

T. Prov. 16/84



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ... 26-01-96  
ENTRADA NUM. ... 167

T  
16  
33

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

SECCION DE BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZACION BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE  
TRIPANOSOMÁTIDOS AISLADOS EN CULTIVOS  
SUBTROPICALES DEL SURESTE ESPAÑOL**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**GRANADA**  
Nº Documento 619680582  
Nº Copia 121229697

**María del Carmen Fernández Becerra**

**Granada  
1996**

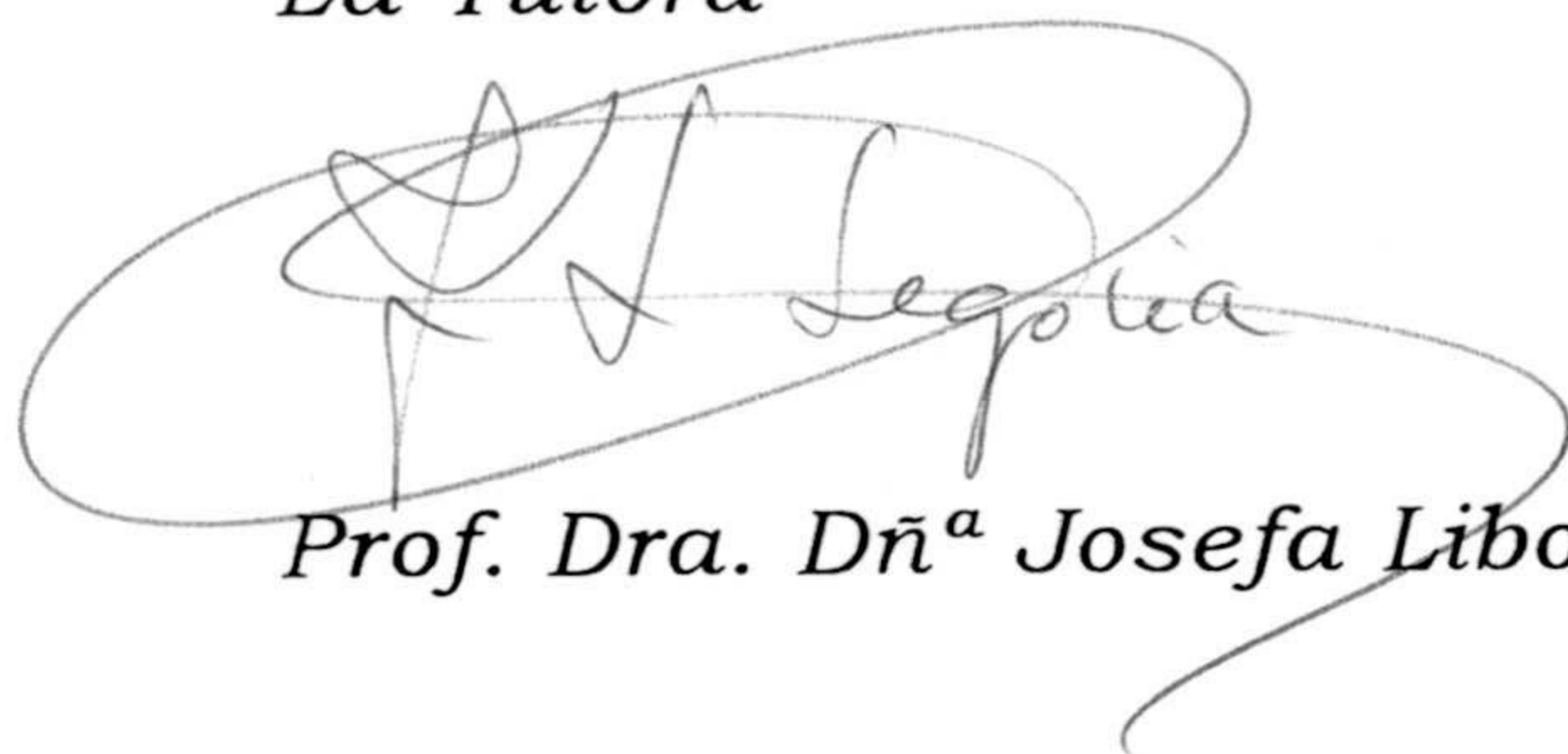
*Tesis Presentada para optar al Grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas, por la Licenciada  
M<sup>a</sup> DEL CARMEN FERNÁNDEZ BECERRA*

*Los Directores del Trabajo*



*Prof. Dr. D. Manuel Sánchez Moreno & Prof. Dr. D. Antonio Osuna  
Carrillo de Albornoz*

*La Tutora*

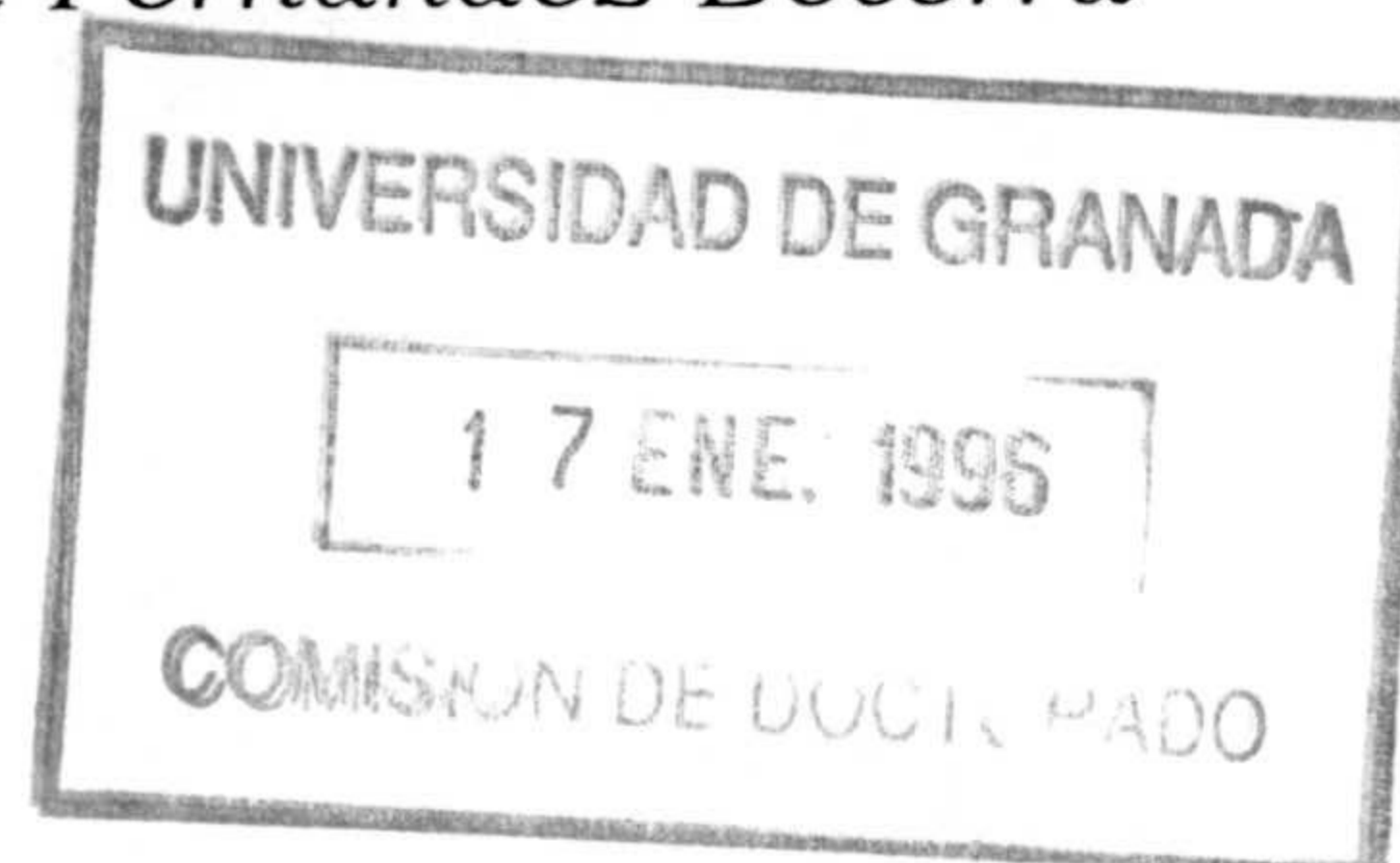


*Prof. Dra. D<sup>ña</sup> Josefa Liboria Segovia Parra*



*M<sup>a</sup> del Carmen Fernández Becerra*

*Granada, Enero de 1996*





Los trabajos de investigación expuestos en la presente memoria titulada «CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE TRIPANOSOMÁTIDOS DE PLANTAS AISLADOS EN CULTIVOS SUBTROPICALES DEL SURESTE ESPAÑOL», han sido realizados en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, bajo la supervisión de los Drs. D. Manuel Sánchez Moreno y D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.

Granada, Enero de 1996

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'F' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Fdo.: Dr. Dn. Fermín Sánchez de Medina Contreras

Capítulo 1	2
1. Introducción General	2
1.1. Antecedentes históricos	2
1.2. Posición taxonómica y nomenclatura	3
1.3. Relación parásito hospedador	6
1.3.1. En el látex.	6
1.3.2. En el floema	7
1.3.3. En los frutos	7
1.4. Transmisión y ciclo de vida	8
1.4.1. Transmisión	8
1.4.2. Ciclo de vida.	9
1.5. Patogenicidad	11
1.6. Distribución geográfica	13
Capítulo 2	15
2. Aislamiento, Cultivo In Vitro y Estudio Ultraestructural de Tripanosomátidos Aislados de <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Annona cherimolia</i>	15
2.1. Introducción	15
2.2. Material y métodos	16
2.2.1. Recolección de muestras	16
2.2.2. Procesamiento de las muestras	16
2.2.3. Obtención axénica de los primocultivos	17
2.2.4. Cultivo in vitro y preservación de los aislados	17
2.2.4.1. Subcultivos sucesivos	18
2.2.4.2. Criopreservación	18
2.2.4. Observación a microscopía electrónica	19
2.2.4.1. Microscopía electrónica de transmisión	19
2.2.4.2. Estudio a microscopía electrónica de barrido	20
2.2.5. Infección experimental	21
2.3. Resultados y discusión	21
2.3.1. Sintomatología de los cultivos	21
2.3.2. Morfología y ultraestructura	24
2.3.3. Infección experimental	31
Capítulo 3	33
3. Caracterización de los Tripanosomátidos Aislados de <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Annona cherimolia</i>	33
3.1. Introducción	33
3.2. Material y métodos	35
3.2.1. Material biológico empleado	35
3.2.1.1. Origen de los aislados	35



3.2.1.2. Cultivo in vitro y obtención de cultivos en masa	35
3.2.2. Tests de aglutinación con lectinas	36
3.2.3. Análisis isoenzimático por isoelectroenfoque.	37
3.2.4. Análisis del kDNA mediante enzimas de restricción	40
3.2.4.1. Aislamiento del DNA del kinetoplasto	40
3.2.4.2. Digestión con enzimas de restricción y electroforesis.	42
3.3. Resultados y discusión	43
3.3.1. Tests de aglutinación con lectinas	43
3.3.2. Analisis isoenzimático.	45
3.2.3. Analisis del kDNA por endonucleasas de restricción.	47
Capítulo 4	51
4. Aspectos Comparativos Sobre el Metabolismo Energético de los Tripanosomátidos	
Aislados de <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Annona cherimolia</i>	51
4.1. Introducción	51
4.2. Material y métodos	54
4.2.1. Organismos ensayados	54
4.2.2. Preparación de las muestras y espectroscopía de RMN H <sup>1</sup> .	
Identificación de los metabolitos.	54
4.2.3. Fraccionamiento celular	55
4.2.4. Preparación de las partículas mitocondriales y estudios de	
respiración	56
4.2.5. Determinaciones enzimáticas	57
4.3. Resultados y discusión	57
4.3.1. Productos finales del metabolismo de carbohidratos	57
4.3.2. Actividades enzimáticas y fraccionamiento celular	60
4.3.3. Estudios de respiración mitocondrial	63
Capítulo 5	66
5. Conclusiones	66
Capítulo 6	68
6. Bibliografía	68

# Introducción General



## Capítulo 1

### 1. Introducción General

#### 1.1. Antecedentes históricos

Fué por casualidad, en 1909, cuando el equipo del Dr. Lafont descubrió un protozoo flagelado en el látex de una Euphorbiacea mientras llevaba a cabo un estudio sobre las supuestas propiedades medicinales de *Euphorbia pilulifera* (Lafont, 1909; Lafont, 1910). Debido a su morfología y organización celular, Lafont sugirió su clasificación entre los tripanosomátidos, género *Leptomonas*, asignándole el nombre de *Leptomonas davidi*, en honor a David, el técnico que las descubrió. Pero fué Donovan en el mismo año, quien propuso que en vista no solo de su morfología, (la cual es apreciablemente diferente a la de otros géneros de la misma familia) sino especialmente debido a sus hospedadores, había de crearse un nuevo género, surgiendo así el género *Phytomonas*.

Poco después, en 1916, Migone descubre flagelados en el látex de *Araujia angustifolia* (familia Asclepiadaceae), durante una investigación de campo en busca de reservorios de *Trypanosoma vivax*. Pero, tras inyectar el látex de esta planta en animales de laboratorio, con el fin de demostrar que se trataba de dicho tripanosomátido de animales, no consiguió resultados positivos. Por tanto, la mayoría de las primeras investigaciones estaban estimuladas por la esperanza, vana, de que las plantas fuesen reservorios de hemoflagelados de humanos, o animales.

Durante los años posteriores a este descubrimiento, aparecieron diversos artículos, anunciando la presencia de estos tripanosomátidos en plantas laticíferas, principalmente en zonas tropicales de todo el mundo, pero sin atraer demasiado la atención de los fitopatólogos. En 1925, apareció la primera publicación sobre estos

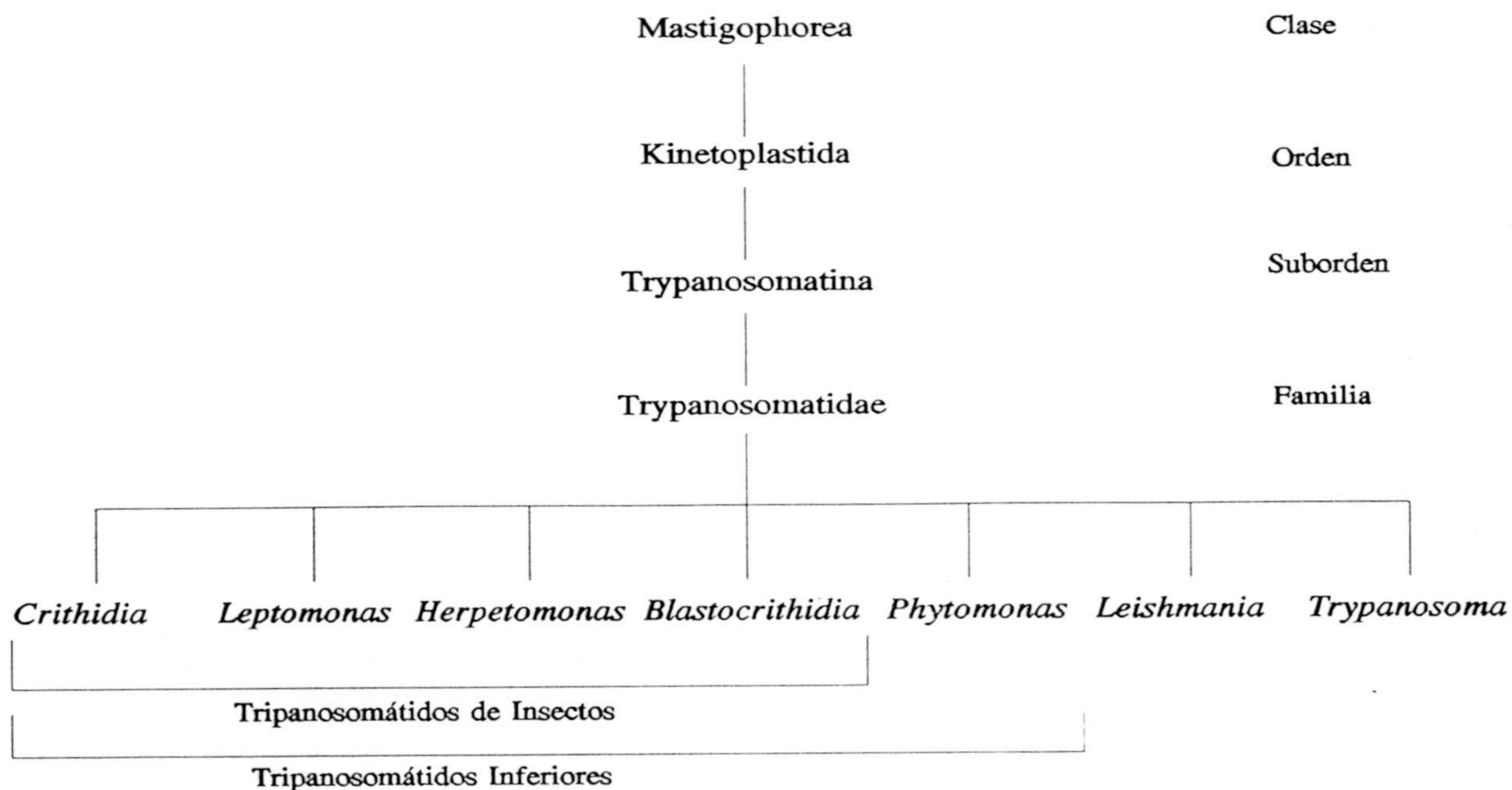


flagelados de plantas en una revista especializada, "Phytopathology Journal" (Holmes, F. O., 1925). En 1931, Stahel descubrió *Phytomonas* que dañaban los tubos cribosos de los árboles de café en Surinam, pero con la disminución de los cultivos de café en dicha región, desaparecieron los estudios sobre el tema.

Pero no fue hasta 1976, cuando realmente atrajeron el interés de los especialistas, con el descubrimiento y asociación de tales organismos a dos enfermedades de la palmera, la enfermedad de hartrot en el cocotero (Partha-sarathy y col., 1976), y la marchitez en la palmera aceitera (Dollet y col., 1977).

