizó una comparación de las micrografías electrónicas obtenidas en éste trabajo con el trabajo realizado por Rodríguez en el 2004 (ensayos realizados en tejido floemático de Urapán), lo que permitió concluir que lo observado en este trabajo corresponde con mayor precisión a la descripción y a las características microscópicas de fitoplasmas, mientras que el trabajo de Orostegui encontró y describió principalmente bacterias del tejido analizado y no fitoplasmas como lo sugirió el autor.

3.4.2 TINCIÓN NEGATIVA

El contraste realizado con AFT en extractos de tejido de Urapán permitió observar microorganismos con características de forma similares (principalmente pleomórficas) a las observadas en la técnica de microscopía electrónica de transmisión realizada en tejido de *C. roseus*, pero con un tamaño menor. Lo anterior, se puede apreciar en la tabla 14 donde su rango de tamaño es reducido respecto al encontrado en tejido de *C. roseus* pues las medidas aquí reportadas están en escala nanométrica y no micrométrica como las mediciones anteriores, mostrando una diferencia de tamaño entre los dos tejidos floemáticos evaluados.

Por lo tanto, esta diferencia en el rango de tamaño probablemente demuestra la diversidad de tamaño que presentan los fitoplasmas, la cual concuerda con la reportada por Ammar y colaboradores en el 2004 quien da un rango de tamaño para estos microorganismos que va desde los 20 nm hasta los 500 nm.

Tabla 14. Diámetro promedio de fitoplasmas obtenidos en tinción negativa. Obtenidos con la técnica de tinción negativa (TN) de tejido floemático de Urapán. Medidas en nm.

Diámetro Promedio en TN	
57.22	0,081
66.12	0,091
67.45	104.02
67.24	114.00
68.52	116
69	124.37
71.51	133.42
76	157
78.20	159.89
79.07	162.45
Rango 57.22 – 162.45 nm	

Hay poca información sobre la aplicación de la tinción negativa como herramienta en el diagnóstico de fitoplasmas en el floema, por lo tanto se tomó como patrón de comparación los resultados obtenidos por Poghosyan y Lebsky en el 2004 que trabajaron tejido floemático de Solanáceas infectadas con fitoplasmas. La contrastación de resultados permitió encontrar similitud en cuanto a forma y tamaño.

Las siguientes micrografías (figuras 33 a la 36), permiten detallar cuerpos fitoplasmáticos mas pequeños que los encontrados en tejido floemático de *C. roseus* con diversidad de formas.

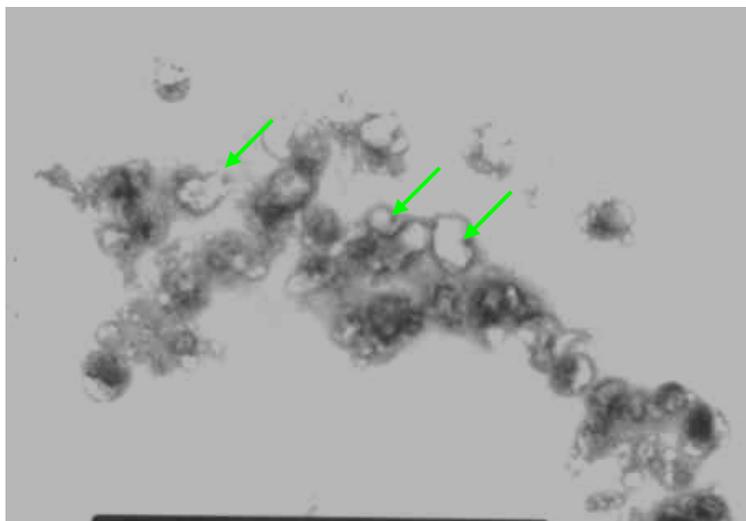


Figura 33. Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas de extracto de floema de Urapán. Las flechas señalan diferentes cuerpos fitoplasmáticos. Las manchas oscuras (densas) observadas en la micrografía se deben a posible precipitación del colorante. Magnificación 70000X.

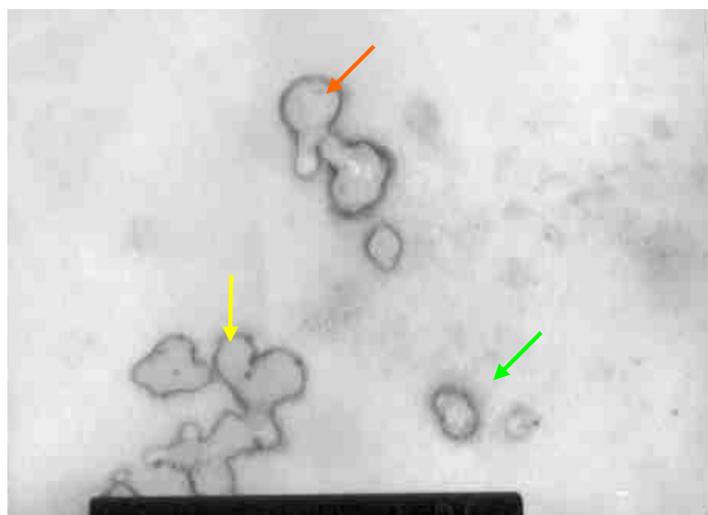


Figura 34. Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas de extracto de floema de Urapán. Las flechas señalan los diferentes cuerpos observados. Flecha naranja posible fisión binaria de fitoplasmas. Nótese en ésta micrografía las diferentes formas que presentan los cuerpos fitoplasmáticos en las que se resaltan ovaladas (flecha verde) y pleomórficos (flecha amarilla) Magnificación 70000X

