

DIAGNOSTICO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO POR METODOS DE MICROSCOPIA

Rolando Cardeña

Centro de Investigación Científica de Yucatán, Km. 7 antigua carretera a Progreso, AP
87, Cordemex 97310, Yucatán, MEXICO

INTRODUCCION.

El empleo del microscopio, tanto óptico como electrónico, es una de las herramientas más ampliamente utilizadas en el diagnóstico de enfermedades vegetales causadas por organismos tipo micoplasma (OTMs). La microscopía óptica se ha valido de métodos histoquímicos que detectan en el floema de plantas afectadas: 1) cambios inducidos en los tejidos del huésped por la presencia de los OTMs, o 2) el ADN de los mismos. El empleo de ambas aproximaciones en el diagnóstico de distintas enfermedades micoplásmicas de plantas ha sido revisado por Németh (1986). Es importante hacer notar que ninguna de estas estrategias de detección nos permite asegurar que una observación positiva se deba a la presencia de OTMs. En el primer caso, la explicación se encuentra en el hecho de que los cambios histológicos producidos por su presencia son respuestas muy inespecíficas hacia una variedad de agentes infecciosos (Ayers et al., 1985). La ambigüedad de resultados de la segunda estrategia se debe a que, al ser el ADN una molécula común a cualquier patógeno, la detección de acumulaciones anormales del mismo no puede atribuirse inequívocamente a la presencia de OTMs. El único caso en que la microscopía óptica ofrece una alternativa segura de diagnóstico se presenta cuando se dispone de anticuerpos específicos que permiten la aplicación de métodos de inmunofluorescencia. Estos métodos han sido aplicados en algunos de los pocos casos en que se dispone de anticuerpos contra OTMs (Lin and Chen, 1986). A pesar de su inespecificidad, la histoquímica ha demostrado ser de gran utilidad por una serie de razones. En primer lugar, la validez de las observaciones positivas se refuerza por el hecho de que éstas se detectan sólo en plantas que presentan síntomas de la enfermedad que se desea

diagnosticar, los cuales en muchas ocasiones, como en el caso del amarillamiento letal (AL), son muy característicos. En segundo lugar, la relativa facilidad y rapidez de estos métodos permiten la evaluación de un gran número de plantas. Si a esto aunamos que en un gran número de enfermedades los resultados de estos métodos han sido validados por medios más confiables como la microscopía electrónica (Deeley et al., 1979), se comprende la gran utilidad que como herramienta de diagnóstico han proporcionado al fitopatólogo.

No obstante la amplia aplicación de los métodos histoquímicos, el microscopio electrónico sigue siendo la herramienta más aceptada para establecer la etiología micoplásmica de enfermedades vegetales. Su principal desventaja es que, dado que sólo permite analizar muestras muy pequeñas, la distribución irregular del patógeno en la planta puede dar lugar a falsos negativos. Además, las técnicas de preparación de la muestra son más elaboradas y tardadas.

Refiriéndonos ahora al caso específico del AL, los primeros reportes sobre la observación de OTMs en palmas enfermas datan de 1972 (Beakbane et al., 1972; Heinze et al., 1972; Plavsic-Banjac et al., 1972). En estos estudios se observaron OTMs típicamente pleomórficos: ovoideos, elongados y filamentosos, de tamaños similares a los que frecuentemente presentan organismos de este tipo en otras enfermedades de plantas. La mayor concentración de OTMs estuvo asociada a tejidos en crecimiento activo con una alta demanda de nutrientes como meristemo apical, inflorescencia, raíz y bases de peciolo de hojas en expansión. Su presencia fue detectada en palmas en diferentes estados de la enfermedad, aún antes de que se presentara daño tisular o de que ocurriera un marchitamiento secundario de origen bacteriano, y fue nula en tejidos equivalentes de palmas asintomáticas. Desde entonces, esta técnica se ha empleado para detectar OTMs en una gran variedad de especies de palmas susceptibles al AL (Parthasarathy, 1973; Thomas, 1979). Thomas y Norris (1980) discuten las ventajas y desventajas de la microscopía electrónica en el diagnóstico del AL. El empleo de métodos histoquímicos con la misma finalidad ha sido reportado con posterioridad (Schuiling et al., 1981), y ha involucrado el uso de colorantes fluorescentes como el 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que es un agente intercalante específico para pares de bases A-T. En estos estudios se analizaron tejidos de inflorescencia, raíz, hoja espada, pecíolos de hojas juveniles y tejido próximo al meristemo apical, y se encontró una estrecha relación entre presencia de acumulaciones de ADN y formación de callosa, también en floema, detectada mediante tinción con el fluorocromo azul de anilina. La confirmación de la presencia de OTMs se efectuó mediante la observación al microscopio electrónico de tejidos cuya reacción al DAPI fue positiva (Nienhaus et al., 1982).