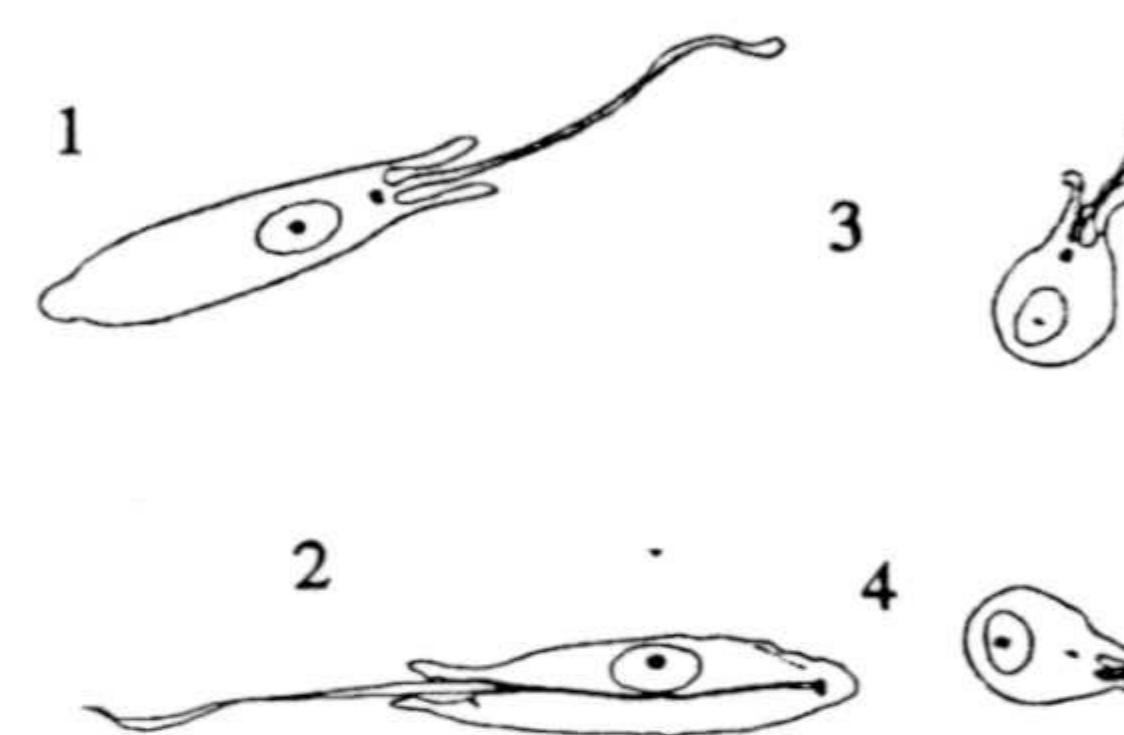
### 1.2. Posición taxonómica y nomenclatura

Debido a su morfología y características ultraestructurales, los protozoos uniflagelados de plantas se clasifican en el subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae (Molyneux & Ashford, 1983):





Los protozoólogos los han incluido en el grupo de los tripanosomátidos inferiores, el cual no es un taxón formal, que agrupa a los tripanosomátidos de invertebrados y de plantas. El criterio utilizado para designar a estos géneros, depende en gran parte de la morfología de los organismos y de la posición relativa del núcleo y kinetoplasto. Según el cual nos encontramos con la siguiente clasificación (Vickerman, 1976): (1) Promastigote: forma alargada con kinetoplasto, anterior al núcleo, de cuya base nace el flagelo que emerge en el polo anterior. (2) Opistomastigote: formas alargadas con kinetoplasto, posterior al núcleo, cercano al cual nace el flagelo, que atraviesa todo el cuerpo celular para emerger por el extremo anterior. (3) Coano-mastigote: forma parecida a la promastigote pero bastante más corta y redondeada, con el kinetoplasto, situado, también, en las proximidades y generalmente anterior al núcleo, emergiendo el flagelo en el extremo anterior. (4) Amastigote: forma redondeada que no presenta un flagelo externo.



Las *Phytomonas* se pueden encontrar en la planta en forma promastigote mayoritariamente, y con menor frecuencia amastigote y coanomastigote (Dollet, 1994).

Como ya se ha mencionado, el nombre de *Phytomonas* fué propuesto por Donovan (1909) para designar al organismo que Lafont había descubierto y denominado como *Leptomonas davidi*, por presentar características iguales a las de los miembros del género *Leptomonas* (o *Herpetomonas*, según ciertos autores), denominación que se continuó utilizando hasta la aceptación, hoy en día generalizada del nombre propuesto por Donovan. Actualmente algunos investigadores han propuesto incluso que los nombres de especies estén basados principalmente en el tipo de hospedador (Wallace y cols., 1992). Actualmente se reconocen 12 especies, agrupándose según la familia hospedadora:



Espece	Referencia	Hospedador
<i>P. davidi</i>	Lafont, 1909	<i>E. pilulifera</i> (Euphorbiacea)
<i>P. francai</i>	Aragão, 1927	<i>Manihot esculentum</i> (Euphorbiacea)
<i>P. tirucalli</i>	Reichenow, 1940	<i>E. tirucalli</i> (Euphorbiacea)
<i>P. elmassiani</i>	Migone, 1916	<i>Araujia angustifolia</i> (Asclepiadacea)
<i>P. bordasi</i>	Franca, 1921	<i>Morrenia odorata</i> (Asclepiadacea)
<i>P. ficuum</i>	Fantham, 1925	<i>Ficus edulis</i> (Urticaceae)
<i>P. ganorae</i>	Franchini, 1931	<i>Ficus hochstetteri</i> (Urticaceae)
<i>P. bancrofti</i>	Holmes, 1931	<i>Ficus opposita</i> (Urticaceae)
<i>P. tortuosa</i>	Ruiz, 1958	<i>Ficus costarricana</i> (Urticaceae)
<i>P. leptovisorum</i>	Stahel, 1931	<i>Coffea liberica</i> (Rubiaceae)
<i>P. staheli</i>	McGhee, 1979	<i>Cocos nucifera</i> (Palmae)
<i>P. serpens</i>	Gibbs, 1957	<i>Lycopersicum esculentum</i> (Solanaceae)

Sin embargo, el hecho de que los flagelados existan en diferentes hospedadores no significa que sean distintos, ya que tripanosomátidos aislados de ciertas especies de plantas pueden infectar experimentalmente otras especies. Tampoco el criterio morfológico es concluyente, puesto que un mismo flagelado puede presentar una morfología diferente cuando se inocula en otra planta (Conchon, 1989, McGhee, 1971; Hanson 1966).

Por tanto, sigue existiendo gran arbitrariedad a la hora de nombrar y clasificar a los distintos aislados, y aunque hoy día pueden ser identificados por métodos moleculares, que facilitan la caracterización, la mayoría de los investigadores prefieren referirse a ellos como *Phytomonas* spp., a la espera de métodos más discriminativos,



antes de crear nuevas especies (Dollet, 1984; Conchon, 1989; Jankevicius, 1988; Attias, 1986; Kastelein, 1988).

Según una revisión realizada recientemente por Dollet (1994), hasta que no se lleve a cabo un análisis de toda la información sobre un gran número de aislados, se mantienen las recomendaciones hechas en 1987 sobre clasificación y nomenclatura. Así, cada nuevo aislado debe ser identificado por el nombre del hospedador, país de aislamiento, año en el que se realizó, e iniciales del autor (Dollet & Wallace, 1987).

### 1.3. Relación parásito hospedador

Con los conocimientos que existen hasta la fecha, basados en el número de aislados estudiados, se confirma que existen tres tipos de tripanosomátidos en plantas: flagelados de tubos laticíferos, tripanosomátidos intrafloemáticos y aquellos que se localizan en frutos (Dollet, 1994).

#### 1.3.1. En el látex.

Las *Phytomonas* de plantas laticíferas son las más conocidas. En estas plantas se han encontrado principalmente en el látex, pero también han sido observadas en el xilema y espacios intercelulares (Dollet y col., 1983).

En el látex se encuentran distribuídas por todos los órganos de la planta: raíces, tallos, ramas, flores y frutos, maduros e inmaduros (Aragao, 1927; Migone, 1916; Rodhain, 1911). La infección puede ser sistémica, pero a menudo permanece localizada en una o más ramas, a causa de la organización de los tubos laticíferos (Franca, 1914). Se han detectado principalmente en el látex de las siguientes familias: Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Moraceae, Urticaceae, Apocynaceae y Compositae.



Está generalmente aceptado, que la mayoría de estos aislados no son patógenos, aunque hay discordancia en los trabajos sobre el efecto de las *Phytomonas* en las plantas laticíferas. Franca (1914), observó que el latex de plantas infectadas estaba más diluído y con menor contenido en almidón, que el de las plantas sin infectar. Sin embargo, la mayoría de los autores no encuentran una patogenicidad clara, y sólo la infección de la mandioca por *P. francai* está considerada como patógena (Aragão, 1927).

### 1.3.2. En el floema.

Se han descrito varios casos de tripanosomátidos intrafloemáticos, (en cafetales, cocoteros y palmerales). En todos ellos, los flagelados se localizan específicamente en los tubos cribosos del floema, y son transportados por la savia, a todos los organos de la planta (Dollet, 1991). Dada su composición (azúcares, vitaminas, proteínas) y sus características fisicoquímicas (alta presión osmótica), la savia es un medio vital para la planta, y la presencia de estos parásitos da lugar a una clara patogenicidad en las plantas hospedadoras.

### 1.3.3. En los frutos.

Las *Phytomonas* han sido también localizadas en varios frutos, entre ellos el tomate (Gibbs, 1957; Conchon y col., 1989). Recientemente nuestro grupo ha detectado y aislado *Phytomonas* de frutos de tomate y chirimoyo, (Monestier y cols, 1992; Fernández-Becerra y cols., 1993). En los frutos, se localizan en la pulpa o bien bajo la piel, en áreas cercanas a huellas de picaduras de insectos. Además, se ha observado, que mediante inoculación experimental, especies de tripanosomátidos inferiores como (*Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*) pueden multiplicarse en el fruto de plantas de tomate (Conchon y col., 1989). He aquí otra evidencia clara de que los trypanosomatidos, por ser aislados de plantas, automáticamente no tienen porque



pertenecer al género *Phytomonas*.

#### 1.4. Transmisión y ciclo de vida

##### 1.4.1. Transmisión

Se sospechaba la transmisión de estos flagelados por insectos, como ruta natural de infección.

Transmisión en plantas laticíferas: hemípteros de la familia Lygaeidae y Coreidae, son los vectores probables de las *Phytomonas* en plantas laticíferas. Los flagelados se encontraron, tanto en los insectos como en las plantas de las cuales se alimentaban, coincidiendo además con la aparición de la enfermedad.

En la siguiente tabla se describen los principales insectos implicados en la transmisión de *Phytomonas* en plantas laticíferas:

Insecto	Planta Hospedadora	Referencia
<i>Stenocephalus agilis</i> (C)	<i>Euphorbia pinea</i> (E)	Dollet, 1982
<i>Dieches humilis</i> (L)	<i>E. hirta</i> (E)	Bouet, 1911
<i>Nysius euphorbiae</i> (L)	<i>E. hypericifolia</i> (E)	Lafont, 1911
<i>Oncopeltus cingulifer</i> (L)	<i>Asclepias fruticosa</i> (A)	Ayala, 1975
<i>O. cingulifer</i> (L)	<i>A. curassavica</i> (A)	Ayala, 1975
<i>O. fasciatus</i> (L)	<i>A. curassavica</i> (A)	Hanson, 1966
<i>O. fasciatus</i> (L)	<i>A. syriaca</i> (A)	Hanson, 1966
<i>O. unifasiatellus</i> (L)	<i>A. curassavica</i> (A)	Ayala, 1975
<i>O. unifasiatellus</i> (L)	<i>A. fruticosa</i> (A)	Ayala, 1975
<i>Pachybrachius bilobatus</i> (L)	<i>E. hirta</i> (E)	McGhee, 1982

(C): Coreidae, (L): Lygaeidae, (P): Pentatomidae, (E): Euphorbiaceae, (A): Asclepiadaceae.



Transmisión en el floema: las *Phytomonas* intrafloemáticas en las palmeras, son transmitidas por pentatómidos del género *Lincus*. Desmier de Chenon (1984), encontró *Lincus* spp. sobre la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) en Ecuador. Aunque las chinches fueron encontradas sobre palmeras sanas, los árboles infectados comenzaban a enfermar después de 2 ó 3 meses. También los árboles alejados del foco de infección terminaban enfermando, al encontrarse expuestos a las chinches procedentes de árboles afectados.

Distintos experimentos llevados a cabo por Asgarali y Ramkalup, (1985) y Louise (1986), demostraron que determinadas especies de *Lincus* estaban implicadas en la transmisión de *Phytomonas* en los cocoteros. Los vectores conocidos son *L. croupius* y *L. lamelliger* así como *L. vandoesburgi*. Resende y col. (1986), en un único experimento con árboles transplantados en una caja, demostraron que *Lincus lobulliger* transmitía *P. staheli* en Brasil. Stahel (1931), ya sospechaba que insectos de este género eran los vectores que afectaban a las plantas de café.

Transmisión en los frutos: en 1957, Gibbs demostró que la transmisión de *P. serpens* en el tomate, era realizada por el Pentatómido, *Nezara viridula*. Jankevicius y col. (1989) ha descrito la transmisión y desarrollo de *P. serpens* en frutos de tomate. Su trabajo se ha desarrollado bajo unas condiciones totalmente controladas, utilizando plantas e insectos mantenidos en el laboratorio. Tras cultivar los flagelados in vitro, infectaron plantas por picadura de insectos infectados (*Phthia picta*), por exposición a los propios organismos cultivados, y por exposición a los insectos infectados experimentalmente.

#### 1.4.2. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *Phytomonas* ha sido descrito en cinco estudios. Franca (1920), describió el primero, *P. davidi* en *Euphorbia peplus* y en el insecto



*Stenocephalus agilis*. Holmes (1930) y McGhee & Hanson (1964) describieron el ciclo de vida de *P. elmassiani* en el látex de *Asclepias*, y en el insecto *Oncopeltus fasciatus*.

Vickerman (1962) propuso otro ciclo para *P. elmassiani* en *Pergularia extensa* y en *Oncopeltus famelicus*. El más reciente ha sido descrito por Jankevicius y col. (1989), relacionando a *P. serpens* en el tomate con la chinche *Phthia picta*.

Estos cinco estudios coinciden en la mayoría de los aspectos tratados. La principal diferencia, es que McGhee y Hanson (1964), reconocieron que las formas de *Phytomonas* observadas en el insecto, eran distintas de *Leptomonas oncopelti*. Mientras que otros autores atribuían etapas de la coinfección de *Leptomonas*, (principalmente la formas quísticas), a *Phytomonas*.

La descripción que damos sobre el ciclo de vida está tomada de los autores citados anteriormente. En el látex, *P. elmassiani* presenta una longitud media de  $13.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$ , es aquí donde tiene lugar la división y se pueden observar algunas formas amastigotas. En el insecto, después de cuatro días, se encuentran en el píloro formas similares a la de las plantas, pero no se observa división.

A partir del sexto día, se ve un aumento de la longitud de los organismos. En el día 10 se observan formas gigantes, (alcanzan hasta  $80 \mu\text{m}$  en longitud), en el píloro, y también en el hemocele. Tras dos semanas, las formas gigantes son encontradas en las glándulas salivares, después de 20 días pueden también observarse otras formas más pequeñas. A partir de 26 días, solo se observan las formas pequeñas, con un cuerpo alargado y sin flagelo, siendo aproximadamente del mismo tamaño que aquellas que aparecen en el látex de la planta. La ruta de migración hacia el hemocele y las glándulas, aun no ha sido determinada. Las formas pequeñas son las etapas metacíclicas, que serán inyectadas en la planta hospedadora.



### 1.5. Patogenicidad

Inicialmente, hubo gran controversia en relación con la patogenicidad de las *Phytomonas* en plantas laticíferas, siendo entonces aceptado que no producían daños en la mayoría de las plantas (Holmes, 1925; Rhodain, 1911). Más tarde, sin embargo, se demostró que en algunas plantas de importancia económica, tales como café, mandioca, cocotero y palmera aceitera, la infección por *Phytomonas* podría tener consecuencias devastadoras (Camargo y col, 1990).

Actualmente se aceptan tres enfermedades de plantas donde las responsables son las *Phytomonas*:

a) Enfermedad del café (*necrosis del floema*). Esta enfermedad, causada por *Phytomonas leptovascularum*, fué descrita por primera vez en Surinam (Stahel, 1931). Se caracteriza por una clorosis progresiva y caída de las hojas, causando la muerte del árbol aproximadamente en un año, aunque en formas agudas de la enfermedad éste periodo de tiempo puede ser reducido hasta dos meses. La patología de la infección se caracteriza por la proliferación de las células del cambium en las raíces y tallos, así como deposición de calosa en células del floema, produciendo de esta manera la muerte del árbol.

Esta enfermedad también ha sido detectada en Colombia, Guayana, y noreste de Brasil. Las principales especies de café conocidas por ser susceptibles a la enfermedad son: *Coffea liberica*, *C. arabica*, *C. excelsa*, *C. stenophylla* y *C. abeocutae*.

b) Enfermedades de la palmera. En la palmera aceitera (*marchitez sorpresiva*, Dollet, 1977) y en el cocotero (*hartrot*, Parthasarathy, 1976), la infección con *Phytomonas staheli* conduce a una clorosis progresiva de las hojas más viejas, mientras que los frutos se desprenden y las inflorescencias se secan. Con el curso de la enfermedad, las



hojas jóvenes también comienzan a pudrirse desde la base hacia el ápice. Finalmente, cae la copa completa, dejando el tronco desnudo (Parthasarathy y Slobbe, 1978). Se pueden observar gran número de flagelados en los tubos cribosos de estas palmeras, produciendo un taponamiento en la placa cribosa, que impide la circulación de nutrientes (Parthasarathy y Van Slobbe, 1978; Van Slobbe y col., 1978).

La enfermedad es prevalente en sur y centro América, donde las siguientes especies son susceptibles a *Phytomonas*: *Elaeis quineensis* (palma aceitera), *Cocos nucifera* (cocotero), *Attalea funifera*, *Caryota mitis* y *Roystonea regia* (Van Slobbe y col., 1978).

c) Enfermedad de la mandioca. Conocida también como *chochamento das raices*. La presencia de *Phytomonas* en esta planta, fue puesta de manifiesto por primera vez por Aragão en 1927, pero la enfermedad no fue reconocida como tal hasta 1986 (Kitajima y col., 1986). Está causada por *Phytomonas francai*, y se caracteriza por una clorosis de las partes aéreas de la planta, y una acusada atrofia de las raíces. Se observa una considerable disminución en la producción de almidón. Los flagelados son abundantes en el látex de plantas enfermas, y en cortes de tejido son fácilmente observados en los vasos laticíferos.

d) Flagelados que infectan frutos. La infección por tripanosomátidos fue descrita por primera vez en frutos de tomate (Gibbs, 1957), extendiéndose posteriormente a otros frutos comestibles, tales como granadas, melocotones, guayabas y mandarinas. Pero, aún no está claro si realmente son parásitos de frutas, o simplemente invasores oportunistas, ya que en la mayoría de los frutos se detectan pocos flagelados. Sin embargo, el tomate, parece ser el único en el que *P. serpens* son notoriamente abundantes (Jankevicius y col., 1989).