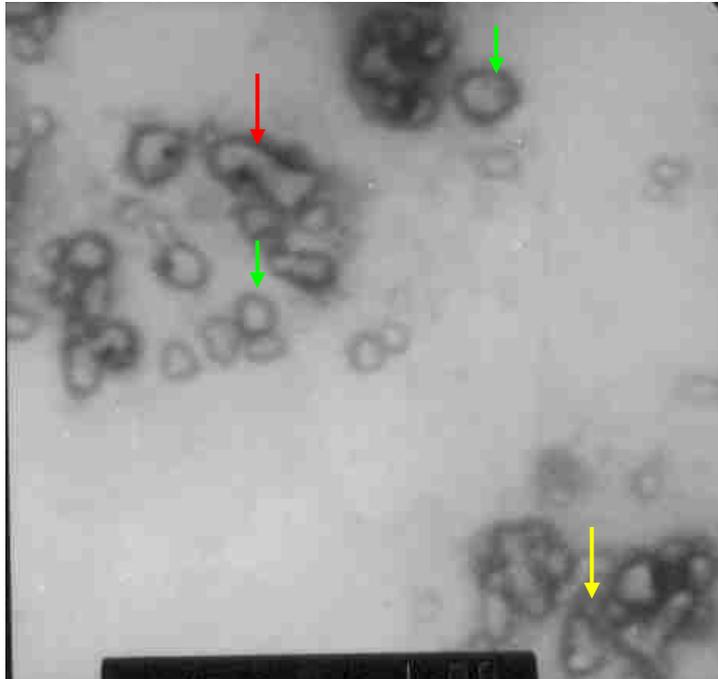


Figura 35. Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas de extracto de floema de Urapán. Las flechas señalan los diferentes fitoplasmas. Nótese en la micrografía diversidad de formas que varían desde circulares (Flecha verde), cuerpos alargados (Flecha amarilla) y pleomórficos (Flecha roja) Magnificación 70000X

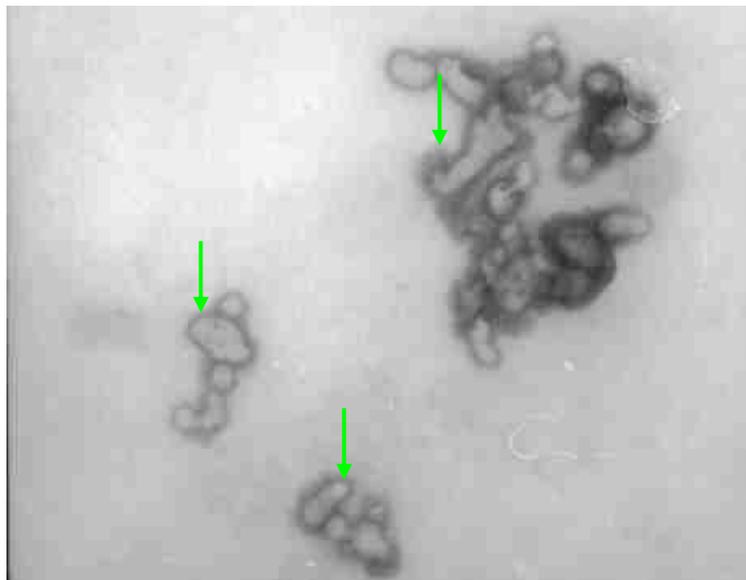


Figura 36. Micrografía electrónica tinción negativa de fitoplasmas de extracto de floema de Urapán. Las flechas señalan los diferentes cuerpos fitoplasmáticos. Magnificación 70000X.

3.4.3 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Las micrografías electrónicas de barrido (figuras 37 a la 39), mostraron la ubicación que se encontró para los fitoplasmas en el tejido objetivo de *C. roseus* y así mismo la similitud de estos microorganismos en el tejido floemático del Urapán (Figuras 40 a la 43).

Esta técnica permitió confirmar la presencia de fitoplasmas en los tejidos floemáticos de las dos especies, aunque no se pudieron hacer descripciones morfológicas en ambos tejidos debido a la baja cantidad de fitoplasmas.

A lo largo de los ensayos realizados por medio de ésta técnica se presentaron problemas en el tratamiento del tejido debido a su rápida desecación y deterioro lo que produjo entonces que en la mayoría de los casos no se pudieran tomar micrografías con mayor magnificación.

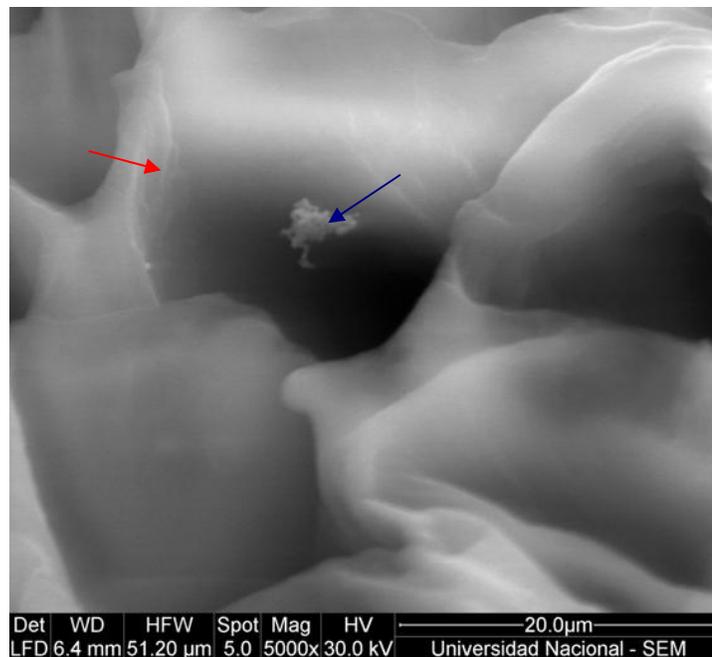


Figura 37. Micrografía electrónica de barrido de tejido de *C. roseus*. Nótese en la micrografía una vista hacia el interior de los tubos cribosos (Flecha roja) y dentro de éstos una acumulación de cuerpos fitoplasmáticos (flecha azul). Además nótese la baja cantidad de cuerpos fitoplasmáticos en el tejido.