La intención de este trabajo es presentar en forma de manual la experiencia desarrollada en el CICY durante el diagnóstico del AL mediante microscopía de fluorescencia. El diagnóstico mediante microscopía electrónica es un proceso que requiere de mucho más tiempo y de equipo más especializado, y no será detallado en esta obra. El lector interesado en los procedimientos generales para el análisis de muestras vegetales mediante microscopía electrónica puede acudir a Hall (1978).

A. Material biológico.

Como se estableció en la Introducción, la mayor concentración de OTMs se localiza en tejidos en crecimiento activo con una alta demanda de nutrientes como meristemo apical, pecíolos de hojas en expansión, raíz e inflorescencias. El muestreo de meristemo apical y pecíolos de hojas jóvenes, además de difícil por implicar cortar el tronco de la palma y podar hoja por hoja de la corona, es un método destructivo que impide efectuar estudios de seguimiento a las plantas afectadas. De tal manera, quedan como opciones raíz e inflorescencia. Ambos tejidos presentan la ventaja de que su muestreo no mata a la palma, y permite de esta manera el seguimiento posterior de la enfermedad.

Así, los tejidos más comúnmente empleados en nuestros estudios de diagnóstico mediante microscopía de fluorescencia consistieron de raíces e inflorescencias de plantas aparentemente sanas o con síntomas visuales de AL, colectadas en el campo y transportadas al laboratorio para su análisis. Basándonos en observaciones previas (Nienhaus et al., 1982), siempre que fue posible se seleccionaron inflorescencias que mostraron el necrosamiento café característico del AL.

B. Material y equipo de laboratorio.

1. Porta y cubreobjetos.
2. Navaja de rasurar delgada.
3. Pinzas de disección.
4. Microscopio de epifluorescencia.

C. Reactivos y soluciones.

Solución 1.- Buffer salino de Tris (TBS): 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5

Solución 2.- 1 mg de 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por ml de TBS.

Solución 3.- 87 % (p/v) glicerol.

Nota: Alternativamente al TBS, pueden emplearse otros buffers como por ejemplo de fosfatos.

C. Protocolo.

1. Efectuar cortes longitudinales, lo más delgados posible, a ramas de inflorescencia o raíces jóvenes. Si se trabaja con raíces muy gruesas, el cilindro vascular puede separarse de la corteza previamente. Las flores masculinas deben de eliminarse para facilitar el corte de las ramas.

2. Cubrir los cortes con una gota de la solución 2 y dejarlos incubando al menos 15 min.

3. Retirar la solución 2 con papel absorbente y lavar el exceso de DAPI mediante dos incubaciones de 5 min en la solución 1.