*Phytomonas* spp., también han sido detectadas en las semillas de algunas leguminosas (Jankevicius, 1989), pero se desconoce su patogenicidad en dichos cultivos.

Se puede concluir este capítulo, haciendo una distinción clara entre, tripanosomátidos asociados específicamente a un síndrome patológico, en los que incluimos a todos los flagelados intrafloemáticos, y algunos de frutos, y tripanosomátidos sin efecto patológico (¿simbiontes?), que incluiría a la mayoría de las *Phytomonas* de plantas laticíferas, al no presentar síntomas patológicos. Aunque en este último caso se han descrito dos excepciones, una en *E. lasiocarpa*, (presentando deformación y defoliación de la planta), pero, en este caso las *Phytomonas* también estaban presentes en el xilema y en los espacios intercelulares. La otra excepción corresponde a la enfermedad de la mandioca, descrita anteriormente, y en la que algunos autores creen que dicha infección posiblemente sea una mezcla entre tripanosomátidos y virus (Dollet y Gargani, 1989).

### 1.6. Distribución geográfica

Los tripanosomátidos de plantas predominan principalmente en zonas tropicales y subtropicales, aunque se han descrito en todos los continentes, excepto en la Antártida. En Europa, se han encontrado *Phytomonas* infectando principalmente euphorbiaceas, y han alcanzando latitudes de hasta 50° norte (Podlipaev, 1986).

En norteamérica, se han encontrado varias especies de *Asclepias* infectadas con *P. elmassiani* también a altas latitudes. Es interesante saber cómo estos parásitos pasan el invierno, ya que el vector no hiberna, y estas plantas se degeneran por las raíces. McGhee y McGhee (1971) estudiaron este aspecto, concluyendo, que el parásito vive continuamente en Florida, y migra hacia el norte cada verano con el vector. Otra posibilidad no excluida, es que el parásito sobreviva en otro vector.



**Aislamiento, Cultivo In Vitro y Estudio  
Ultraestructural de Tripanosomatidos  
aislados de *Lycopersicum esculentum* y  
*Annona cherimolia***



## Capítulo 2

### 2. Aislamiento, Cultivo In Vitro y Estudio Ultraestructural de Tripanosomátidos Aislados de *Lycopersicum esculentum* y *Annona cherimolia*

#### 2.1. Introducción

Se sabe desde 1909 (Lafont, 1909) que las plantas pueden ser parasitadas por miembros de la familia trypanosomatidae, particularmente por especies del género *Phytomonas*, el cual fue creado por Donovan (1909) para diferenciar a los tripanosomátidos de plantas de aquellos que parasitan animales. *Phytomonas* spp. viven en el látex, sabia, tubos cribosos, y frutos de muchas especies de plantas (Parthasarathy y col., 1976; Dollet, 1984; Conchon y col., 1989). En un principio hubo gran controversia en relación a la patogenicidad de las *Phytomonas* en plantas. Inicialmente se pensó que estos protozoos parásitos no eran especialmente perjudiciales, pero la evidencia de que un gran número de plantas, de gran importancia económica, estén afectadas, tales como café, mandioca (1931), cocotero (Parthasarathy et al., 1976), y palma (Dollet, 1984), ha demostrado que las infecciones por *Phytomonas* pueden tener consecuencias económicas devastadoras.

La infección de plantas de tomate por estos tripanosomátidos fue demostrada por primera vez por Gibbs en 1957, pero no ha sido hasta recientemente, cuando se ha reconocido que estos parásitos pueden infectar otro tipo de frutas, tales como granada, pera, guayaba y mandarina (Conchon y col., 1989). Los flagelados son muy abundantes en frutos de tomate, y en algunos cultivos de la variedad Sherry, más del 50% de los frutos se encontraban parasitados (Jankevicius y col., 1989). Presentan una amplia distribución geográfica, incluyendo el norte y centro de África, y varias ciudades europeas como Francia, la recién formada Eslovaquia y las Federaciones Rusas



(Camargo y col., 1990).

En este capítulo describimos a dos nuevos flagelados aislados de frutos de tomate y de chirimoyo cultivados en el sureste español, más concretamente en la región de Andalucía. Tras aislarlos y cultivarlos *in vitro*, se han llevado a cabo estudios ultraestructurales e infecciones experimentales en frutos sanos de tomate.

## **2.2. Material y métodos**

### **2.2.1. Recolección de muestras**

Se recolectaron muestras tanto de zonas vegetativas, así como frutos de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y chirimoyo (*Annona cherimolia*). Los primeros procedían de invernaderos, mientras que en el segundo caso se trataba de cultivos externos. Este muestreo se realizó en la franja costera del sureste español, que incluye las provincias de Málaga (Finca experimental «La Mayora»), Granada (Almuñecar) y Almería (Estación experimental «Las Palmerillas»; Quash: Tierras de Almería).

### **2.2.2. Procesamiento de las muestras**

Una vez que las muestras fueron recolectadas en el campo, se transportaron al laboratorio donde se prepararon para su posterior procesamiento en ambiente de esterilidad.

El primer paso consistió en el lavado, con abundante agua, de las distintas secciones de la planta que iban a ser procesadas. Tras lo cual se procedió a la desinfección externa, mediante su inmersión primero en metanol (2 ó 3 minutos) y posteriormente en Armil® (1:1000) durante el mismo periodo de tiempo.



En un segundo paso, trabajando ya en cámara de flujo laminar (ambiente de esterilidad), se tomaron pequeñas secciones de los frutos, raíces, tallos y hojas, las cuales fueron homogeneizadas en tampón fosfato salino (PBS) y posteriormente examinadas en fresco por microscopía de contraste de fase. Las muestras sospechosas de ser positivas fueron fijadas en metanol y teñidas con una solución al 5% de Giemsa tamponada a pH 7.0 durante 15 min, para ser más tarde observadas a microscopía óptica.

### **2.2.3. Obtención axénica de los primocultivos**

Las muestras de fruto en las que se detectó la presencia de tripanosomátidos fueron inoculadas en 3 ml de medio de cultivo Grace (Yunker y col., 1967) suplementado al 10% (v/v) con suero bovino fetal, inactivado previamente a 56 °C durante 30 minutos. Para obtener los primocultivos fue necesaria la adición, en un principio, de una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Gibco®, solución 100X), con el fin de preservar los cultivos de posibles contaminaciones por microorganismos procedentes de la superficie de las muestras vegetales. Por este motivo, así como por la adaptación que deben sufrir los flagelados al medio de cultivo, el crecimiento en estos primeros días es lento, obteniéndose una densidad celular suficiente para realizar un replicaje a partir del día 20 desde la primera inoculación. Una vez conseguidos los cultivos axénicos, los flagelados se mantuvieron en cultivo in vitro a 28 °C, en el medio libre de antibióticos y antimicóticos.

### **2.2.4. Cultivo in vitro y preservación de los aislados**

El mantenimiento in vitro de los parásitos aislados de las plantas, se realiza mediante subcultivos sucesivos, también pueden ser conservados por criopreservación.



#### 2.2.4.1. Subcultivos sucesivos

Las *Phytomonas* fueron mantenidas por subcultivos sucesivos en los medios de cultivo SDM-79 (Brun y Schönenberger, 1979) y Grace. Estos medios son esterilizados, en ambiente estéril (cámara de flujo laminar) por filtración desgerminizante a presión. Para ello se utilizaron filtros estériles de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , tras lo cual fueron suplementados al 10 % (v/v) con suero bovino fetal.

Las *Phytomonas* se mantienen en frascos de cultivo celular de 25 ml a los cuales y siempre trabajando en condiciones de esterilidad, se les añadía mediante pipeta Pasteur 5 ml de medio de cultivo. A continuación se siembran las *Phytomonas* aproximadamente a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/ml, tras lo cual se llevan a una estufa donde se mantendrán a 28 °C. El nuevo pase se realizará 4 ó 5 días después de que se realizara la siembra, tiempo aproximado en el que se alcanza la etapa de crecimiento estacionario. La densidad de crecimiento se determina mediante el conteo de las células en cámara hemocitométrica de Neubauer.

#### 2.2.4.2. Criopreservación

Para la criopreservación se parte de un cultivo líquido de *Phytomonas* con una densidad de crecimiento de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, el cual será transferido a un contenedor estéril de fondo cónico de 25 ml con el fin de concentrar los parásitos, lo cual se lleva a cabo mediante centrifugación a 1.500 g durante 10 min y a temperatura ambiente, posteriormente el sedimento obtenido se resuspende en el medio de cultivo estéril al que se le adiciona un 10% de glicerol. Esta suspensión se pasa a viales de plástico estériles de 1,8 ml, los cuales serán introducidos en un contenedor Cryo 1°C (NALGENE) que será colocado posteriormente en un arcón congelador a -80°C. Dado que el dispositivo contiene alcohol isopropílico, la temperatura desciende a una velocidad de 1°C/min. Las muestras pueden ser almacenadas aquí o bien pueden



ser transferidas a nitrógeno líquido donde el tiempo de conservación es mayor.

La recuperación se lleva a cabo descongelando rápidamente, con lo que evitábamos destrucciones intracelulares debidas a la formación de cristales, y con este fin sumergíamos los viales en un baño termoregulado a 30°C.

#### **2.2.4. Observación a microscopía electrónica**

El protocolo que a continuación se detalla fue puesto a punto y llevado a la práctica, por el personal de la Unidad de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentaciones Científicas de la Universidad de Granada (CIC).

A partir de los cultivos de *Phytomonas* en medio SDM-79 y Grace se colectaron los parásitos en fase exponencial de crecimiento por centrifugación a 1.500 g durante 10 minutos y los sedimentos fueron lavados en tampón fosfato (PBS), estando así ya preparados para su fijación.

##### **2.2.4.1. Microscopía electrónica de transmisión**

La fijación del sedimento se realizó en una solución formada por paraformaldehído con glutaraldehído al 2 % (v/v) en tampón cacodilato 0.05 M (pH=7.4). En esta solución permanece el botón celular durante 2 horas, transcurridas las cuales se sustituye por otra solución de glutaraldehído al 2 % en tampón cacodilato 0.1M, donde se deja durante 8 horas. Una vez cumplido este tiempo, se retira la solución de glutaraldehído y se lava sólo con tampón cacodilato 0.1 M antes de realizar una fijación suplementaria con tetróxido de osmio al 2 % (p/v) y ferrocianuro potásico al 2 % (p/v) durante 2 horas.

Una vez finalizada la fijación, y previo lavado con agua destilada, se procede



a realizar una tinción en bloque con acetato de uranilo al 1 % (p/v) durante 30 minutos. La deshidratación de dicho bloque se realizó en gradientes de etanol, acabando con alcohol absoluto. Como agente intermediario se utilizó óxido de propileno y la infiltración se realizó en resina Spurr, guardando una relación óxido de propileno/resina de 1:1 durante 1 hora. Con posterioridad, se dejó incluyendo en la resina durante unas 12 horas, transcurridas las cuales se polimerizó colocando el bloque a 60°C durante 16 horas. Utilizando un ultramicrotomo Ultracut-E (REICHERT-JUNG), se realizaron cortes ultrafinos de aproximadamente 500 Å, que fueron montados sobre rejillas de cobre, previamente recubiertas por una película de formvar. El procesado finalizó con la tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las rejillas se observaron en el servicio de microscopía de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, utilizando un microscopio EM10C ZEISS.

#### **2.2.4.2. Estudio a microscopía electrónica de barrido**

El primer paso consiste en la fijación de las muestras, para ello se utiliza como fijador glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0.1 M durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se procede al lavado, que se realiza en el mismo tampón, con dos cambios de 30 minutos cada uno de ellos. Las células ya están listas para ser adheridas a un cubreobjetos cubierto con poli-L-lisina al 0.1% (w/v), posfijadas en OsO<sub>4</sub> y deshidratadas en etanol, con gradientes de concentraciones crecientes con cambios cada 20 minutos. Las muestras fueron desecadas por el método de desecación del punto crítico de Anderson (1951), posteriormente se montaron sobre carbón conductor y fueron metalizadas con oro en una unidad Polaron E5000, estando ya listas para su observación en un microscopio DSM 950 Zeiss.



### **2.2.5. Infección experimental**

Usando una jeringa equipada con una aguja 25G5/3 0.5 X 16, frutos de tomate libres de flagelados fueron inoculados justo bajo el pericarpo con 0.1 ml de PBS que contenía aproximadamente  $5 \times 10^4$  flagelados aislados de los frutos de tomate infectados de manera natural y que habían sido mantenidos en medio Grace a 28°C. Los pinchazos producidos por la aguja fueron sellados y los frutos mantenidos a 23°C, hasta su posterior procesamiento a los 10, 14, y 24 días tras la inoculación, donde pequeñas secciones de los mismos fueron homogeneizados en PBS y observados a microscopía de contraste de fase.

## **2.3. Resultados y discusión**

### **2.3.1. Sintomatología de los cultivos**

Durante un muestreo realizado en las provincias de Málaga, Granada y Almería, hemos detectado y aislado tripanosomátidos flagelados en frutos de cultivos de tomate y chirimoyo. Para nuestros propósitos experimentales seleccionamos plantas que presentaban síntomas de una enfermedad indeterminada, así como plantas sin dichos síntomas.

La sintomatología externa de las plantas de tomate variaba, pero en general, presentaban un amarillamiento de las hojas que surgía de la base y se extendía hacia el ápice, algunas hojas caían, pero la mayoría se tornaban amarillas y marchitaban. Los tallos mostraban engrosamiento y necrosis de los nudos, afectando en algunas ocasiones a varios nudos consecutivos, lo que provocaba la rotura de las hojas a nivel del peciolo. Muchos frutos caían antes de madurar. Los vasos se debilitaban progresivamente, seguido en algunas ocasiones por la necrosis del pedúnculo, que podría estar dificultando así el transporte de nutrientes con el consecuente retraso del crecimiento.



En estas plantas de tomate también encontramos otros microorganismos, como hongos (fusarium, anthracnosis, mildium), al menos un micoplasma (stolbur), y cuatro tipo de virus (tomato spotted wilt virus, tomato yellow leaf curl virus, el virus del mosaico del tabaco, y el virus del mosaico del pepino), estando todos ellos quizás implicados en la sintomatología. Los flagelados solo pudieron ser detectados en los frutos, los cuales mostraban deformaciones y alteraciones pigmentarias, «yellow spots», en el pericarpo (Fig. 1).

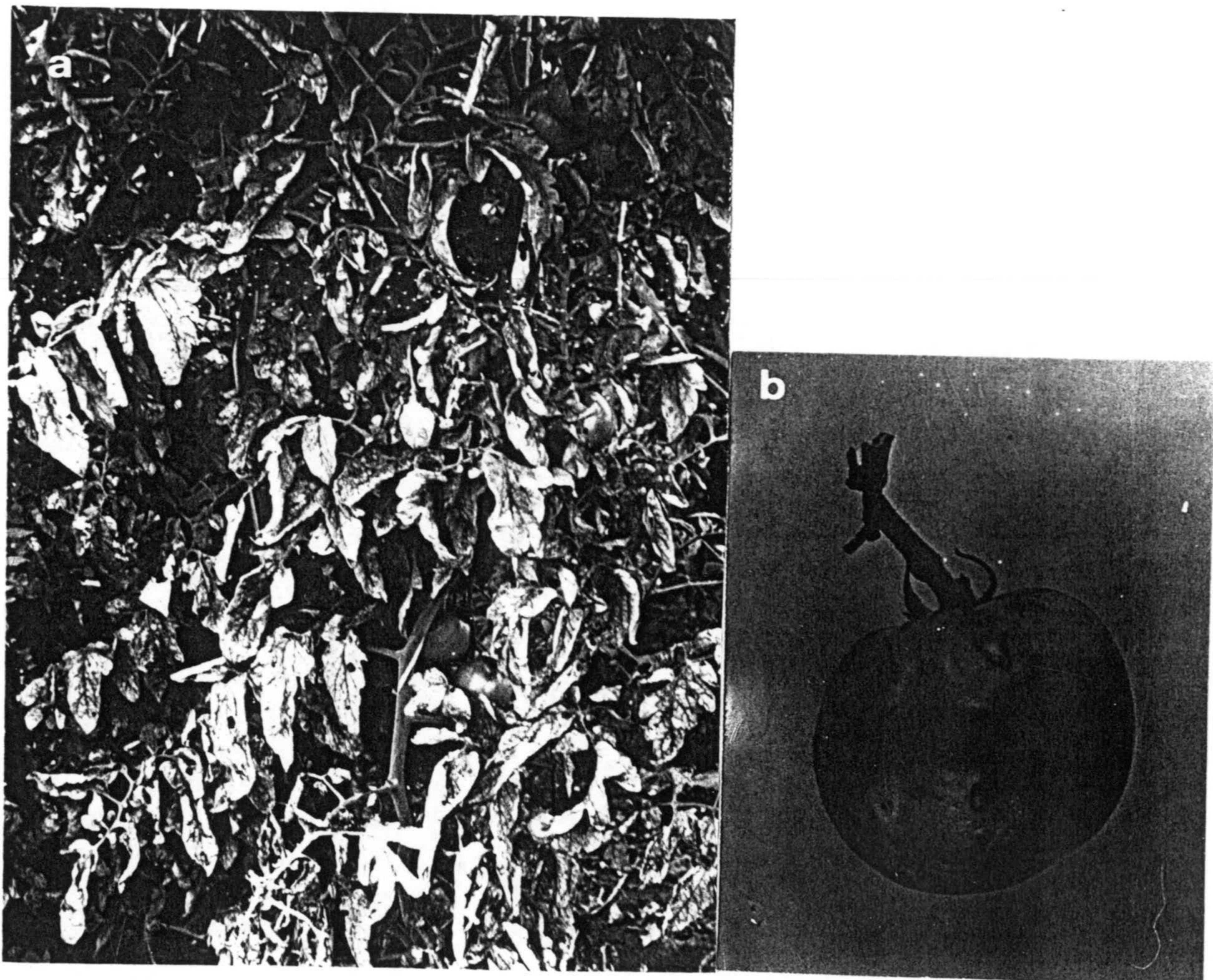


Figura 1. Daños observados en cultivos de tomate. (a) Imagen general de un cultivo de *Lycopersicum esculentum*, mostrando la sintomatología descrita. (b) Detalle del fruto.