Figura 38. Micrografía electrónica de barrido de tejido de *C. roseus*. Obsérvese la disposición de los fitoplasmas (flecha amarilla) en el tubo criboso. Además de la baja cantidad de éstos dentro del tubo



Figura 39. Micrografía electrónica de barrido de tejido de *C. roseus*. Nótese la disposición y agrupación de los fitoplasmas (flecha amarilla) en el tubo criboso.

Las siguientes micrografías electrónicas de barrido (Figuras 40 a 43) fueron obtenidas a partir de extractos de Urapán; permitieron observar la distribución de los fitoplasmas a lo largo de los tubos cribosos del floema, además de la presencia de bacterias (con forma bacilar), indicando la presencia de otras bacterias en el tejido objetivo. La presencia de éstas bacterias, explicaría porque en el tejido floemático de *C. roseus* se observaron también dichos microorganismos y que posiblemente éstos fueron transferidas por la ectoparásita *Cuscuta* sp.

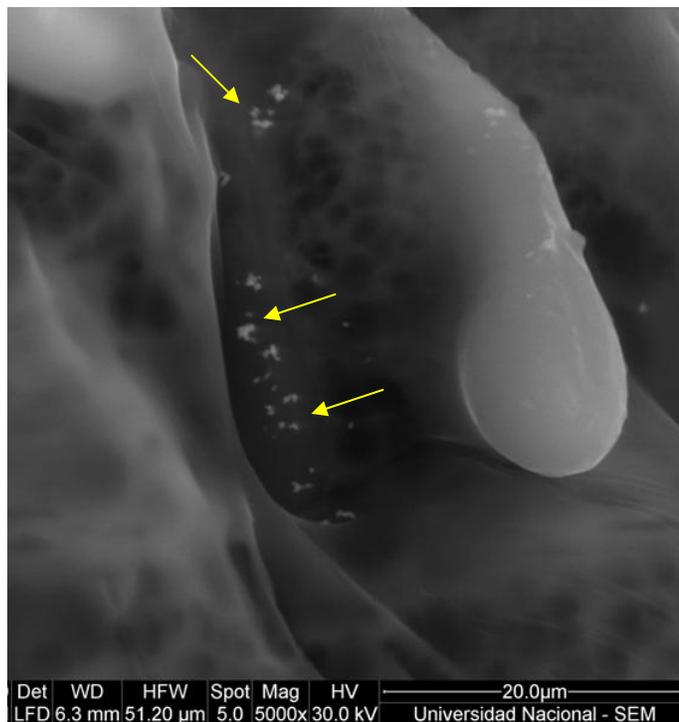


Figura 40. Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán. Nótese la disposición y agrupación de los fitoplasmas (Flecha amarilla) en el tubo criboso.

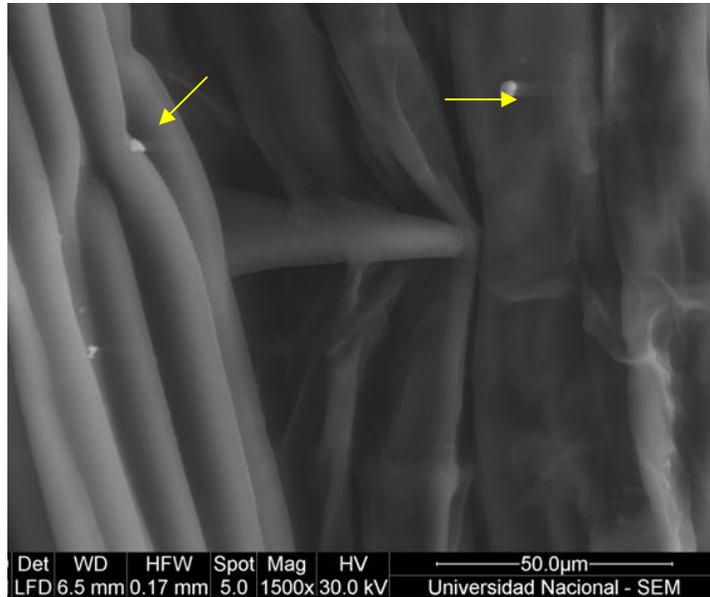


Figura 41. Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán. Nótese la baja cantidad y la disposición de los fitoplasmas (flecha amarilla) en el tubo criboso. Obsérvese que a diferencia de las micrografías anteriores no se encuentran agrupados. Esta micrografía permite ver una posible forma circular de los fitoplasmas pero debido a su baja magnificación no se puede concluir nada al respecto.

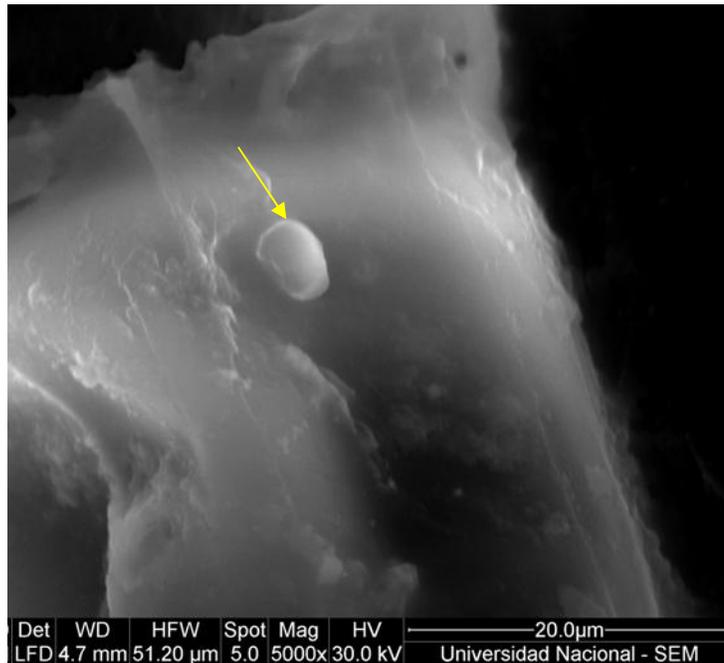


Figura 42. Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán. Nótese la posición del fitoplasma en la pared del tubo criboso y su forma alargada (Flecha amarilla). Además se resalta en esta micrografía la membrana que rodea al fitoplasmas y su grosor.