4. Después de eliminar el exceso de solución 1, montar los cortes en la solución 3 y taparlos con cubreobjetos.

5. Observar los cortes en un microscopio de epifluorescencia bajo luz ultravioleta, con un filtro de excitación de 365 nm en combinación con uno de barrera de 475 nm. La amplificación mínima para la observación adecuada de las acumulaciones de ADN en los vasos cribosos del floema es de unas 250X. Los cortes pueden almacenarse en refrigeración, resguardados de la luz, si la observación no se efectúa de inmediato.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Cuando se aplica el protocolo anterior a cortes longitudinales de inflorescencias de palmas con síntomas de AL se observa la presencia de filamentos fluorescentes a lo largo de los tubos cribosos del floema (fig. 1B, flecha), los cuales se encuentran a menudo dispuestos en línea a lo largo de una fila de vasos cribosos. Los controles hechos con inflorescencia de palma sana no mostraron estos filamentos (fig. 1A). Cuando se efectúan observaciones a un mayor aumento (figs. 1C-D) se detecta que estos filamentos constituyen oclusiones de un material fluorescente de apariencia granulada (fig. 1C), a veces muy densamente empaçado. Estas oclusiones abarcan a menudo toda la extensión de un vaso criboso. En ocasiones es posible discernir numerosos puntos fluorescentes tapizando las paredes del vaso criboso, los cuales están asociados a acumulaciones más densas de material fluorescente en la cercanía inmediata (fig. 1D).

Los resultados de la tinción con DAPI muestran diferencias consistentes entre tejidos provenientes de palmas sanas y con síntomas de AL, y concuerdan con las observaciones hechas por Deutsch y Nienhaus (1983) en palmas de *C. nucifera* afectadas por esta enfermedad en Tanzania. Además, hemos mostrado mediante el microscopio electrónico la presencia de OTMs en tejidos de palma enferma similares a los tratados con DAPI, así como su ausencia en los de palma sana (datos no mostrados). En conjunto, nuestros resultados han demostrado la utilidad de la microscopía de fluorescencia como un método preliminar para el diagnóstico rápido del AL.