Los frutos de chirimoyo mostraban síntomas similares a los del tomate, en general una pseudoclorosis, pérdida de hojas, y una reducción en el número de frutos, los cuales se tornaban amarillos, deformaban y presentaban un tamaño mas pequeño del normal. Como en el caso del tomate, los frutos del chirimoyo tendían a caer antes de madurar. Los tripanosomátidos siempre fueron encontrados en los frutos de las plantas que presentaban esta sintomatología, concretamente justo bajo el pericarpo de las zonas alteradas y raramente en otras areas (Fig 2). Los estudios ultraestructurales mediante microscopía electrónica no revelaban la presencia de flagelados en otras partes de la planta como floema, hojas, tallos u otros tejidos. A diferencia de las plantas de tomate, en el chirimoyo no se detectó la presencia de otros agentes patógenos.

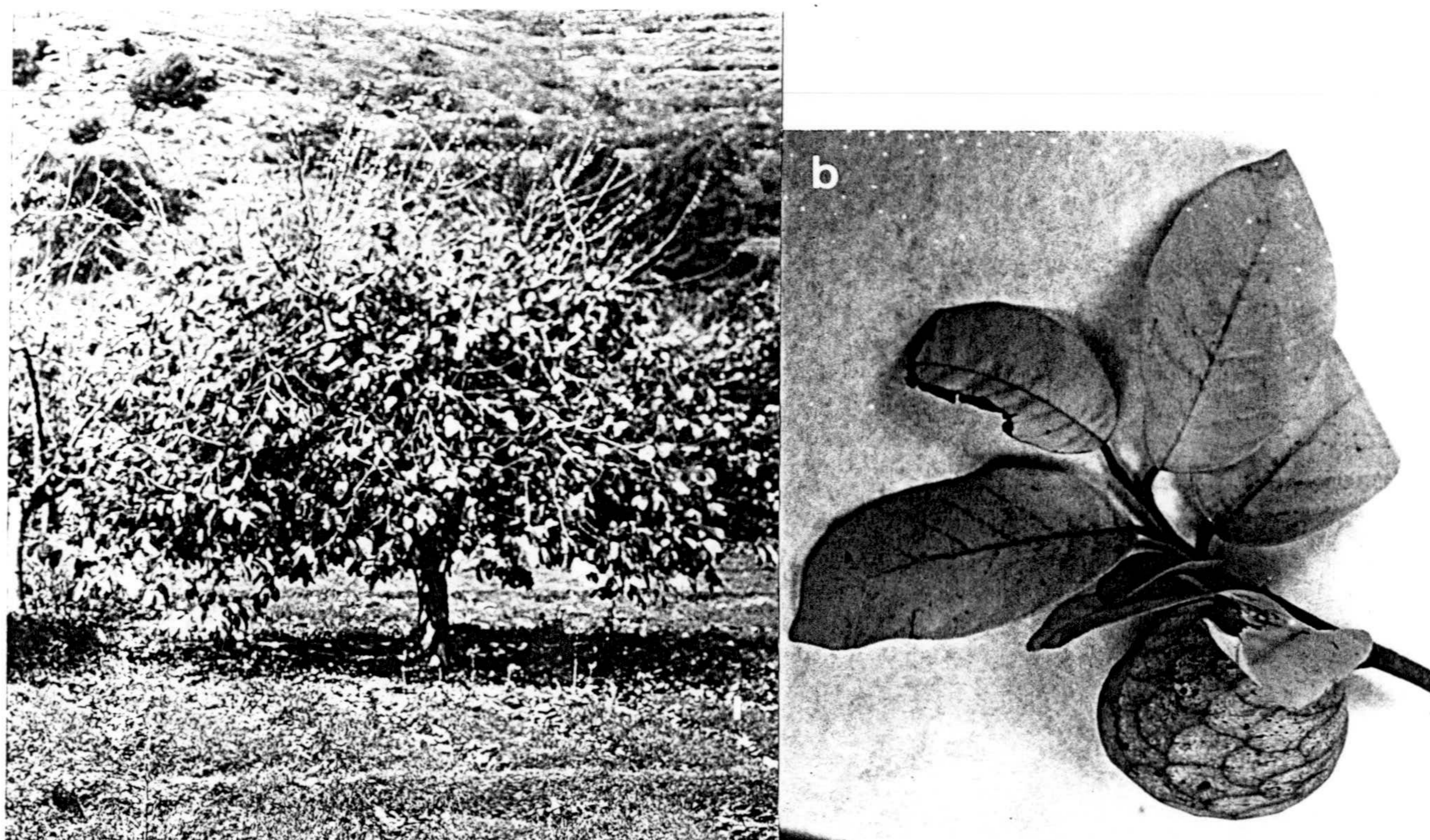


Figura 2. Daños observados en los cultivos subtropicales de Andalucía Oriental. (a) Árbol del cirimoyo. (b) Fruto.



La presencia de flagelados en tomates de Brasil, ya había sido descrita por Kastelein y Camargo (1990), los parásitos fueron detectados siempre en el jugo de los frutos y en cantidades no muy elevadas. Nosotros, sin embargo, hemos detectado cantidades significativas en los frutos de ambos frutos. Fig. 2 Aquí fotos de los cultivos de chiri y detalle del fruto

### 2.3.2 Morfología y ultraestructura

Al teñirse con Giemsa y ser observados a microscopía óptica, los flagelados aislados de frutos de tomate y chirimoyo aparecían siempre con forma promastigote. El cuerpo relativamente corto (6-15  $\mu\text{m}$ ), la mayoría presentaban flagelo, aunque también se detectaron formas sin él. Sin embargo, no se encontraron formas largas y torsionadas, comunes en otros aislados de *Phytomonas* (Parthasarathy y col., 1976; Kitajima y col., 1986; Attias y col., 1988). Se sabe no obstante, que el parásito de tomate *P. serpens*, es altamente polimórfico durante su ciclo de vida, presentando tanto formas promastigotes largas y torsionadas, así como cortas (Jankevicius y col., 1989), similares a las que encontramos en los frutos de tomate y chirimoyo (Fig. 3).

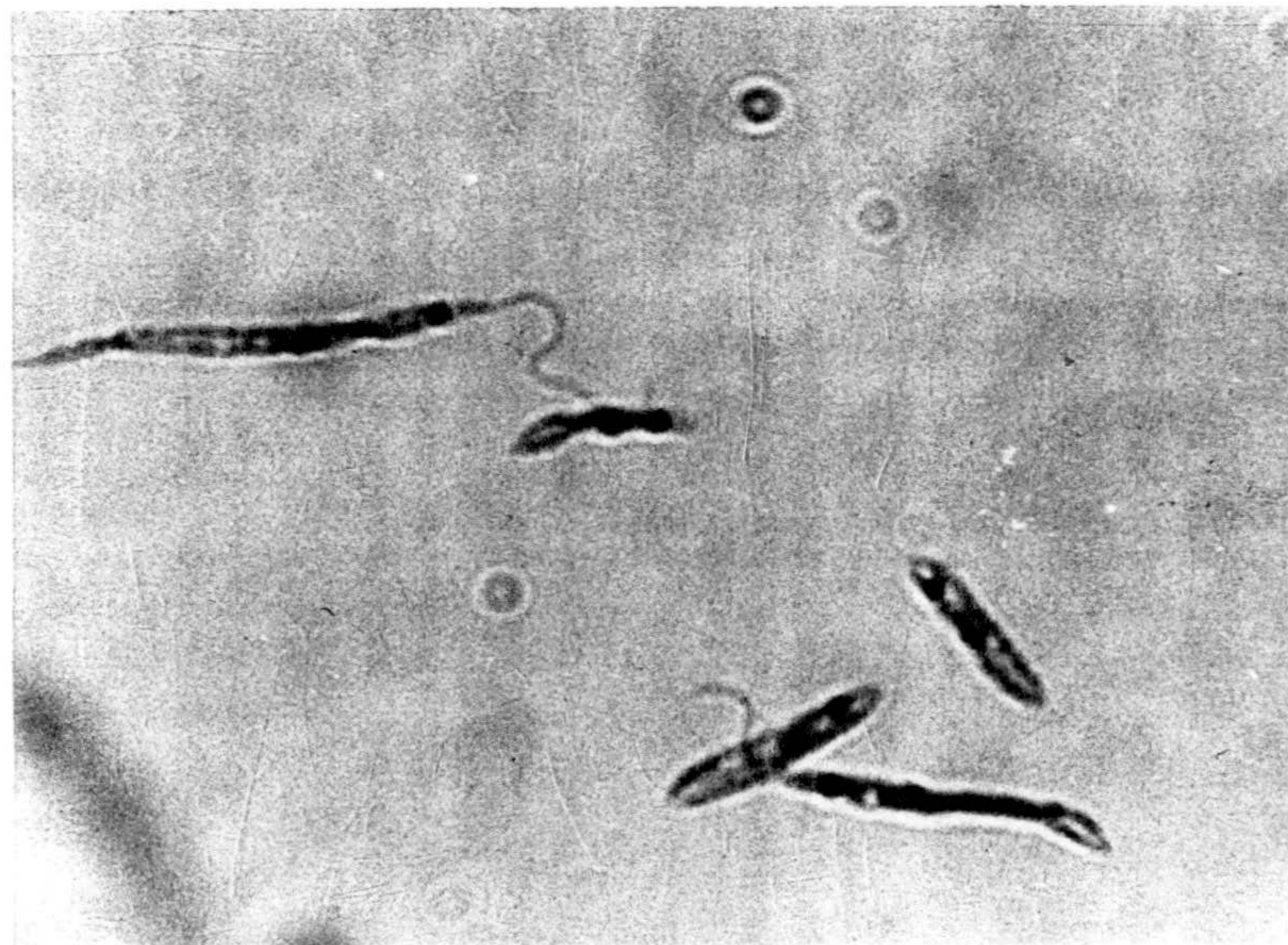


Figura 3. Formas en cultivo de los tripanosomátidos aislados del fruto de tomate. Tinción de Giemsa. (1250x).



En los primeros intentos para cultivar los flagelados usando los medios monofásicos Grace y SDM-79, el crecimiento fue lento, aunque la movilidad del parásito era perceptible después de unas horas en cultivo. Tras la segunda o tercera resiembra, los parásitos proliferaban bastante bien, y tras 20 pases se alcanzaron densidades de crecimiento cercanas a  $5 \times 10^7$  células/ml en la fase estacionaria de crecimiento, aproximadamente en el quinto día de cultivo, tras lo cual empieza a decrecer ligeramente.

Los experimentos de cultivo in vitro mostraron que una vez que las *Phytomonas* se habían adaptado a ambos medios de cultivo, todos los parásitos desarrollaban la forma promastigote alargada con cuerpo torsionado y largo flagelo, aunque también se observaban formas no torsionadas. Los flagelados aislados de frutos de chirimoyo presentaban una morfología similar a los de tomate, con una longitud celular entre 7-11  $\mu\text{m}$ , mientras que la longitud media de los flagelos para ambos casos fue de 7-9  $\mu\text{m}$  (Fig. 4.). Estas formas y tamaños son similares a las descritas por otros autores para especies aisladas de frutos de tomate (Jankevicius y col., 1989).

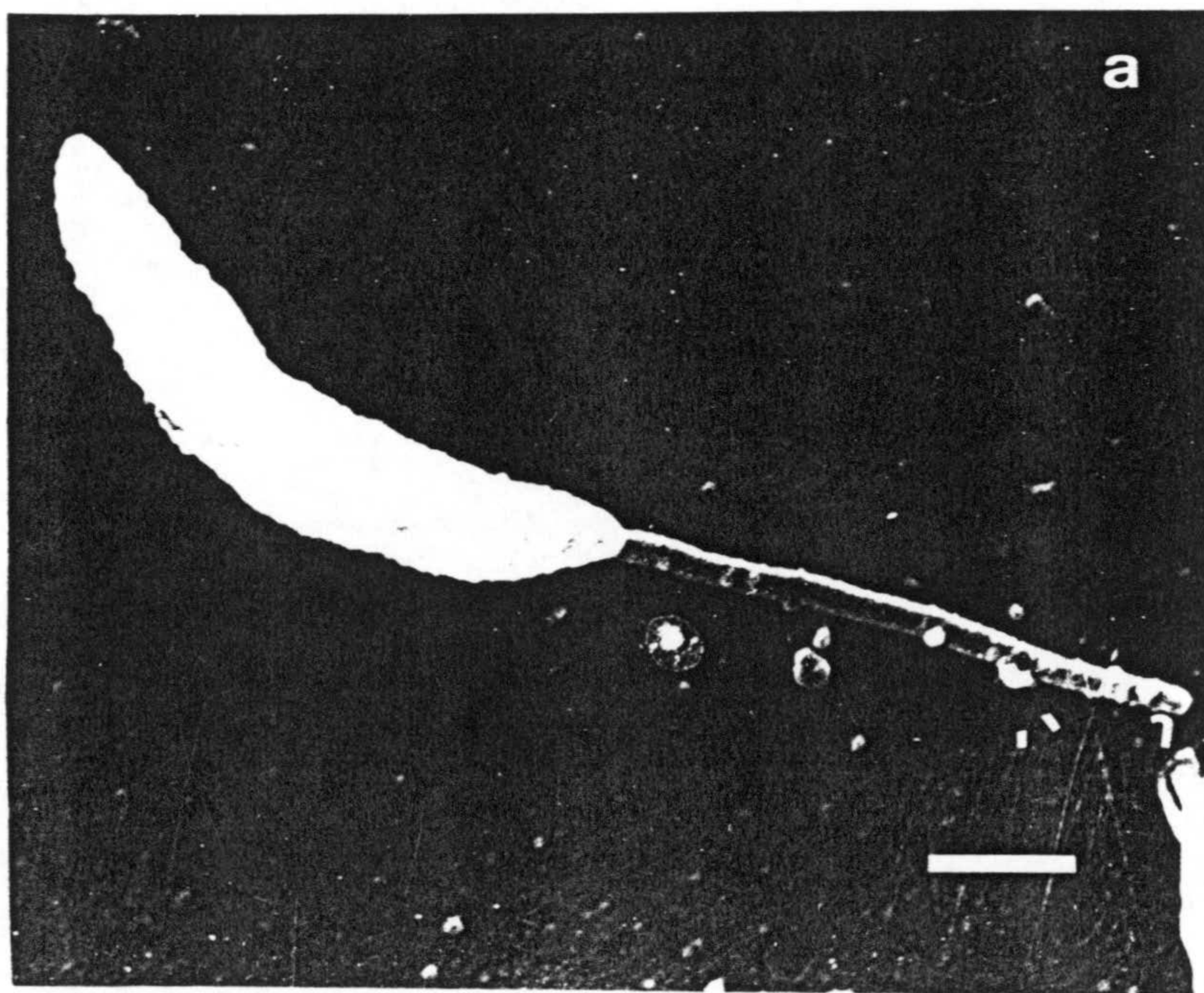
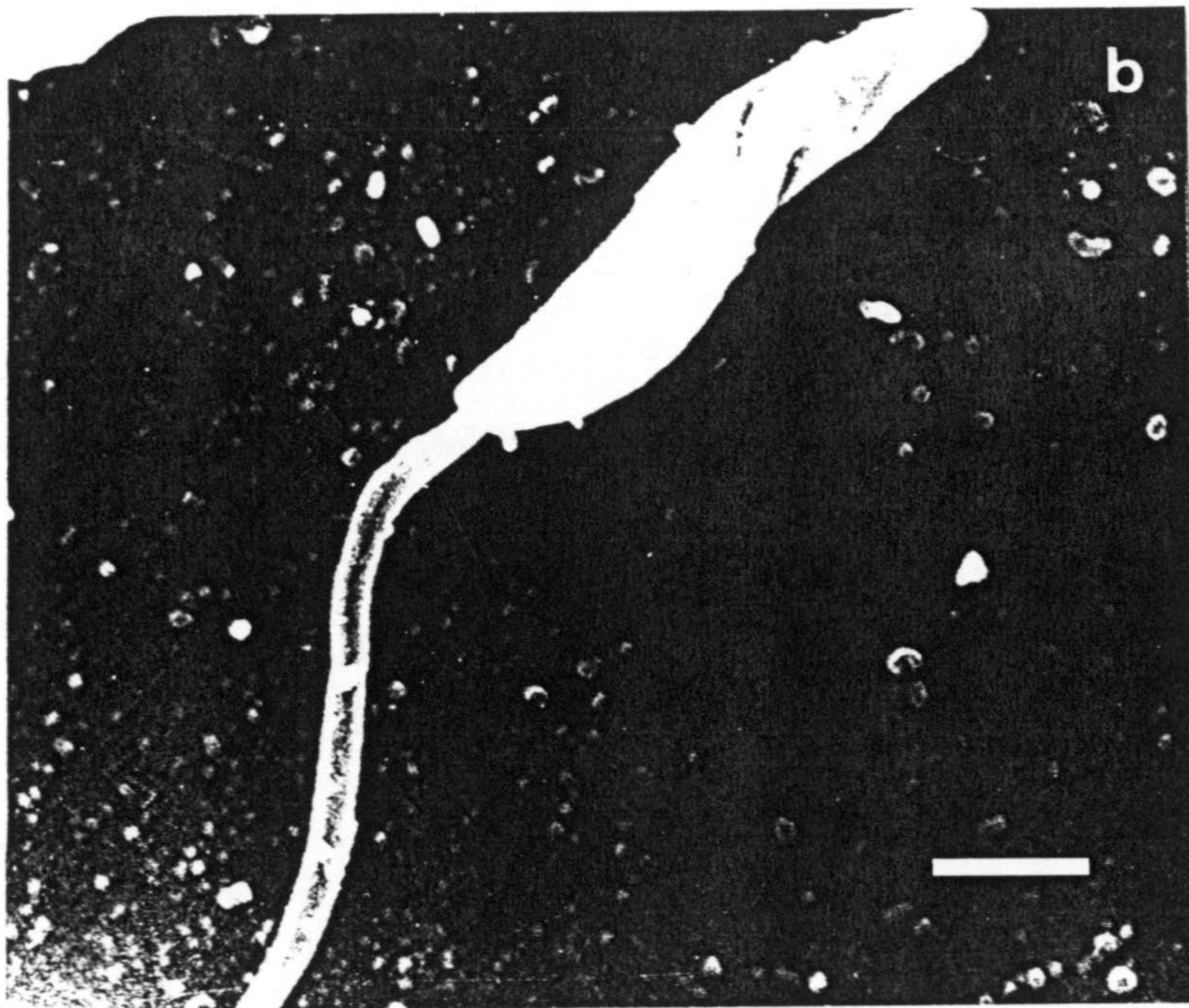


Figura 4. Formas detectadas mediante Microscopía electrónica de barrido, de *Phytomonas*. (a) Aislados de tomate.





(b) Aislados de chirimoyo. (Barra = 2  $\mu$ m).