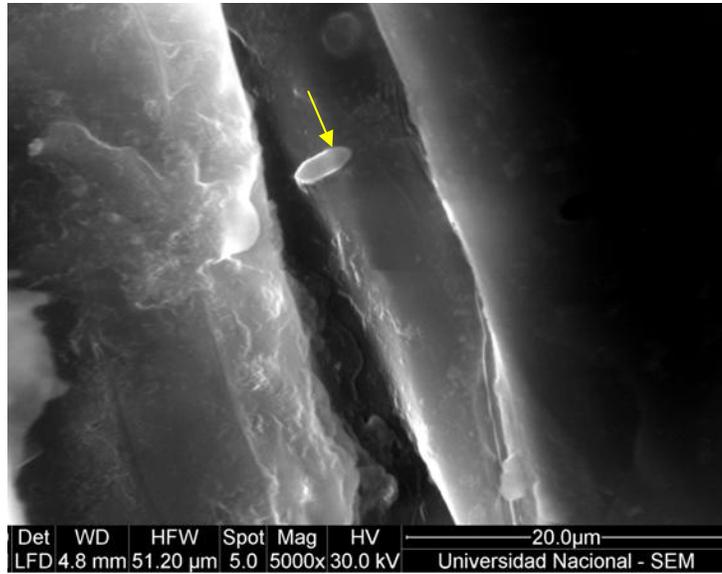


Figura 43. Micrografía electrónica de barrido de tejido de Urapán. Nótese la presencia de bacterias (forma bacilar) diferentes a fitoplasmas en la pared del tubo criboso (Flecha amarilla). Nótese la pared celular que rodea al microorganismo.

4. DISCUSION

El diagnóstico sintomatológico realizado a plantas sintomáticas de *C. roseus* y Urapán permitió observar una correlación en cuanto a la manifestación de los síntomas. Sin embargo, ésta correlación, no permite asegurar que exista una similitud de respuesta ante el ataque de los fitoplasmas por parte de ambas plantas; pues la fisiología de las dos especies y su respuesta ante un ataque por parte de un parásito es diferente, entonces no se puede asegurar con exactitud que exista una correspondencia de la respuesta fisiológica de la planta ante el ataque de los fitoplasmas.

En relación a los diferentes ensayos histológicos realizados que mostraron una “doble infección” (bacterias diferentes a fitoplasmas y fitoplasmas), en el tejido objetivo, no se pudo concluir que los síntomas presentados y evaluados en *C. roseus* y en Urapán sean exclusivamente causados por fitoplasmas, a pesar que los síntomas observados concuerdan con los reportados en la bibliografía (Sandrine, *et al.*, 2001, Griffiths *et al.*, 2003).

Además, la presencia de dos tipos diferentes de microorganismos indican que el diagnóstico visual sintomatológico no es una herramienta veraz para determinar el tipo de parásito que infecta una planta, por el contrario, este tipo de diagnóstico se presta para conclusiones subjetivas que pueden inducir a algún tipo de error si se toman determinaciones con base a éstos como lo demostraron los resultados obtenidos, los cuales, también permitieron determinar que a pesar de la efectividad que tiene *Cuscuta* sp. como planta transmisora y *C. roseus* como indicadora es necesario asegurar que la transmisión que se haga sea solo del microorganismo que se quiere estudiar para no generar ruido en los diagnósticos como lo propone Poghosyan y Lebsky, (2004).

Adicionalmente, los ensayos histológicas permitieron detectar la presencia de microorganismos pertenecientes al grupo de los fitoplasmas, lo cual se confirmó por las características de membrana, tamaño y forma similares a las reportadas en la bibliografía (Chapman, *et al.*, 2001; Pribylova *et al.*, 2001; Musseti *et al.*, 2002).

En cuanto al análisis de las diferentes formas de fitoplasmas, se pudo determinar que para el caso de *C. roseus* el carácter pleomórfico no es la forma predominante, por el contrario, éstos microorganismos presentan generalmente diferentes formas simétricas como lo son la circular y la ovalada.

Cabe resaltar que estas diferencias de formas fueron establecidas según el plano de corte observado y que para determinar una morfología mas acertada de los fitoplasmas es necesario la realización de cortes seriados y una reconstrucción tridimensional

Las observaciones realizadas en el análisis histológico, tanto de microscopía óptica como electrónica permitieron establecer que no hay cambios significativos de un tejido sano respecto a uno infectado, lo que sugiere que la manifestación sintomatológica que desarrollan y presentan las plantas se debe posiblemente a la invasión y taponamiento que ocasionan los fitoplasmas en el tejido vascular, originando de esta forma un bloqueo a nivel de tráfico celular y una interferencia en la comunicación celular en relación con las sustancias elaboradas de la planta.

Los ensayos de microscopía electrónica de transmisión (los efectuados en tejido floemático de *C. roseus*), permitieron observar características representativas de los fitoplasmas como una membrana que presenta más de una capa, probablemente dos, características internas como la molécula de ADN y además de la comparación de los microorganismos aquí observados con la bibliografía (Waters y Hunt, 1980; Khadair, *et al.*, 1999; Chapman, *et al.*, 2001; Pribylova *et al.*, 2001; Musseti *et al.*, 2002, Siddique; *et al.*, 2001).