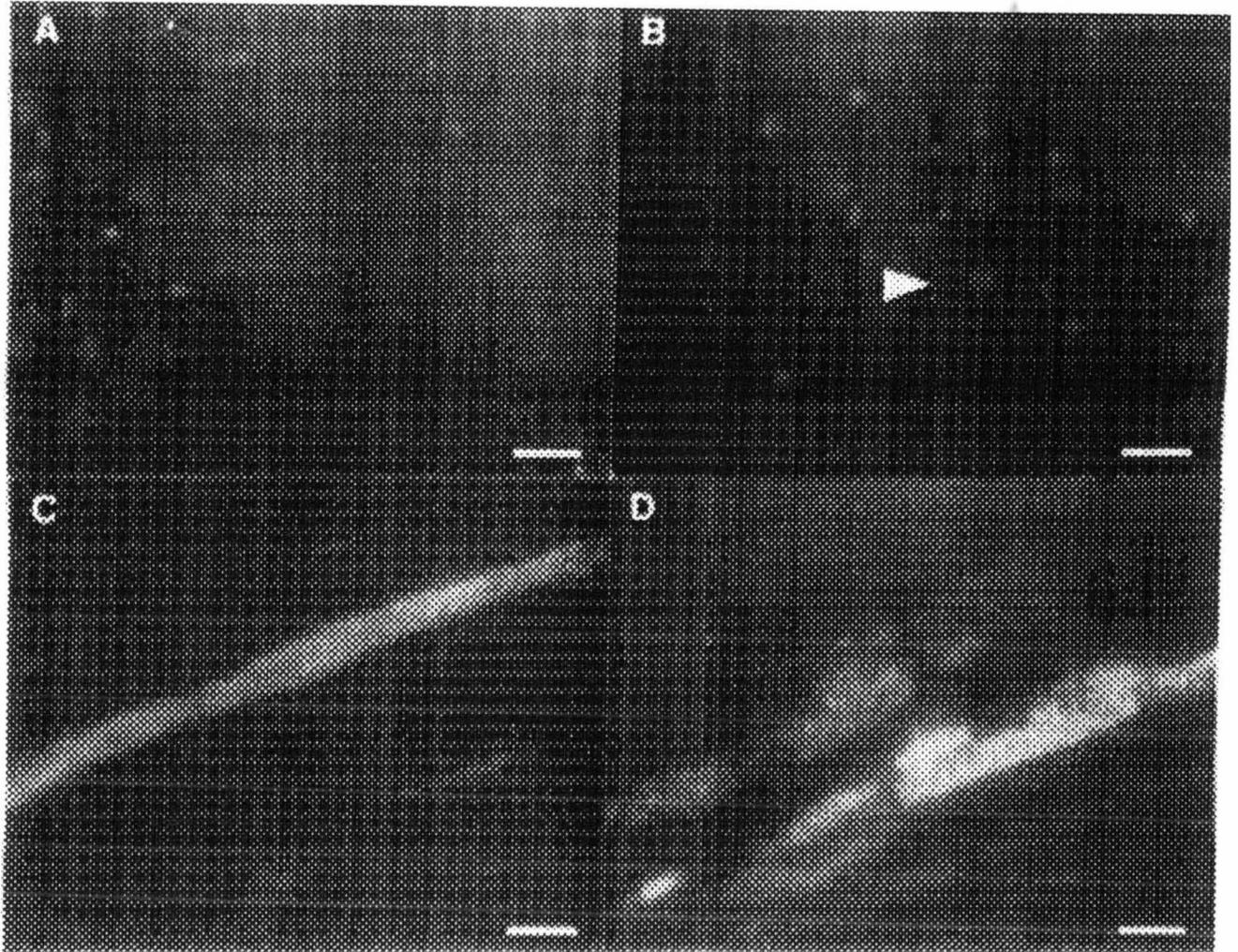


Fig. 1. Secciones longitudinales de tejido vascular de inflorescencia (A, B, y D) y raíz (C) de palmas de *Cocos nucifera*, después de 15 min de incubación en $1 \mu\text{g/ml}$ de DAPI en TBS. La única fluorescencia detectada en tejido de palma sana (A) es debida al fondo y a núcleos fuera de foco. En palma enferma se observan filamentos fluorescentes a lo largo de los vasos de floema (B, triángulo). A mayor aumento la fluorescencia pareció estar densamente empacada (C) o en forma de gránulos (D) tapizando las paredes de los vasos cribosos. La barra en A y B equivale a $11.50 \mu\text{m}$; en C y D, $2.95 \mu\text{m}$.

BIBLIOGRAFIA.

- Ayers, et al. (1985) Plant detection of pathogens, in Cooper- Driver et al. (eds.) Chemically mediated interactions between plants and other organisms. Plenum press, New York
- Beakbane, B. et al. (1972) Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. *J. Hort. Sci.* 47:265
- Deeley, J. et al. (1979) Use of Diene's stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 69:1169-1171
- Deutsch, E. and Nienhaus, F. (1983) Further studies on the distribution of mycoplasma-like organisms in different tissues of lethal diseased coconut palms in Tanzania. *J. Plant Dis. Prot.* 90:278-284
- Hall, J.L. (ed.) Electron microscopy and cytochemistry of plant cells, Elsevier, North Holland, 1978
- Németh, M. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Netherlands, 1986
- Nienhaus, F. et al. (1982) Investigations on the etiology of the lethal disease of coconut palm in Tanzania. *J. Plant Dis. Prot.* 89:185-193
- Lin, C.P. and Chen, T.A. (1986) Comparison of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies in detection of the aster yellows mycoplasma-like organism. *Phytopathology* 76:45-50
- Parthasarathy, M.V. (1973) Mycoplasma-like organisms in the phloem of palms in Florida affected by lethal yellowing. *Plant Dis. Repr.* 57:861-862
- Plavsic-Banjac, B. et al. (1972) Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathology* 62:298-299
- Schuiling, M. et al. (1981) The syndrome in coconut palms affected by a lethal disease in Tanzania. *J. Plant Dis. Prot.* 88:665-667
- Thomas, D.L. (1979) Mycoplasma-like bodies associated with lethal declines of palms in Florida. *Phytopathology* 69:928-934
- Thomas, D.L. and Norris, R.C. The use of electron microscopy for lethal yellowing diagnosis. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 93:196-199