Usando microscopía electrónica de transmisión, detectamos la forma típica promastigote en todas las preparaciones. Estas formas mostraban un patrón ultraestructural general, propio o característico en otros kinetoplastidos, y que básicamente incluye una membrana pelicular rodeada uniformemente por una hilera de microtúbulos subpeliculares, una mitocondria y un kinetoplasto. Presenta también un núcleo con doble membrana con poros y un nucléolo. En un extremo del cuerpo celular aparece una bolsa flagelar de donde emerge el único flagelo y un axonema. (Fig. 5, 6).

Igualmente se observó una gran abundancia de ribosomas muchos de ellos ligados al retículo endoplasmático (RE). Dentro de la familia trypanosomatidae, normalmente el RE no está muy desarrollado y está distribuido por todo el citoplasma (Linder y Staehelim, 1980). Esta característica no fue totalmente compartida por nuestros aislados, donde el RE se localizaba principalmente bajo la membrana subpelicular de microtúbulos (Fig. 7). Aunque en el caso de los tripanosomátidos de tomate también se distribuían por todo el cuerpo celular (Fig. 8, 9). Las dos unidades



de membrana en algunas zonas estaban separadas siendo visible el espacio intermembranoso.

Al igual que todos los tripanosomátidos estudiados hasta la fecha, nuestros aislados presentaban glicosomas (Opperdoes, 1987), de tamaño variable y distribuidos por todo el citoplasma. En el caso de los flagelados procedentes de los frutos de tomate, los glicosomas se distribuyen por toda la célula y presentan generalmente una forma redondeada (Fig. 11), aunque en algunas ocasiones se presentan en forma de halterio (Fig. 8), algo parecido a lo descrito por Santos-Padron y de Souza (1982) para *Leptomonas samueli*, pero claramente distintos de los descritos en *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia hyssopifolia* y *E. characias* (Attias y col., 1988). En el caso de los aislados de chirimoyo, los glicosomas son morfológicamente más regulares, electrodensos, y con frecuencia agrupados (Fig. 7). A pesar de no haber hecho estudios morfométricos, si podemos deducir del análisis de las microfotografías, que como en el caso de *Phytomonas* aisladas de *E. characias* (Sanchez-Moreno y col., 1992), nuestros aislados presentan gran número de glicosomas. Siendo este hecho de gran interés, por estar estos orgánulos directamente implicados en el metabolismo energético del parásito.

Examinando el citoplasma de los aislados de tomate, encontramos vacuolas lipídicas agrupadas (Fig. 11), semejantes a las descritas por Attias y col. (1988) y Jankevicius y col. (1989) en *Phytomonas* aisladas de *E. francai* y *P. serpens*, respectivamente. También observamos vacuolas de tamaño variable y contenido amorfo. En las preparaciones procedentes de los aislados del chirimoyo vimos muy pocas vacuolas lipídicas (Fig. 7).

En la mayor parte de las preparaciones, observamos secciones de la mitocondria en la periferia celular, cerca de los microtúbulos subpeliculares (Fig. 10), así como en zonas mas internas. La matriz mitocondrial se presenta muy electrodensa. La región



donde se aloja el kinetoplasto presentaba generalmente una forma alargada, adaptada al tamaño de este orgánulo, aunque en los aislados de tomate la región que contiene al kinetoplasto tiende a ser mas grande y extenso que en el caso de los flagelados de chirimoyo.

La mayoría de los tripanosomátidos estudiados presentan una red de DNA del kinetoplasto compacta, presentándose algunas veces como dos platos paralelos (de Souza 1984; Parthasarathy y col., 1976; Attias y col., 1988). En las microfotografías de los flagelados de tomate observamos el DNA del kinetoplasto y con un aspecto mas relajado, no tan compacto como el que presenta los aislados de chirimiyo (Fig. 7 y 10) así como las *Phytomonas* aisladas de *E. hyssopifolia* y *E. franaci*; aunque fue muy similar al encontrado en *Phytomonas* aisladas de *E. characias* (Attias y col., 1988).

En cuanto al núcleo, los aislados de frutos de tomate lo presentan en forma oval, en posición más o menos central con un nucleoplasma muy electrodense y un solo nucléolo central (Fig. 11). En casi todas las muestras era apreciable un espacio entre las dos membranas nucleares. En el caso del chirimoyo el nucleoplasma fue menos electrodense, aunque también estaba situado centralmente y con un solo nucléolo (Fig. 12).

En el trabajo de Attias y col. (1988), describen un nucleoplasma mas claro en el caso de los aislados de *E. hyssopifolia* y ocasionalmente presentaban una región vacía, mientras que las *Phytomonas* aisladas de *E. characias* presentaban un nucleoplasma más parecido al de nuestros aislados, aunque la membrana nuclear mas compacta que nuestras preparaciones.



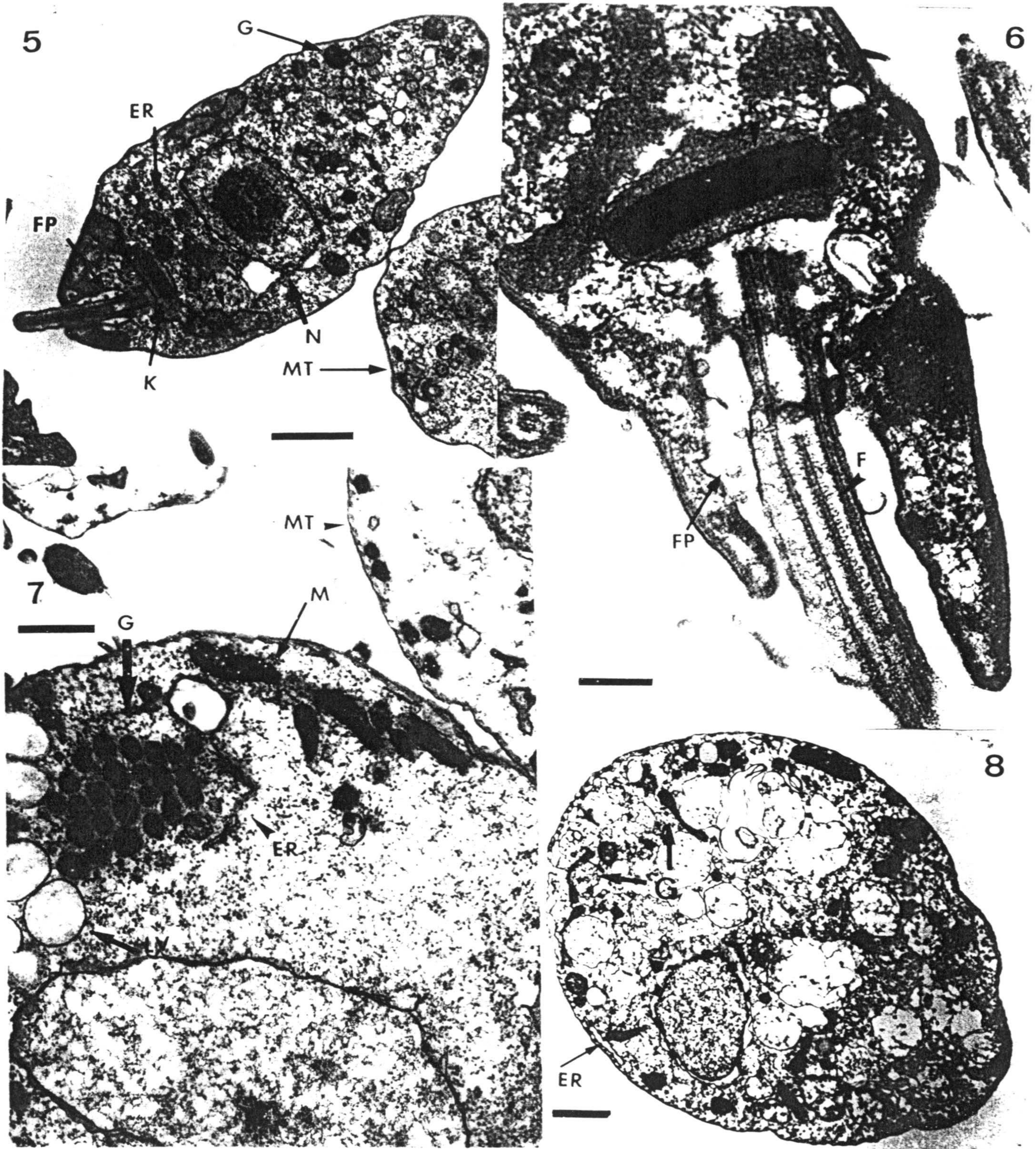
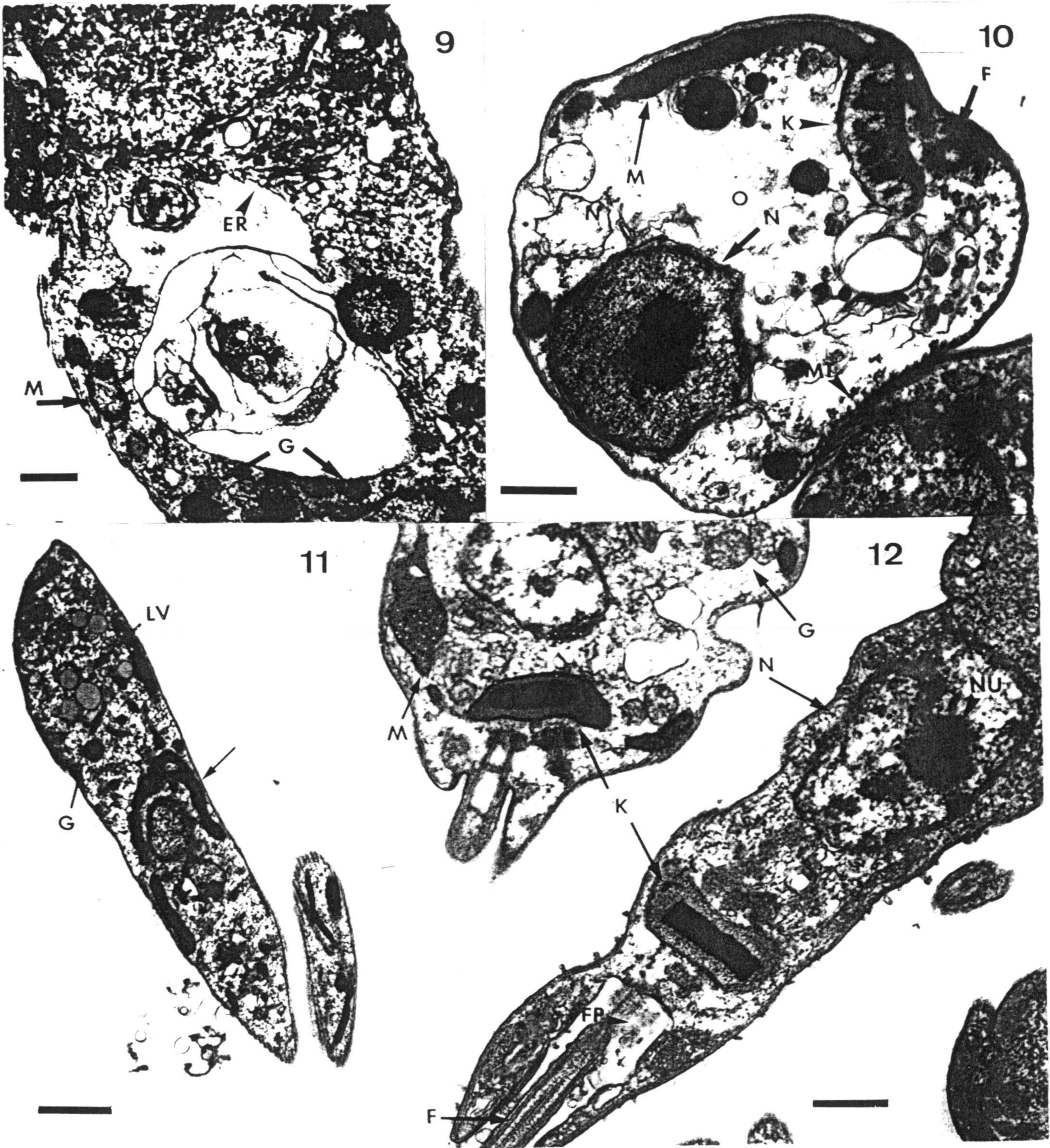


Figura 5-12. Cortes microfinos de *Phytomonas* en cultivo axenico. Figs. 5, 8-11: *Phytomonas* del fruto de tomate (figs. 5, 11 barra =  $1\mu\text{m}$ ; fig. 8, 10 barra =  $0,6\mu\text{m}$  y fig. 9 barra =  $0,233\mu\text{m}$ ). Figs. 6, 7 y 12: *Phytomonas* aisladas del fruto del chirimoyo (fig. 6 barra =  $0,233\mu\text{m}$ ; figs. 7, 12 barra =  $0,6\mu\text{m}$ ).





(MT) Microtubulos peliculares. (M) Mitochondria. (K) Kinetoplasto. (N) Nucleo. (NU) Nucleolo. (F) Flagelo. (FP) Bolsa flagelar. (R) Ribosoma). (ER) Retículo Endoplasmático. (G) Glicosomas. (LV) Vacuolas lipídicas.



### 2.3.3. Infección experimental

Para verificar que los flagelados aislados de frutos de tomate y cultivados in vitro no perdían su capacidad infectiva, fueron inoculados en frutos de tomates sanos. A los 10, 14, y 20 días postinoculación se tomaron muestras, encontrando abundantes flagelados en las zonas cercanas al punto de inoculación, también se detectaron distribuidos por otras zonas más alejadas aunque en menor cantidad. Los flagelados aislados de los frutos infectados experimentalmente en el laboratorio, fueron morfológicamente idénticos a los aislados de los tomates infectados de manera natural.

La descripción de nuevas especies de *Phytomonas* han estado basadas tradicionalmente en su morfología y el origen del hospedador, pero estos criterios hoy día son considerados insuficientes para la identificación de tripanosomátidos (Conchon y col., 1989), es necesaria adicionar a estos conocimientos mayor información a nivel bioquímico y biológico como criterios más sólidos para la identificación taxonómica (Wallace y col., 1983).

Para diferenciar los trypanosomatidos que hemos aislado en los frutos de tomate y chirimoyo de otros flagelados considerados como miembros del género *Phytomonas*, hemos utilizado algunas de estas técnicas, que serán expuestas en el siguiente capítulo.





**Caracterización de los  
Tripanosomátidos aislados de  
*Lycopersicum esculentum* y *Annona  
cherimolia***



## Capítulo 3

### 3. Caracterización de los Tripanosomátidos Aislados de *Lycopersicum esculentum* y *Annona cherimolia*

#### 3.1. Introducción

La descripción de nuevas especies de *Phytomonas* ha estado basada tradicionalmente en las características morfológicas y en el origen del hospedador de las mismas. Pero hoy día, estos criterios se consideran insuficientes para la clasificación de los tripanosomátidos (Wallace y col., 1983). Además, el hecho de que estos flagelados parasiten diferentes plantas hospedadoras, no significa necesariamente que sean distintas especies parásitas, más aun cuando se sabe que un tripanosomátido aislado de una planta puede ser infectado experimentalmente, y colonizar, otra especie de planta distinta (Hanson y col., 1966).

Como hemos mencionado, entre estos posibles métodos de caracterización nos encontramos con la aglutinación por lectinas, usada ya con éxito por Petry y col. (1987) en la diferenciación de *Phytomonas* sp. de algunos tripanosomátidos inferiores como (*Herpetomonas*, *Crithidia*). En estudios previos (Gueugnot y col., 1976, 1980; Petavy y col., 1978) habían utilizado esta técnica en la diferenciación de otros tripanosomátidos como *Leishmania tropica* y diferentes especies de *Crithidia*.

En términos generales, los estudios isoenzimáticos han sido de gran valor en genética humana y en diagnósticos clínicos (Marmor y col., 1979), pero también la separación de isoenzimas mediante electroforesis, es un procedimiento ampliamente extendido en la identificación de tripanosomátidos y otros protozoos (Gonçalves de Lima y col., 1982). Este criterio ha sido igualmente usado para la caracterización, así como en estudios de variabilidad de los flagelados de plantas (Guerrini y col., 1992;



Muller y col., 1994).

Como todos los miembros de la familia trypanosomatidae, las *Phytomonas*, poseen una única mitocondria que presenta una estructura especial denominada kinetoplasto, compuesto por DNA muy concentrado (kDNA) (Riou y col., 1987). Este DNA se organiza en una red compleja, formada por dos tipos de moléculas circulares y encadenadas entre si. Por una parte nos encontramos con los maxicírculos, moléculas que se presentan en bajo número y cuya función es similar a la del DNA mitocondrial de otros eucariotas (Borst & Hoeijmakers, 1979), y principalmente con los minicírculos, los cuales codifican pequeñas moléculas de RNA, denominados "guide RNA", implicadas en la edición del RNAm mitocondrial (Sturm & Simpson, 1990). Los minicírculos de las especies de tripanosomátidos tienen propiedades diferentes, y los perfiles de restricción obtenidos tras la digestión del kDNA mediante endonucleasas, ha sido utilizado con éxito en la caracterización e identificación de varios tripanosomátidos de plantas (Ahomadegbe y col., 1992; Sa-Carvalho y col., 1993).

Recientemente, y como se ha descrito en el capítulo anterior, nuestro grupo de trabajo ha conseguido aislar y cultivar in vitro, flagelados de frutos de tomate y chirimoyo en el sureste español (Sánchez-Moreno y col., 1995). En el presente capítulo se describe la caracterización de los mismos, comparados con otras cepas de *Phytomonas* ya descritas, mediante el empleo de las siguientes técnicas: tests de aglutinación con lectinas, perfil isoenzimático según el punto isoeléctrico, así como por el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del kDNA, usando diferentes endonucleasas.



## 3.2. Material y métodos

### 3.2.1. Material biológico empleado

#### 3.2.1.1. Origen de los aislados

Para llevar a cabo el trabajo expuesto en el presente capítulo, sobre la caracterización de los tripanosomátidos aislados de frutos de *Lycopersicon esculentum* (tomate) y de *Annona cherimolia* (chirimoyo), se emplearon además otras cepas de *Phytomonas* aisladas de distintos hospedadores; tres de ellas de origen laticífero, plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, así como un aislado de origen floemático, agente causante de la enfermedad de Hartrot. El origen exacto y las características del aislamiento de las distintas muestras empleadas vienen reflejadas en la siguiente tabla.

Tabla 1.