El segundo ensayo de microscopía electrónica de transmisión (tinción negativa), mostró que los fitoplasmas que habitan en el tejido de Urapán tienen un tamaño menor (escala nanométrica). A pesar de la poca información que se encuentra reportada en cuanto a la aplicación de ésta técnica, los resultados en este trabajo son un primer indicio como herramienta de detección de fitoplasmas en extractos de floema de Urapán y que también puede ser aplicados a otros tejidos infectados con fitoplasmas.

Por otra parte, en cuanto a ésta técnica se resalta que las muestras vegetales de donde se extrajo el floema de Urapán fueron árboles que en su etapa de crecimiento estuvieron sometidos a factores ambientales diferentes y de cierta manera mas intensos que a los que estuvieron sometidos las plantas de *C. roseus* (riego y abono constante pudieron favorecer la colonización de los fitoplasmas), se propone entonces con base a éstos resultados que el cambio de hospedero puede inducir posiblemente a un cambio morfogénico por parte de los fitoplasmas como lo sugiere Chapman y colaboradores en el 2001; los cuales afirman que los fitoplasmas pueden cambiar su forma celular y tamaño debido a características como edad del fitoplasma, estado de infección y otros factores

Finalmente, con base a los resultados obtenidos por microscopía óptica y electrónica de transmisión se pudo concluir que para realizar estudios morfométricos de tejido vegetal infectado con fitoplasmas no es indispensable para una descripción de fitoplasmas a nivel morfométrico la microscopía electrónica de transmisión como herramienta de estudio. Este trabajo permitió concluir que la preparación del tejido para cortes semifinos es una metodología adecuada para obtener descripciones estructurales y morfológicas de los fitoplasmas del tejido de interés con que se quiera trabajar. Adicionalmente, tiene como ventajas la reducción de costos que implica no hacer análisis histológicos de microscopía electrónica.

En la introducción de éste trabajo se mencionó la imposibilidad de detectar e identificar los microorganismos que estaban infectando a los Urapanes, por lo anterior se hizo necesario realizar comparaciones con los resultados anteriores de microscopía electrónica de transmisión realizado por Rodríguez (2004), del grupo de Biotecnología Vegetal de la Universidad Militar Nueva Granada y así poder finalmente determinar los factores que habían provocado que anteriormente no se haya podido describir este microorganismos. Es importante anotar que la diferencia en los datos que se presentaron en los resultados de los trabajos no permitió realizar comparaciones más detalladas y que para este caso se tomaron solamente como factores comparables la distribución de los microorganismos en le tejido.

Los resultados obtenidos por Rodríguez (2004) mostraron gran diferencia con los resultados obtenidos en éste trabajo en cuanto a las características ultraestructurales de forma, tamaño, membrana, entre otras, la comparación de los dos trabajos arrojó lo siguiente:

- La diferencia observada con las micrografías obtenidas en el estudio anterior se atribuye principalmente a que para el estudio anterior los microorganismos observados fueron principalmente bacterias; lo que a su vez concuerda, con las bacterias endófitas observadas en Urapán en microscopía electrónica de barrido en este estudio y con el trabajo realizado por Martínez (2005), en el que se comprobó la presencia de bacterias diferentes a fitoplasmas (pertenecientes al género *Staphylococcus* y *Bacillus*), lo que explica la diferencia de los microorganismos encontrados en los dos tejidos floemáticos.
- En el estudio anterior no se encontraron fitoplasmas sino que por el contrario los microorganismos descritos en este trabajo corresponden a bacterias no se realizaron comparaciones con el rango promedio de tamaño

- Se observó similitud en cuanto a la distribución de los microorganismos observados en los dos trabajos; la distribución de los fitoplasmas y bacterias no es regular, tanto en tejido floemático de Urapán, como en *C. roseus*. Esta similitud respecto a la distribución permitió comparar principalmente lo observado en este trabajo respecto a la distribución de los fitoplasmas. Esta distribución no homogénea sugiere una baja concentración de estos en los vasos floemáticos como se pudo observar en los conteos realizados son suficientes para desencadenar respuestas fisiológicas por parte de la planta ante un ataque como al que fue sometido *C. roseus*.

5. CONCLUSIONES

- 1 Se logró confirmar la presencia de cuerpos fitoplasmáticos en los diferentes ensayos histológicos realizados a muestras vegetales de *C. roseus* y Urapán.
- 2 Las características morfométricas de los fitoplasmas son: grosor membrana promedio 6.84nm; diámetro promedio 1.147 μm y forma predominante circular.
- 3 La distribución de los fitoplasmas en los dos tipos de tejido evaluados *C. roseus* y Urapán es irregular, no se logró determinar un patrón de distribución de los fitoplasmas en el tejido floemático.
- 4 La técnica de microscopía de alta resolución en bloques de tejido tratado con azul de toluidina es una técnica de diagnóstico alternativa a la microscopía electrónica que permite describir preliminarmente a los fitoplasmas.

6. RECOMENDACIONES

- 1 Realizar trabajos histológicos en microscopía óptica y evaluar los diferentes tejidos de la planta como raíz y tallo para poder determinar la distribución de los fitoplasmas.
- 2 Es necesario la realización de cortes seriados y realizar reconstrucción tridimensional de los mismos con el fin de confirmar las morfologías que fueron establecidos en este trabajo y así determinar una morfología definitiva de los fitoplasmas que infectan al Urapán.
- 3 Realizar más observaciones de microscopía electrónica de barrido para poder obtener imágenes de ultraestructura de los fitoplasmas que permitan hacer descripciones más detalladas de éstos microorganismos.
- 4 Reevaluar el protocolo de tinción negativa y así mismo de la extracción del floema.

BIBLIOGRAFIA

Acosta de la Luz y Rodríguez F. 2002. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus roseus* (L) G. Don Vicaria. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **7**: 96-99

Aldana J., Castro L. 2003. Reconocimiento de los síntomas de decaimiento de *Fraxinus chinensis*. Proyecto de Iniciación Científica. Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.