AISLADOS	HOSPEDADOR	FECHA AISLAMIENTO	LOCALIDAD (PAIS)	REFERENCIA
EC1	<i>Euphorbia characias</i>	1982	Montpellier / Francia	Dollet, 1984
Ehi-In	<i>E. hirta</i>	1988	Hyderabad / India	Petry y col., 1989
Ehy-Gu	<i>E. hyssopifolia</i>	1986	Guayana Francesa	Petry y col., 1989
Hart1	<i>Cocos nucifera</i>	1987	Saut Sabbat / G.F.	Menara y col., 1988
Tom	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1992	Almería / España	Sanchez-M. y col., 1995
Che	<i>Annona cherimolia</i>	1993	Almuñecar / España	Sanchez-M. y col., 1995

#### 3.2.1.2. Cultivo in vitro y obtención de cultivos en masa

El mantenimiento de las cepas en el laboratorio se realizó mediante cultivos sucesivos y por criopreservación, ambos métodos detallados en el capítulo 1



(apartado 1.2.4). El cultivo in vitro de todas las cepas utilizadas en los ensayos que posteriormente se relatan, se realizó en medio Grace suplementado al 10% con suero bovino fetal inactivado (SBFI), y cultivados en estufa a 28°C.

Para la obtención de un número de parásitos adecuado, para llevar a cabo los estudios isoenzimáticos, se tomaron de cada una de las muestras 25 ml de medio de cultivo cuya densidad celular fue aproximadamente de  $2 \times 10^7$  células/ml, centrifugados a 1500 g x 10 min, finalmente lavados dos veces en tampón fosfato salino y congelados a -20°C hasta su utilización.

En los estudios del kDNA se requiere una densidad celular mayor, y es por eso que los parásitos fueron concentrados por centrifugación de 300 ml de medio de cultivo, en las mismas condiciones, y con una densidad celular similar a la descrita en el párrafo anterior. Tras el crecimiento en un medio adecuado, las células son lavadas dos veces por centrifugación con solución salina isotónica o SSC (0.15 M NaCl, 0.015 citrato sódico, pH 7.3) y una vez con tampón SE (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0). Antes de la centrifugación el número total de células es determinado tomando una alícuota de la suspensión, diluyendola con tampón fosfato 20 mM, pH 7.4, conteniendo 1% formaldehído y contando en cámara de Neubauer. Es aconsejable partir de  $10^9$  células como mínimo. El pellet conteniendo un número conocido de células puede ser procesado inmediatamente o bien ser almacenado a una Temperatura de -20°C, hasta su uso.

### 3.2.2. Tests de aglutinación con lectinas

Los siguientes organismos fueron ensayados: dos cepas de *Phytomonas* de origen laticífero, (EC1 y Ehy). Un flagelado intrafloemático (Hart1), y los dos aislados en frutos de tomate y chirimoyo.



Las lectinas utilizadas en esta experiencia fueron suministradas por la casa comercial Boehringer, y vienen listadas en la siguiente tabla:

Tabla 2.

Lectinas	Origen	Carbohidrato específico
Concanavalina A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>	$\alpha$ -D-Man, $\alpha$ -D-Glu
Germen de Trigo (WGA)	<i>Triticum vulgare</i>	$(\beta(1-4)D\text{-GluNAc})_{4>3>2}$ D-GluNAc
Soja (SBA)	<i>Glycine max</i>	$\alpha$ -D-GalNAc $\beta$ -D-GalNAc
Lenteja (LCH)	<i>Lens culinaris</i>	$\alpha$ -D-Man $\alpha$ -D-Glu $\alpha$ -D-GluNAc
Cacahuete (PNA)	<i>Arachis hypogea</i>	$\beta$ -D-Gal(1-3)-D-GalNAc
Ricino (RCA I)	<i>Ricinus communis</i>	$\beta$ -D-Gal $\alpha$ -D-Gal
Ulex (UEA I)	<i>Ulex europaeus</i>	$\alpha$ -L-Fucosa

Las lectinas fueron usadas a una concentración final de 250  $\mu$ g/ml, disueltas en tampón fosfato (PBS). De cada una de las lectinas se tomaron 50  $\mu$ l que fueron mezclados con un volumen igual de la suspensión de flagelados (con una densidad de  $2 \times 10^7$  cel/ml) en placas de microtitulación. Después fueron incubados durante 1 y 3 horas a temperatura ambiente, y la aglutinación fue estimada por observación a microscopía óptica de las muestras. El grado de aglutinación fue determinado sobre una escala subjetiva, cuyo rango va de negativo (-) a positivo (+, ++, +++) de acuerdo con lo propuesto por Zubiaur y Alonso (1985).

### 3.2.3. Análisis isoenzimático por isoelectroenfoque.

Los flagelados obtenidos según describimos en el apartado 2.2.1.2, fueron resuspendidos 1:1 (p/v) en una solución hipotónica estabilizadora de enzimas, compuesta por (2 mM ditioneol, 2 mM ácido n-aminocaproico y 2 mM EDTA) (Golfrey y Kilgour, 1976), posteriormente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y descongelados a  $25^{\circ}\text{C}$ , proceso que se repitió 3 veces. Finalmente las células lisadas,



fueron centrifugadas a 8000 g x 20 min a 4°C, los sobrenadantes alicuotados y almacenados a -20°C a una concentración final de 5 µg/µl, previa determinación de proteínas mediante el ensayo de Bio-Rad (basado en el método de Bradford, 1976).

Las enzimas fueron separadas por isoelectroenfoque usando el aparato PhastSystem (Pharmacia), y en geles de poliacrilamida de rango de pH (pI) 3-9 (Phas-gel IEF 3-9) suministrados por la misma casa comercial. El método para la separación de las muestras consta de tres pasos: 1) preenfoco, donde se crea el gradiente de pH, 2) aplicación de las muestras (2 µl) en el gel y 3) elevación del aplicador y migración de las muestras hasta alcanzar su punto isoeléctrico. Las condiciones del proceso vienen expresadas en la siguiente tabla:

Tabla 3.

Aplicador de la muestra baja en el paso 1.2					
Aplicador de la muestra sube en el paso 1.3					
Sep. 1.1	2000 V	2.5 mA	3.5 w	15°C	75 Vh*
Sep. 1.2	200 V	2.5 mA	3.5 w	15°C	15 Vh
Sep. 1.3	2000 V	2.5 mA	3.5 w	15°C	410 Vh**

\*El preenfoco tiene una duración aproximada de 10 min.

\*\*El corrido total tiene una duración aproximada de 30 min.

Fueron analizados ocho sistemas enzimáticos (Tabla 4), que se corresponden con nueve loci, ya que para una de ellos, el enzima málico, revelamos dos loci al mismo tiempo.



Tabla 4.

Sistema enzimático (Abreviatura)	Código
Enzima málico (ME)	[E.C.1.1.1.40.]
Malato deshidrogenasa (MDH)	[E.C.1.1.1.37.]
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	[E.C.1.4.1.3.]
Gliceraldehido-3-fosfato-DH (GAPD)	[E.C.1.2.1.12.]
Isocitrato deshidrogenasa (IDH)	[E.C.1.1.1.42.]
Glucosafosfato isomerasa (GPI)	[E.C.5.3.1.9.]
Fosfoglucomutasa (PGM)	[E.C.2.7.5.1.]
Adenilato kinasa (AK)	[E.C.1.15.1.1.]

Una vez finalizada la electroforesis, los geles son colocados en placas petri, donde se llevará a cabo el proceso de revelado de las enzimas. Para ello se siguen los procedimientos de tinción descritos por Ben Abderrazak y col. (1993). La visualización de las bandas se produce por procedimientos de coloración específica, donde las soluciones contienen el sustrato específico de la enzima a analizar, los cofactores (coenzimas, iones y moléculas químicas necesarias para la actividad enzimática) y un colorante susceptible de reaccionar con el producto de la reacción catalizada. Las soluciones específicas para la tinción de las enzimas ensayadas vienen reflejadas en la tabla 5.

La incubación de las enzimas con sus soluciones específicas de tinción se realiza a 37°C y en oscuridad. El tiempo de incubación depende del sistema enzimático ensayado, variando desde 1-30 min, aunque lo general son 10 min.



Tabla 5.

Enzima	T.R. <sup>*</sup> (diluc.)	Solución de tinción
AK	2 (1/4)	60 mg D-glucosa, 3 UI glucosa 6-P-DH, 5UI hexokinasa, 250 µl SS MgCl <sub>2</sub> , 5 mg NADP, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
GAPD <sup>**</sup>	1 (1/4)	12.5 mg fructosa 1,6-difosfato, 0.7 UI aldolasa, 12.5 mg ácido arsénico, 12.5 mg ácido pirúvico, 4 mg NAD, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
GDH	2 (1/10)	170 mg ácido L-glutámico <sup>***</sup> , 5 mg NAD, 5 mg NADP, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
GPI	1 (1/4)	10 mg fructosa-6-P, 5 UI glucosa-6-P-DH, 250 µl SS MgCl <sub>2</sub> , 5 mg NADP, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
IDH	2 (1/10)	10 mg DL-ácido isocítrico, 250 µl SS MgCl <sub>2</sub> , 5 mg NADP, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
MDH	2 (1/10)	0.9 ml 1M ácido málico pH 7.0 (con DL-ácido málico), 4 mg NAD, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
ME	1 (1/4)	0.6 ml 1M ácido málico pH 7.0 (con DL-ácido málico), 250 µl SS MgCl <sub>2</sub> , 5 mg NADP, 1.2 mg MTT, 3 mg PMS.
PGM	2 (1/4)	20 mg glucosa 1-fosfato, 8 UI glucosa 6-P-DH, 250 µl SS MgCl <sub>2</sub> , 5 mg NADP, 1.2 MTT, 3 mg PMS.

### 3.2.4. Análisis del kDNA mediante enzimas de restricción

#### 3.2.4.1. Aislamiento del DNA del kinetoplasto

Las células son lisadas usando un detergente fuerte, el lisado es digerido con pronasa a 60°C, los sistemas de kDNA obtenidos y lavados por centrifugación, son extraídos con fenol-cloroformo y precipitados con alcohol. El procedimiento descrito por Gonçalves y col. (1984), es detallado a continuación:



1. Resuspender los flagelados en tampón SE (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0), usando 0.85 ml/10<sup>9</sup> células. Trabajar siempre a 0°C en hielo picado.
2. Adicionar pronasa de una solución stock en una relación de 1:19 (pronasa/suspensión celular). Solución stock de pronasa: 40 mg/ml de pronasa-B. Esta relación corresponde a una cantidad de 0.05 ml/10<sup>9</sup> cél.
3. Adicionar 30% w/w de sarcosil en una relación de 1:9 (sarcosil/susp. celular), lo que corresponde a 0.1 ml/10<sup>9</sup> cel.
4. Se homogeniza (sonicador) e incuba a 60°C en un baño de agitación hasta obtener una lisis total, (1-3 horas).
5. Una vez incubado, pasar el homogenado a través de una jeringa de insulina para emulsionar la muestra.
6. Centrifugar la muestra para separar el kDNA del DNA nuclear, se realiza en un rotor SW41 Ti a 28000 rpm(g?) x 60 min. a 4°C.
7. Eliminar el sobrenadante (o guardar si interesa el DNA nuclear) con cuidado de no resuspender el pellet. Volcar el tubo hacia abajo y con ayuda de pinzas y papel de filtro limpiar las paredes para eliminar todo el sobrenadante que sea posible.
8. Resuspender el pellet en 0.5 ml de buffer TE (10 mM Tris-ClH, pH 8.0, 1 mM EDTA) con ayuda de una pipeta xilanzada o de una punta de pipeta. Completar la resuspensión adicionando 1 ml de TE.
9. Cuando la resuspensión es completa adicionar mas TE hasta que el tubo de la centrífuga esté lleno y recentrifugar en las mismas condiciones que en el apartado 6.
10. Eliminar el sobrenadante rápidamente y resuspender el pellet con TE (30 µl/10<sup>9</sup> cel.), transfiriendolo a un Eppendorf.
11. Adicionar un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) saturado con 50 mM Tris-ClH pH 7.4, 100 mM NaCl. Una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) se puede utilizar también en este paso.
12. Meclar con pipeta o por inversión varias veces y centrifugar durante 8' a T<sup>a</sup> ambiente en Microcentrífuga.
13. Transferir la fase acuosa superior, teniendo cuidado de no tocar la interfase, a otro Eppendorf.
14. Mezclar la fase fenol:cloroformo con un volumen igual de TE y repetir el punto 12.



15. Repetir la extracción de la fase acuosa como antes hasta obtener un pool de fases acuosas (3-4 veces).
16. Mezclar la fase acuosa final con 3 tres volúmenes de Etil Eter saturado con agua. Centrifugar 5' a Tª ambiente en microfuga y eliminar el eter (fase superior) por aspiración. Repetir 4-5 veces.
17. Incubar a 37°C durante 20' para evaporar el eter.
18. Tomar una alícuota de 20 µl de la suspensión de kDNA, adicionar 480 µl de TE o agua (dilución 1:25) y leer la absorbancia a 260 nm. Calcular la cantidad de DNA presente usando la siguiente relación 1 unidad de A260= 50 µgDNA/ml o  $DNA = A260 \times dilución \times 0.05 \mu g/\mu l$ . Para la anterior dilución  $DNA = A260 \times 1.25 \mu g/\mu l$ .
19. Adicionar 1/20th de volumen de ClNa 4M y tres volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa, mezclar bien y dejar toda la noche a -20°C para que precipite el kDNA.
20. Centrifugar 20000 g x 20' a 4°C, eliminar el sobrenadante y con el tubo hacia abajo secar las paredes del tubo con ayuda de papel de filtro y pinzas.
21. Secar al vacío (liofilizador), resuspender en TE 1 µl/µg DNA, y almacenar a -20°C.

#### 3.2.4.2. Digestión con enzimas de restricción y electroforesis.

Una vez aislado el DNA del kinetoplasto fue digerido con cuatro endonucleasas de restricción (MspI, BmyI, Hae III y HpaII/HpaII), bajo las condiciones y tampones recomendados por la casa comercial suministradora (Boehringer). Los productos resultantes de la digestión fueron sometidos a una electroforesis en geles de agarosa de porcentaje 1.5 %, como describió Riou y Yot, 1977. El tamaño de los fragmentos obtenidos fue determinado por comparación de sus movilidades con las del marcador utilizado, en nuestro caso 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml) durante 10 min. y fotografiados bajo luz ultravioleta con una cámara Polaroid y película 665.



### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Tests de aglutinación con lectinas

Para diferenciar los tripanosomátidos aislados de frutos de tomate y chirimoyo, de otros flagelados considerados como especies del género *Phytomonas*, hemos llevado a cabo tests de aglutinación con siete lectinas. Los datos cualitativos y cuantitativos obtenidos en este estudio han permitido que los flagelados parásitos sean identificados según la composición de los polisacáridos que forman la superficie celular. En todos los casos la aglutinación permanece constante durante todo el tiempo que dura la experiencia (Tabla 6).

La lectina soybean (SBA) ha diferenciado cualitativamente al aislado de *E. characias* del resto de los flagelados estudiados, así como cuantitativamente a estos últimos. Esta lectina aglutina claramente a los aislados de cocotero y de frutos, mientras que esta aglutinación en los aislados de origen laticífero fue mínimo (*E. hyssopifolia*), o nulo como en el caso de los aislados de *E. characias*. Lo cual indica que esta cepa es la única, de las estudiadas, que no presenta restos de  $\alpha$ -DGINAC sobre su superficie.

Las lectinas UEA, PNA y LCH aglutinaban exclusivamente al aislado de *E. hyssopifolia*, lo que demuestra que solo este flagelado posee en su superficie los azúcares específicos para cada una de estas lectinas.



Tabla 6.

Lectinas	<i>Phytomonas</i> spp. Tiempo (1 h)					<i>Phytomonas</i> spp. Tiempo (3 h)				
	EC1	Ehy	Har1	Tom	Che	Ehy	Har1	Tom	CEC1	he
SBA	-	+	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++
RCA I	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
UEA I	-	+	-	-	-	-	++	-	-	-
WGA	+	++	-	-	-	+	++	-	-	-
PNA	-	+	-	-	-	-	++	-	-	-
LCH	-	+	-	-	-	-	++	-	-	-
Con A	+	++	+	+	+	+	++	++	++	++

Las *Phytomonas* aisladas de cocotero, así como las aisladas de frutos de tomate y chirimoyo se distinguen claramente de las de origen laticífero mediante la aglutinación que presentan frente a la lectina de germen de trigo (WGA). El que los flagelados aislados por nosotros en frutos, presenten una aglutinación más fuerte frente a la lectina SBA que la que se da con las *Phytomonas* de origen floemático, indica que sobre la superficie de estos flagelados hay receptores específicos para esta lectina, siendo común para el aislado del cocotero, o bien que la N-acetilgalactosamina es un carbohidrato muy abundante en la superficie de estos flagelados.

La lectina Con A aglutinó a todas las cepas ensayadas, aunque en el caso de *E. characias* fue más débil, posiblemente debido a la menor proporción de residuos de  $\alpha$ -D-manosa sobre su superficie.

A la vista de los resultados obtenidos con el test de aglutinación con lectinas, no hemos podido diferenciar a los aislados de fruto entre sí, ni a estos de los



aislados del cocotero, aunque si se han podido diferenciar de los de origen laticífero.

### 3.3.2. Analisis isoenzimático.

El estudio de isoenzimas es una técnica adecuada y útil para la separación de poblaciones de gran importancia en la taxonomía de este grupo de organismos, en los cuales y durante algún tiempo, uno de los criterios que había regido para la separación de especies, era el origen del hospedador.

Mediante el empleo de ocho sistemas isoenzimáticos, hemos podido diferenciar entre sí a la mayoría de las cepas utilizadas en este ensayo. Como se desprende de la figura 1, los perfiles isoenzimáticos para cada una de las muestras viene dado tanto por el número de bandas, como por la movilidad de las mismas al ser separadas electroforéticamente en función de su punto isoeléctrico.

Los sistemas enzimáticos ensayados pudieron distinguir claramente los aislados de frutos de tomate y chirimoyo de las otras *Phytomonas* examinadas. Las enzimas AK y MDH (Fig. 1 A, E), distinguieron a la mayoría de las cepas, pero no así a los aislados de frutos, de las *Phytomonas* procedentes del floema (Hart1). Como en estudios previos (Gonçalves de Lima y col., 1982; Vainstein y col., 1987), solo el enzima málico (Fig. 1F) diferenció a todos los aislados ensayados, pero de nuevo no entre los aislados de tomate y chirimoyo, que presentaron idéntico perfil para todas las enzimas probadas.

En el presente estudio, para caracterizar a los aislados de fruto de tomate y chirimoyo, hemos analizado diferentes isoenzimas por isoelectroenfoque, la cual es una técnica para la separación de proteínas en función de sus puntos isoeléctricos. Los resultados obtenidos indican que por este método, podemos distinguir a flagelados que han sido aislados de diferentes hospedadores y que permanecen



indiferenciables, morfológicamente usando microscopía electrónica o mediante tests de aglutinación con lectinas.