Ammar El_D. Fulton D. Bai X., Meulia T., Hogenhout S. 2004. An attachment tip and pili-like structures in insect and plant-pathogenic spiroplasmas of the class mollicutes. *Arch Microbiology*. **181**: 97-105

Barros S.L., Davis e., Resende O., Dally E. 2002. Erigeron Witches' Broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup Vii-B 16S- rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease*. **86**: 1142-1148.

Bové J.M, 1984. Wall- less prokaryotes of plant. *Annual Review Phytopathology*. **22**: 361-396.

Bozzola J.J., Russell L.D. 1999. Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists. Second Edition. Pág 58-60.

Bricker J., Stutz J., 2004. Phytoplasma associated with ash decline. *Journal of Arboriculture*. **39**: 193

Chapman G.B., Buerkle E.J., Barrows E.M., Davis R.E., Dally E.L., 2001. A light and Transmission Electron Microscope study of a black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), affected by witches'-broom, and classification of the associated phytoplasma. *Journal Phytopathology*. **149**: 589-597.

Davis R.E. and Sinclair W.A., 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*. **88**: 1372-1376

Feeley C., Hart E., Thompson J., Harrington T., 2001. Occurrence, associated symptoms, and potential insect vectors of the ash yellows phytoplasma in Iowa, U.S. *Journal of Arboriculture*. **27**(6): 331-340

Franco L., Filgueira J.J., 2003. Componentes sintomatológicos de la enfermedad del Decaimiento y Muerte en Plantas de Urapan (*F. udhei*). Memorias XXIV Congreso Ascolfi Bogotá

Filgueira J.J., Franco Lara L., Salcedo J.E., Gaitan S.L., Boa E.R. 2004. Urapán (*Fraxinus udhei*) dieback, a new disease associated with a phytoplasma in Colombia. *Plant Pathology*. **53**: 520.

Garnier M., Foissac X., Gaurivard P., Laigret F., Renaudin J., Saillard C and Bové J.M., 2001. Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *Sciences de la vie*. **324** : 923-928

Khadhair A.H., McClay A., Hwang S.F., Shah S., 1999. Aster yellow phytoplasma identified in scentless chamomile by microscopically examinations and molecular characterization. *Journal Phytopathology*. **147**:149-154.

Lee I.M, Dawn E, Rindal G, Bertaccini A, 1998. Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology*. **88**: 1359-1366

Lee I.M., Davis R.E, Dawn E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. **54**: 221-255

Lee I.M., Martini M., Botter K.D., Dane M.C., Black M.C., and Troxclair. 2003. Ecological Implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*. **93**: 1368-1377

Martínez C.A., 2005. Ensayos prelimares para la búsqueda de bacterias del floema distintas a fitoplasmas en Urapanes sintomáticos Proyecto de Iniciación Científica, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.

Mercer E.W., Birbeck M. 1972. Manual de Microscopía Electrónica para biólogos. Capítulos 2,3 y 5. Págs 93-103

Musetti R., LOI N., Carraro L., Ermacora P., 2002. Application of immunoelectron microscopy techniques in the diagnosis of phytoplasma diseases. *Microscopy Research and Technique*. **56**, 462-464.

Musetti R., Favali M.A., 2004. Microscopy techniques applied to the study of phytoplasma diseases: traditional and innovative methods. *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*.

Pribylova J, Spak J, Franová, Petrzik, 2001. Association of aster yellows subgroup 16Srl-B phytoplasmas with a disease of *Rehmannia glutinosa* var. *Purpurea*. *Plant Pathology* **50**: 776-781

Poghosyan A., Lebsky V., 2004. Aislamiento y estudio ultraestructural de tres cepas de fitoplasmas causantes de enfermedades tipo "stolbur" en solanaceae. *Fitopatología Colombiana*. **28**, 21-31

Puay Y, and Whidow T, 2001. Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasmas infection. *New Phytologist*. **150**: 757-769

Rodríguez A.M., 2004. Detección de fitoplasmas en tejido de *Fraxinus* sp. Con síntomas de “Ash Yellows” mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión. Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.

Sandrine J., Tarendeau F., Goulter K., Danet J., Bovè J., Garnier M., 2001. *Catharanthus roseus* regulated differentially by Mollicute Infections. *The American Phytopathological Society*. **14**: 225-233

Santander R.G. Técnicas de microscopía electrónica en Biología. 1968. Aguilar. Pág 551.

Siddique A.B.M., Agrawal G.K., Alam N., Reddy M.K, 2001. Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with little leaf disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Bangladesh. *Journal Phytopathology*. **149**: 237-244

Sinclair W.A and Griffiths H.M, 1992. Detection of ash yellows mycoplasma like organisms in different tree organs and in chemically preserved specimens by a DNA probe vs DAPI. *Plant Disease*. **76**: 154-458.

Sinclair W.A and Griffiths H.M, 1994. “Ash Yellows” and its relationship to dieback and decline of ash. *Annual Review of Phytopathology*. **32**: 49-60

Sinclair W.A and Griffiths H.M, 1996. “Ash Yellow” and Lilac witches'-Broom: phytoplasmal diseases of concern in forestry and horticulure. *Plant Disease*. **80**(5):468-475.

Waters H., Hunt P., 1980. The in vivo three dimensional form of a plant mycoplasma-like organisms by the analysis of serial ultrathin sections. *Journal of general Microbiology*. **116**, 111- 131

Weintraub P., y Beanland L., 2006. Insect vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. **51**: 91-111

ANEXO 1. DATOS ORIGINALES DE LAS MEDIDAS TOMADAS A FITOPLASMAS EN MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION. ▲. Medidas registradas en la unidad dada por la reglilla micrométrica del microscopio. Medidas tomadas en el objetivo de 100X.

NO. Fitoplasma	DM▲			Dm▲			T▲		
1	1,1	2	1,1	1,1	1	1	1,1	2	1
2	1	1	1	1	1	0,9	1,1	1,1	0,9
3	1	1,1	1,1	0,9	1	1	1	1	1
4	1,1	1,1	2,1	1	1	1	1	1	1
5	0,8	1,9	1	0,8	1	1	1	2	1
6	2	0,9	2	1	0,9	1	1	0,9	1
7	1	1	1,2	0,9	1	1	1	1,1	1
8	1	1,1	1	1,1	1	1	1,1	1,1	1
9	2	1,1	1	2	1	1,1	3	1,1	1
10	1	1	1	0,9	0,9	0,9	1	1	1
11	2	1	2	1	0,9	1	1	1	2
12	1	1	2	1	1	1	0,9	1	2
13	0,9	1,1	1,1	0,9	1	1	1	1	1
14	1,1	0,9	1,1	1	0,9	0,8	2	0,9	0,8
15	2	1	2	2	1	1	2	1	1
16	1,1	0,8	1,1	1	0,8	1	1	0,8	1,1
17	1	1,1	1	1	1	1	1,1	1	1
18	2	3	0,9	1	1,1	1	1	0,8	0,9
19	1	2,1	4	1	1,1	3	1	1	3
20	2	1	4	1	1	2	2	1,1	3
21	3	2	5	1	1	2	2	1	4
22	1	1	3	1	1,1	2	1	0,9	3
23	1	1,2	1,1	1	1	1,1	1	1	1,1
24	2	2,1	0,9	1	1	1,1	1	1,2	1,1
25	2	1	1	1	1	1,1	1,1	1,2	2
26	1	1	4	1	1	2	1,1	1,2	3
27	2	2	4	1	1	2	1	1	3
28	1	3	3	1	2	2	1	2	2
29	0,9	1,1	3	0,9	1	1	1	1	2
30	0,9	1	1	0,9	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	0,8	1	1,1	0,8	0,9
32	2	2	2	1	1	1	1	2	1,9
33	1,1	3	1,1	1	1	1	1,1	1	1
34	1	1	2	1	0,8	1	1	1,1	1
35	1	3	2	0,9	2	1	0,9	3	2

ANEXO 2. DATOS ORIGINALES DE LAS MEDIDAS DE DIAMETRO TOMADAS A LAS BACTERIAS EN MICROSCOPIA OPTICA. ▲. Medidas registradas en la unidad dada por la reglilla micrométrica del microscopio. Medidas tomadas en el objetivo de 100X.

DIAMETRO ▲	
1	1,2
1	1,1
1,1	1
2	1
1	1
1,1	0,8
1	3
1,1	1
1,1	1,1
1	1
1	1,8
1,1	1
1,1	1,8
2	2
1	2
1,1	1,1
3	1
1,1	1
1	1
1	0,9
1,1	1
2	2
0,9	2
1	2
2	2
1	1
1	1,1
0,9	1
1	1,1
1	0,9
0,9	1
0,8	1
1,1	2
0,9	3
0,9	2
1,2	3,1
1	1,1
1	1
1	1,1
1,1	1

ANEXO 3. MEDIDAS ORIGINALES DE DIAMETRO DE FITOPLASMAS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. LAS MEDIDAS FUERON REALIZADAS EN CONTACTOS DE LAS MIROGRAFIAS Y APARECEN EN mm

No Fitoplasma	DM		Dm		T	
1	8	15	5,5	10	6,5	16
2	7,5	14	6,5	10	7	14
3	7	12	5,5	4	6,5	14
4	5	8	4,0	7,0	5	7,5
5	5,5	7	4,0	5,5	4,5	6
6	4,5	9	4,0	6,0	4,5	8,5
7	4	7	3,5	5,0	4	6
8	4,5	6	4,0	4,0	4,5	6
9	4,5	10,5	3,5	3,0	4	8,5
10	5	6,5	4,0	2,5	4,5	6
11	3	8	2,5	3,0	3	7
12	5	4	4,0	3,5	4	4
13	4,5	5	2,5	3,0	4	4
14	3	6	2,0	4,0	3	5,5
15	3	4	2,5	3,5	3	4
16	3,5	6	3,0	2,0	3,5	5
17	4,5	7	4,0	6,0	4,5	6,5
18	3	9,5	2,0	5,0	2,5	8
19	3	4	2,5	2,0	3	3,5
20	3	3,5	2,5	3,0	2,5	4
21	2	4,5	1,5	3,5	1,5	4,5
22	3	6	2,0	3,5	3	4,5
23	3	5	1,5	3,5	2,5	4
24	3	7	2,5	5,5	3	6
25	2,5	4	2,0	2,0	2,5	3
26	70	3	19	2,0	67	2,5
27	19	2	7	1,0	20	1,5
28	13	3	9	1,5	14	2
29	9		8		9	

ANEXO 4. MEDIDAS ORIGINALES DE DIAMETRO DE BACTERIAS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. LAS MEDIDAS FUERON TOMADAS DE CONTACTOS DE LAS MICROGRAFIAS. LOA DATOS APARECEN EN mm.

DIAMETRO BACTERIAS	
24	24
19	19
11	11
16	16
11	11
3	3
4	4
3	3
2,9	2,9
2,9	2,9
2	2
2	2
2	2
2	2
2	2
1,5	1,5
1,5	1,5
1	1
2,9	2,9
3	3
3	3
4	4
2	2
2	2
1	1
1	1
1,9	1,9
1,5	1,5

ANEXO 5. DATOS ORIGINALES DE MEDICION DEL GROSOR DE MEMBRANA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. DATOS APARECEN EN nm.

GROSOR MEMEBRANA nm	
7,11	5,40
6,22	6,20
6,67	6,20
6,89	4,60
7,50	4,60
8,50	6,40
6,50	8,60
6,50	5,83
8,00	5,00
8,00	6,67
8,50	6,17
5,50	8,14
7,50	8,86
8,50	8,71
5,60	7,57
5,60	

ANEXO 6 FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO DE URAPÁN EN EL PARQUE “EL VIRREY” DE BOGOTÁ.