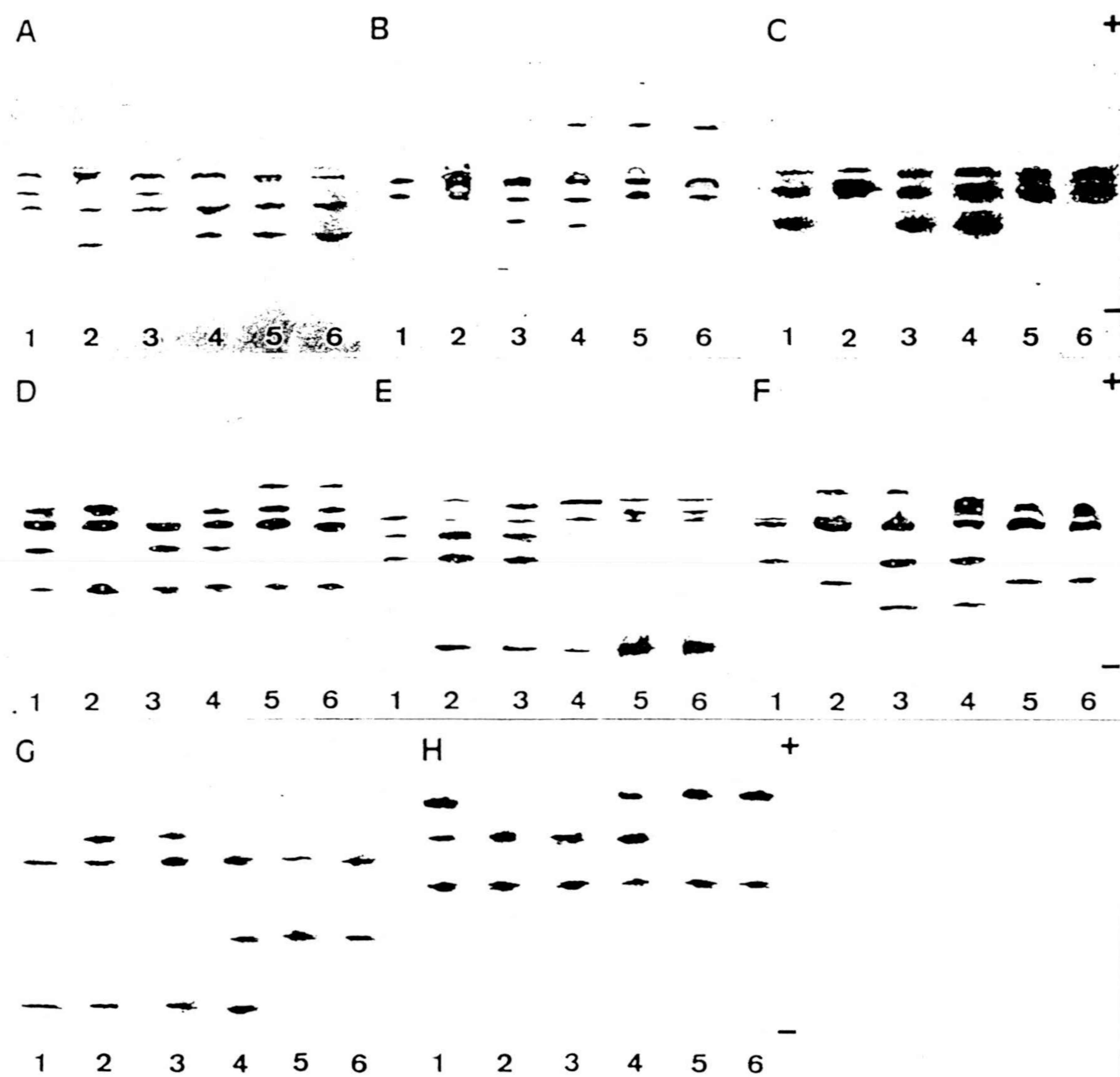


Figura 1. Perfil isoenzimático de los diferentes tripanosomátidos aislados de plantas. Organismos: (1) Ech1, (2) Ehy, (3) Ehi, (4) Hart1, (5) Tom y (6) Che. Sistemas enzimáticos analizados: A) Adenilato kinasa (AK); B) Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD); C) Glutamato deshidrogenasa (GDH); D) Isocitrato deshidrogenasa (IDH); E) Malato deshidrogenasa (MDH); F) Enzima málico (ME); G) Glucosafosfato isomerasa (GPI) y H) Fosfoglucomutasa (PGM).



Al examinar los perfiles isoenzimáticos de las seis cepas ensayadas, observamos que con todas las enzimas probadas los aislados de fruto de tomate y chirimoyo presentaban el mismo patrón; aunque si han podido ser diferenciadas del resto de las cepas estudiadas. En general, los aislados de la familia Euphorbiaceae, presentaban grandes similitudes en sus perfiles isoenzimáticos, como ocurre en el caso de los aislados de frutos.

Las diferencias isoenzimáticas observadas entre los aislados de frutos de tomate y chirimoyo, no son significativas como para poder diferenciar y considerar a estos aislados diferentes, es por esto, que hemos usado otra técnica de caracterización, basada en los fragmentos de restricción del kDNA obtenidos mediante el uso de diferentes endonucleasas.

### 3.2.3. Analisis del kDNA por endonucleasas de restricción.

El DNA del kinetoplasto de las seis *Phytomonas* usadas, fue purificado y digerido con cuatro enzimas de restricción (HaeIII, BmyI, HinfI y MspI/HpaII). Las electroforesis, llevadas a cabo en geles de agarosa, revelaban que el kDNA intacto (sin digerir) no podía penetrar en el gel (Fig. 2, línea 26), sin embargo tras la digestión, se forman pequeñas moléculas de DNA que si penetran en el gel, y cuando la digestión es completa, el material genético desaparece totalmente de la parte superior del gel.

La endonucleasa de restricción BmyI digiere a la red de DNA parcialmente en todas las cepas ensayadas, como se demuestra por la presencia de material genético que no entra en el gel (Fig. 2, líneas 4-7), así como por la ausencia de bandas mas pequeñas que los minicírculos linearizados, lo cual también indica una pobreza en los sitios de restricción para esta enzima.



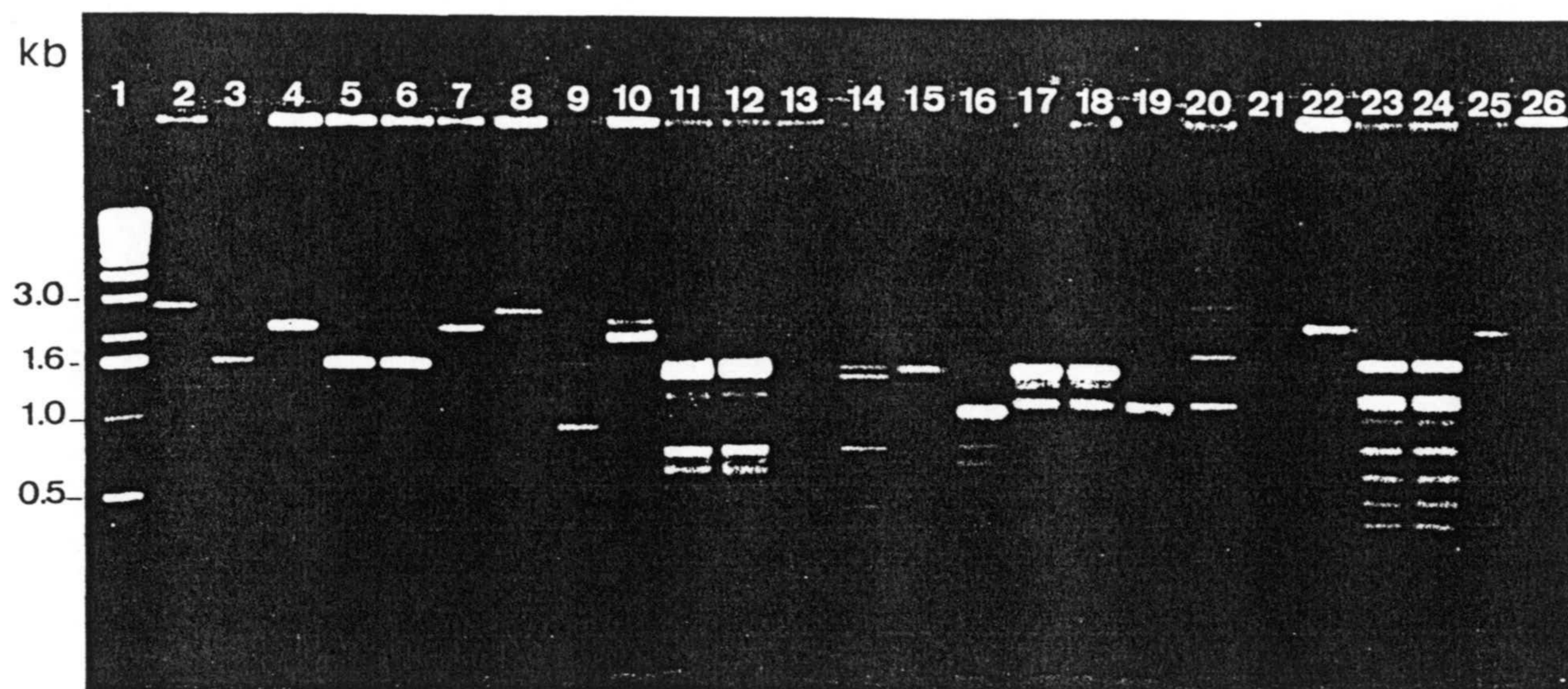


Figura 2. Análisis de restricción con endonucleasas del kDNA. Organismos ensayados: Ech1 (líneas 2, 8, 14, 20); Hart1 (líneas 3, 9, 15, 21); Ehi (líneas 4, 10, 16, 22); Tom (líneas 5, 11, 17, 23); Che (líneas 6, 12, 18, 24) y Ehy (líneas 7, 13, 19, 25). Enzimas de restricción: líneas (2-7) kDNAs+BmyI; (8-13) kDNAs+HaeIII; (14-19) kDNAs+HinfI y (20-25) kDNAs+MspI/HpaII. Línea 1 (marcador 1Kb Ladder), línea 26 (Control kDNA sin digerir).

Cuando las cepas de *Phytomonas* aisladas de frutos de tomate y chirimoyo fueron incubadas con las endonucleasas MspI/HpaII, HinfI y HaeIII (Fig. 2, líneas 11, 12, 17, 18, 23 y 24), la digestión fue completa, proporcionando numerosos fragmentos de DNA, cuya suma de longitudes fue mayor que la longitud de los minicírculos linearizados, aproximadamente 1.6 Kb (Muller y col., 1995). Estos resultados indican que los minicírculos presentan una secuencia de bases heterogénea, como usualmente ha sido observado en la mayoría de los tripanosomátidos (Simpson, 1987; Ryan y col., 1988).

El grado de heterogenicidad de los minicírculos fue más elevado en las dos cepas aisladas de frutos, que en las aisladas de *E. characias*, *E. hyssopifolia* y *E.*



*hirta*. Por contraste, los aislados de cocotero (Hart1) son más homogéneos en su secuencia, para todas las enzimas probadas, como previamente demostró Ahomadegbe y col. (1992).

Los patrones de restricción también revelan la presencia de bandas muy finas, correspondientes a moléculas con alto peso molecular, cuyo rango oscila entre 20-5 Kb. Estas probablemente son maxicírculos rotos, detectados solamente cuando grandes cantidades de DNA son depositados en el gel (Fig. 2, líneas 8, 10-12).

La caracterización de los minicírculos del kDNA ha sido de gran utilidad en la distinción de especies de tripanosomátidos, incluso cepas dentro de la misma especie. En *Trypanosoma cruzi*, se han identificado diferentes subpoblaciones en función de los perfiles de restricción de los minicírculos, proporcionando gran información en los estudios filogenéticos y epidemiológicos de la enfermedad de Chagas (Morel y col., 1980).

Las *Phytomonas* aislados de frutos de tomate y chirimoyo han sido diferenciadas del resto de los flagelados utilizados en el ensayo, según el patrón de restricción obtenido con las enzimas HinfI, HaeIII y MspI/HpaII, presentando además muchas bandas de tamaño menor al que le corresponde al minicírculo linearizado, indicando una gran heterogenicidad en su secuencia, como ya se había visto en otros tripanosomátidos (Simpson 1987; Ryan y col., 1988). Sin embargo, no está clara la distinción entre las cepas de tomate y chirimoyo, ya que presentan similares, si no idénticos perfiles en todas las enzimas probadas.



**Aspectos Comparativos Sobre el  
Metabolismo Energético de los  
Tripanosomátidos aislados de  
*Lycopersicum esculentum*  
y *Annona cherimolia***



## Capítulo 4

### 4. Aspectos Comparativos Sobre el Metabolismo Energético de los Tripanosomátidos Aislados de *Lycopersicum esculentum* y *Annona cherimolia*

#### 4.1. Introducción

En el metabolismo energético de los kinetoplastidos, operan en conjunción la mitocondria y/junto con un orgánulo, único en este orden, denominado glicosoma (Opperdoes y Borst, 1977). Los glicosomas pertenecen a la familia de los microcuerpos, y albergan las enzimas implicadas en la primera parte de la vía glucolítica, así como dos del metabolismo del glicerol.

En el caso concreto de la forma sanguínea del protozoo digenético *Trypanosoma brucei*, dependiente totalmente de la glucólisis para la obtención de energía, esta compartimentalización permite dirigir este proceso de una manera más eficiente a como lo haría una célula eucariota convencional. Los equivalentes reducidos que se producen por esta vía van a ser reoxidados, no de forma tradicional mediante citocromos, sino por una glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO) mitocondrial. Sin embargo, en la etapa del insecto, este protozoo presenta la capacidad de modificar su metabolismo, activando un sistema de prolina oxidasa y cadena respiratoria mitocondrial para obtener energía de los aminoácidos (Opperdoes, 1987), que se traduce en variaciones morfológicas en la mitocondria, principalmente a nivel de sus crestas (Vickerman, 1985).

Esta capacidad para utilizar tanto azúcares y aminoácidos como fuente de energía, es una característica de los tripanosomátidos, y ha sido probablemente de inestimable valor en su adaptación y colonización a/de diferentes hospedadores;



indiscutible ventaja si tenemos en cuenta que estos organismos parece que carecen de un sistema convencional de almacenamiento de carbohidratos (Vickerman, 1994).

Los glicosomas ya han sido descritos en la mayoría de los tripanosomátidos: *Trypanosoma* spp. (Opperdoes y Borst, 1977; Cannata y col., 1982), *Leishmania* spp. (Hart y Opperdoes, 1984), y *Crithidia* spp. (Opperdoes y col., 1977).

Las tripanosomátidos de plantas *Phytomonas*, presentan en su forma típica promastigote todos los orgánulos característicos de esta familia, inclusive al que ahora hacemos referencia, los glicosomas (Attias y col., 1986; Sánchez-Moreno y col., 1992).

La caracterización del metabolismo de *Phytomonas* se ha retrasado debido a la dificultad, en un principio, para cultivarlos in vitro. Recientemente, se ha conseguido con éxito el cultivo axénico de estos parásitos aislados de la planta laticífera *Euphorbia characias* (Dollet, 1984), lo cual ha permitido que algunos aspectos sobre el metabolismo de carbohidratos sean descritos, tanto en la forma típica promastigote (Sánchez-Moreno y col., 1992; Chaumont y col., 1994), como en unas formas "like-amastigotas" y esferoamastigotas obtenidas recientemente en cultivos in vitro (Sánchez-Moreno y col., 1995). Es interesante profundizar en el metabolismo de estos protozoos, no solo por su capacidad patogénica en plantas, sino por su relación evolutiva con otros tripanosomátidos flagelados.

Hasta la fecha, ninguno de los tripanosomátidos estudiados han sido capaces de degradar totalmente la glucosa a dióxido de carbono bajo condiciones aeróbicas, así una gran parte del esqueleto carbonado de la glucosa es excretado al medio como metabolitos fermentativos, los cuales difieren dependiendo de las especies (Fairlamb y Opperdoes, 1986; Blum, 1993).



Las *Phytomonas* utilizan glucosa, fructosa y manosa, como principales sustratos energéticos y además se ha demostrado que excretan al medio externo enzimas que degradan celulosa, almidón y pectina (Sánchez-Moreno y col., 1992).

La espectrofotometría de resonancia magnética nuclear de protones (RMN H<sup>1</sup>) viene siendo empleada en los últimos años para estudiar el metabolismo de parásitos, aumentando su importancia y uso en este campo, ya que la mayoría de los compuestos biológicos contienen protones detectables (Thompson, 1991).

Los principales metabolitos producidos, como consecuencia de la degradación de la glucosa, han sido detectados en los tripanosomátidos de plantas mediante el empleo de esta técnica, y son: acetato, etanol, succinato, glicina, piruvato y glicerol. Las enzimas glucolíticas desde la hexokinasa hasta la fosfoglicerato kinasa, así como glicerol kinasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxikinasa y malato deshidrogenasa, han sido todas ellas detectadas en homogenados de *Phytomonas* sp. y localizadas en los glicosomas. Otras enzimas también detectadas en estos organismos son: piruvato kinasa, alcohol deshidrogenasa y enzima málico (Sánchez-Moreno y col., 1992; 1995).

En los estudios llevados a cabo por Chaumont y col. (1994), se describe un análisis cuantitativo del metabolismo de la glucosa en *Phytomonas* sp. aisladas de *E. characias*, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Siendo acetato, etanol y CO<sub>2</sub> los principales metabolitos excretados bajo condiciones aeróbicas, y etanol, CO<sub>2</sub> y glicerol en anaerobiosis.

Como en el caso de la forma sanguínea de *T. brucei*, ni el ciclo de Krebs, ni la cadena respiratoria de la mitocondria son funcionales en estos organismos, y al igual que los primeros dependen totalmente de una glicerol-3-fosfato oxidasa mitocondrial, sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM) para reoxidar los



equivalente reducidos durante la glucólisis (Sánchez-Moreno y col., 1992).

Hasta la fecha, todos los estudios metabólicos llevados a cabo en los tripanosomátidos de plantas, se habían hecho sobre la forma aislada del latex de *E. characias*. En el presente capítulo, y siguiendo en la línea de la presente memoria, hemos llevado a cabo una caracterización preliminar del metabolismo energético de las formas aisladas por nosotros en frutos de tomate y chirimoyo, y a la vez se ha estudiado otro flagelado de origen floemático, agente causante de la enfermedad de Hartrot, y que hasta el momento tampoco ha sido estudiado a este nivel, para poder comparar la información obtenida y ver si la distinta localización en la planta, afecta de alguna manera al metabolismo de estos protozoos.