Se registra en la planilla los síntomas asociados a cada uno de los tres agentes asociados: fitoplasmas, insectos y otros (ambientales). Se registro 1 para la presencia del síntoma y 0 para la ausencia del mismo. El síntoma de muerte apical (MA) se registro en fracciones según la intensidad que presentaba éste síntoma.

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA																
Registro de observaciones de síntomas presentes en Urapán (<i>Fraxinus</i> sp.)																
DESCRIPCION DE SINTOMAS																
Arbol No	ASOCIADOS A FITOPLASMAS						ASOCIADOS A INSECTOS			OTROS						
	CE	HP	MA	RC	DL	DC	MH	PC	PN	DF	A	DI	M	RM	NP	NM
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																

CE: Crecimiento epicórnico. HP: Hojas pequeñas. MA: Muerte apical 1/3, 2/3, 3/3. RC: Ramos en copo. DL: Delicuescencia. DC: Descortezamiento. MH: Malformación de hojas. PC: Puntos cloróticos. PN: Puntos negros (Excremento). DF: Defoliación. A: Amarillamiento. V (verde); VC (verde claro); D (Dorado); A (Amarillo)., DI: Decaimiento. M: Marchitez. RM: Ramas muertas. NP: Necrosis en la punta de la hoja. NM: Necrosis marginal.

ANEXO 7: FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL ANÁLISIS SINTOMATOLÓGICO DE *Catharanthus roseus*.

Se registra en la planilla los síntomas asociados a fitoplasmas. Se registro 1 para la presencia del síntoma y 0 para la ausencia del mismo.

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA										
Registro de observaciones de síntomas presentes en <i>Catharanthus roseus</i>										
DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS										
Planta No	SINTOMAS									
	HP	F	V	R	AE	PA	A	FP	HD	D
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

HP: Hojas pequeñas. F: Filodia. V: Virescencia. R: Rebotes. AE: Acortamiento entre nudos. PA: Pérdida dominancia apical. A: Amarillamiento. FP: Flores pequeñas. HD: Hojas deformes. D: Decaimiento

ANEXO 8. DATOS ORIGINALES DE CAMPO DEL ANALISIS SINTOMATOLÓGICO REALIZADO A URAPAN

Arbol No	DESCRIPCION DE SINTOMAS															
	ASOCIADOS A FITOPLASMAS						ASOCIADOS A INSECTOS			OTROS						
	CE	HP	MA	RC	DL	DC	MH	PC	PN	DF	A	DI	M	RM	NP	NM
1	1	1	1/3	1	0	0	1	1	1	1	VC	1	1	1	1	1
2	1	1	2/3	0	1	0	1	1	1	1	A	1	0	1	1	1
3	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	VC	0	0	0	1	1
4	1	1	1/3	1	1	0	0	1	1	0	A	1	1	0	1	1
5	1	1	1/3	0	1	0	1	1	1	1	VC	1	0	1	1	1
6	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	A	1	1	0	1	1
7	0	1	2/3	0	1	0	1	1	0	1	VC	1	0	1	1	1
8	1	1	1/3	0	1	0	1	1	1	1	VC	1	0	1	1	1
9	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	VC	1	0	1	1	1
10	1	1	1/3	1	1	0	1	1	1	1	A	1	1	1	1	1
11	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	A	1	1	1	1	1
12	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	A	1	1	1	1	1
13	1	1	1/3	1	1	0	1	1	1	1	A	1	1	1	1	1
14	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	VC	1	1	1	1	1
15	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	VC	0	0	1	1	1
16	0	1	1/3	0	1	0	1	1	1	1	VC	0	0	1	1	1
17	0	1	2/3	1	1	0	1	1	1	1	A	1	1	1	1	1
18	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	VC	1	1	1	1	1
19	1	1	1/3	1	1	0	1	1	0	1	VC	1	1	1	1	1
20	1	1	2/3	1	1	0	1	1	0	1	A	1	1	1	1	1
21	1	1	1/3	1	1	0	1	1	0	1	VC	1	1	1	1	1
22	1	1	1/3	0	1	0	1	1	0	1	A	1	1	1	1	1
23	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	A	1	1	1	1	1
24	1	1	2/3	1	1	0	1	1	0	1	A	1	0	1	1	1
25	1	1	1/3	0	0	0	1	1	0	1	VC	1	1	1	1	1
26	1	1	1/3	0	1	0	1	1	0	1	A	1	1	1	1	1
27	1	1	1/3	0	1	0	1	1	0	1	A	1	1	1	1	1
28	1	1	2/3	1	1	0	1	1	0	1	VC	1	0	1	1	1
29	1	1	1/3	1	1	0	1	1	0	1	VC	1	1	1	1	1
30	1	0	1/3	0	0	0	1	1	0	1	VC	0	0	1	1	1

CE: crecimiento epicórnico. HP: Hojas pequeñas. MA: Muerte apical (dieback) 1/3, 2/3, 3/3. RC: Ramos en copo. DL: Delicuescencia. DC: Descortezamiento. MH: Malformación de hojas. PC: Puntos cloróticos. PN: Puntos negros (Excremento). DF: Defoliación. A: Amarillamiento. V (verde); VC (verde claro); D Dorado; A Amarillo. DI: Decaimiento. M: Marchitez. RM: Ramas muertas. NP: Necrosis en la punta de la hoja NM: Necrosis marginal

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

JUAN JOSE FILGUEIRA DUARTE, Biólogo M.Sc., Dr.Sc. docente de la Facultad de Biología de la Universidad Militar Nueva Granada quien con su conocimiento, motivación y paciencia dirigió este trabajo satisfactoriamente

LILIANA FRANCO LARA, Ph. D. docente de la facultad de Biología de la Universidad Militar Nueva Granada, quien brindó grandes conocimientos y motivaciones para la realización de éste trabajo