## 4.2. Material y métodos

### 4.2.1. Organismos ensayados

Para llevar a cabo los experimentos expuestos en el presente apartado se emplearon *Phytomonas* aisladas de frutos de *L. esculentum* (tomate) y *A. cherimolia* (chirimoyo) (Sánchez-Moreno y col., 1995), así como un aislado de origen floemático, agente causante de la enfermedad de Hartrot en el cocotero (Menara y col., 1988). Los flagelados cultivados en medio Grace's a 28°C, fueron colectados por centrifugación a 1000 g x 5 min a 4°C, al final de la fase logarítmica de crecimiento, con una densidad celular de  $2 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup>, y posteriormente fueron lavados en un tampón de homogenización isotónico (STE), conteniendo 0.25 M sacarosa, 25 mM Tris-ClH y 1mM EDTA, pH 7.8.

### 4.2.2. Preparación de las muestras y espectroscopía de RMN H<sup>1</sup>. Identificación de los metabolitos.



Para realizar los estudios de espectroscopía, en el cuarto día de cultivo se tomaron 5 ml de cada uno de los parásitos ensayados, y fueron centrifugados a 1500 g x 10 minutos a 4°C, el botón fue eliminado, mientras que el sobrenadante, ya libre de parásitos, fue almacenado a -20°C hasta su posterior utilización en los estudios de RMN <sup>1</sup>H.

El protocolo que a continuación se detalla fué puesto a punto y llevado a la práctica, por el personal de la Unidad de Espectroscopía del Centro de Instrumentaciones Científicas de la Universidad de Granada (CIC).

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se obtuvieron a 300 MHz en un aparato Bruker AM-300, que opera a pulsos en la transformada de Fourier con una detección en cuadratura (Gilroy, 1988). La temperatura de la sonda se mantuvo a 27°C. Los parámetros de adquisición fueron: pulsos de 90° de radio y una anchura espectral de 3287.5 Hz, 8 segundos el tiempo de reciclaje total y 160 acumulaciones. Los desplazamientos químicos fueron expresados como partes por millón (ppm) bajo un campo de TSP.

Los desplazamientos químicos usados para identificar los respectivos metabolitos estaban en concordancia con los descritos en la literatura (Gilroy, 1988; Sánchez-Moreno y col., 1992; Thompson, 1991). Las resonancias de un determinado número de metabolitos fué asignado por la adición de componentes puros al medio fresco y sus cambios químicos medidos.

#### **4.2.3. Fraccionamiento celular**

Los homogenados de las cepas estudiadas, fueron obtenidas por tratamiento de las células con carbón de silice en grano, como describió previamente (Steiger y col., 1980). Tras la lisis celular se realizó la centrifugación diferencial, con el fin de



obtener las distintas fracciones, y su esquema general es como sigue: las células sin romper y los núcleos fueron sedimentados a 1500 x g durante 10 min (Fracción nuclear: N). Del extracto citoplasmático resultante (post-nuclear: PN), se obtuvo una fracción granular mediante centrifugación de este a 5000 x g x 10 min (organulos grandes: LG), el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 14500 x g x 10 min, el sedimento obtenido guardado como la fracción organulos chicos (SG), mientras que el sobrenadante volvió a ser centrifugado a 140000 x g durante 10 min, el pellet resuspendido y guardado como fracción microsomal (P) y en el sobrenadante nos queda la fracción citosólica (S). Todas la centrifugaciones y la manipulación de las muestras se realizó a 4°C, descrito por Sánchez-Moreno y col. (1992).

Para los estudios de densidad se colocaron 7 ml, del sobrenadante obtenido tras centrifugar la fracción post-nuclear a 5000 x g x 10 min, sobre un gradiente lineal de sacarosa realizado en tampón STE. Posteriormente se centrifugó a 190000 x g durante 150 min, como previamente había sido descrito por (Opperdoes y col., 1981). A las distintas fracciones recogidas por succión desde el fondo del gradiente, se les determinó el contenido en proteínas y la densidad, tras lo cual fueron almacenadas a -80°C para posteriores análisis. La presentación de la distribución de los patrones de densidad es como describió Beaufay y Amar-Costesec (1976).

#### **4.2.4. Preparación de las partículas mitocondriales y estudios de respiración**

Las partículas mitocondriales se obtuvieron como fue descrito por Toner y Weber (1972). Para los estudios de respiración se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark, que fue calibrado frente a agua saturada en oxígeno y a una solución de ditionito sódico. El vaso del electrodo tenía un volumen de 1,5 ml, y contenía 350 mM de sacarosa, 20 mM de sulfonato de morfolinopropano, pH 7.0.



#### 4.2.5. Determinaciones enzimáticas

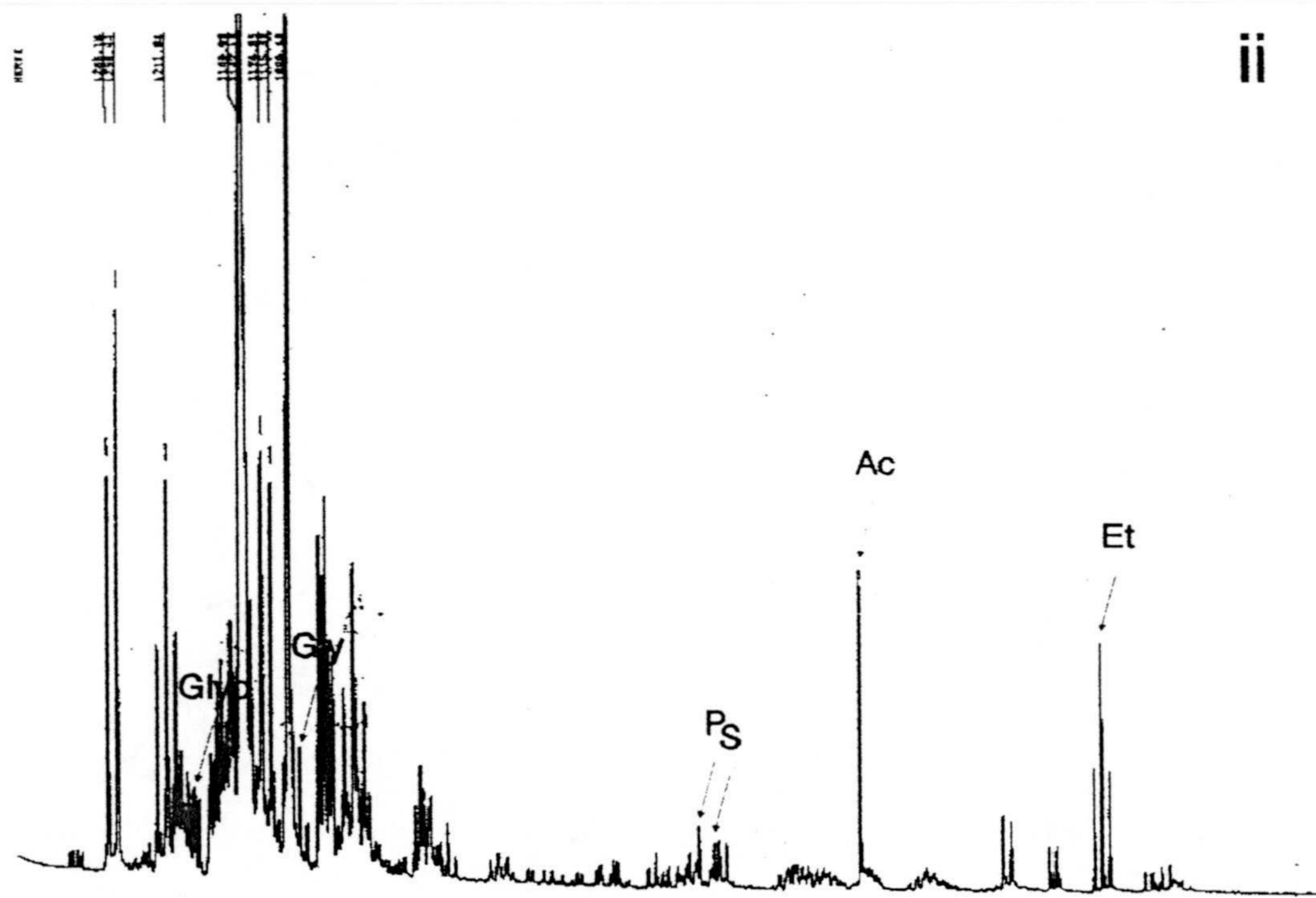
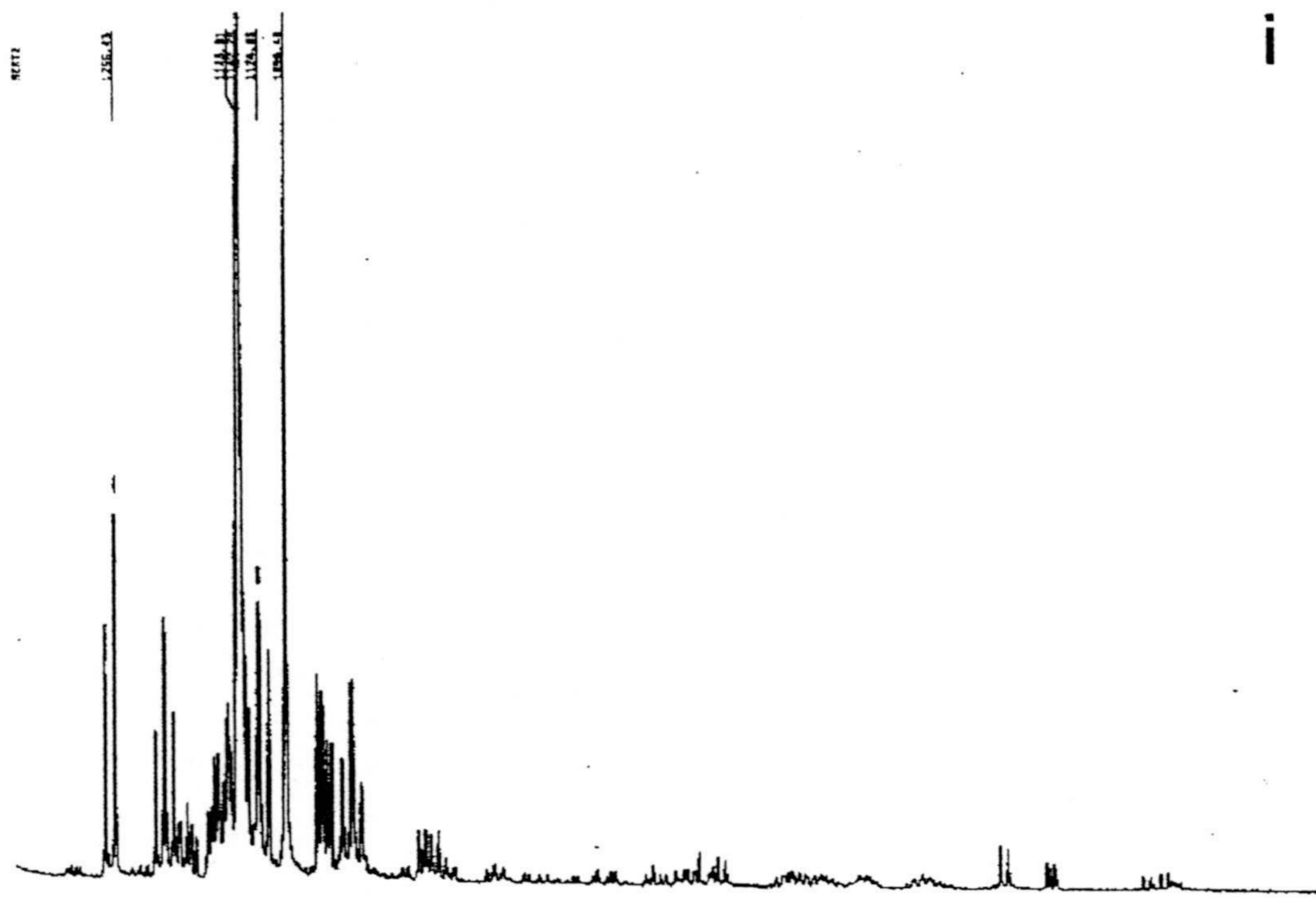
Las enzimas glicolíticas (hexokinasa, HK; fosfoglicerato kinasa, PGK; triosafosfato isomerasa, TIM; glucosafosfato isomerasa, PGI; gliceraldehidofosfato deshidrogenasa, GAPDH y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, GDH), fueron medidas como describió Misset y col. (1986). Las enzimas mitocondriales ensayadas fueron, succinato deshidrogenasa (SDH) determinada según Klein y col. (1975), y la ATPasa (total y sensible a la oligomicina) según Opperdoes y col. (1976). Mientras que la actividad de la catalasa se midió de acuerdo con lo expuesto en (Holmes y Masters, 1970).

### 4.3. Resultados y discusión

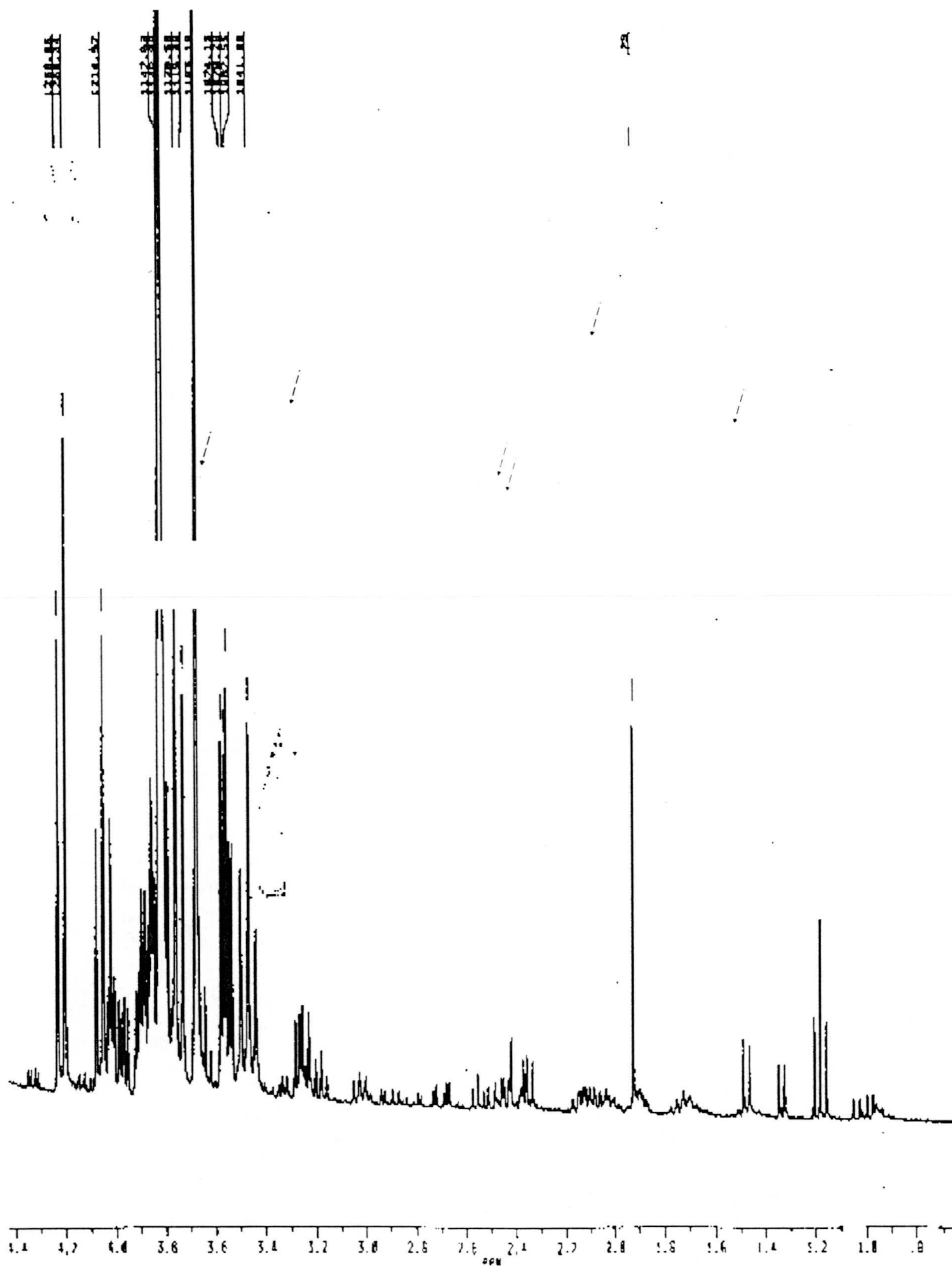
#### 4.3.1. Productos finales del metabolismo de carbohidratos

Para identificar los principales metabolitos que excretan al medio de cultivo las *Phytomonas* estudiadas en este capítulo, la composición del medio en el que fueron cultivadas, fue analizado al cuarto día de cultivo, mediante la técnica de espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$ , comparandose los espectros obtenidos con el medio fresco, libre de células, que nos sirvió como control (Figura 1). El espectro «i» representa el medio fresco antes de la inoculación celular, mientras que el «ii» «iii» y «iv» muestra los espectros obtenidos al cuarto día de cultivo, bajo condiciones aeróbicas, de los flagelados aislados de frutos de tomate, chirimoyo y cocotero, respectivamente. Los principales productos excretados fueron acetato, etanol, glicerol y glicina, así como succinato y piruvato en menor proporción.











### 4.3.2. Actividades enzimáticas y fraccionamiento celular

En los homogenados totales de las tres cepas de *Phytomonas* ensayadas, fueron analizadas las principales enzimas glucolíticas, así como algunas enzimas mitocondriales. La tabla 1 muestra las actividades específicas de los homogenados de las enzimas probadas.

Tabla 1.

Enzima	Actividad Enzimática (mU mg <sup>-1</sup> )	
	Hart1	Tom
HK	282	314
PGK	706	601
TIM	2959	2860
PGI	408	240
GAPDH	43	187
GDH	277	188
ATPasa (t.)	15	26
ATPasa (o.s.)	12	9
SDH	n.d.	n.d.
Catalasa	n.d.	n.d.

En la figura 2, se presentan los perfiles de distribución, de la enzimas seleccionadas, tras el fraccionamiento por centrifugación diferencial del homogenado de *Phytomonas* aisladas de tomate. Las enzimas glucolíticas ensayadas estaban asociadas principalmente a la fracion de los organulos pequeños (SG), mientras que las enzima mitocondrial estaba asociada a la fracción de orgánulos grandes y a la nuclear. Sin embargo, en el caso de las *Phytomonas* responsables de la enfermedad de Hartrot, la distribución de los perfiles fue mucho más heterogeneo (Figura 3).



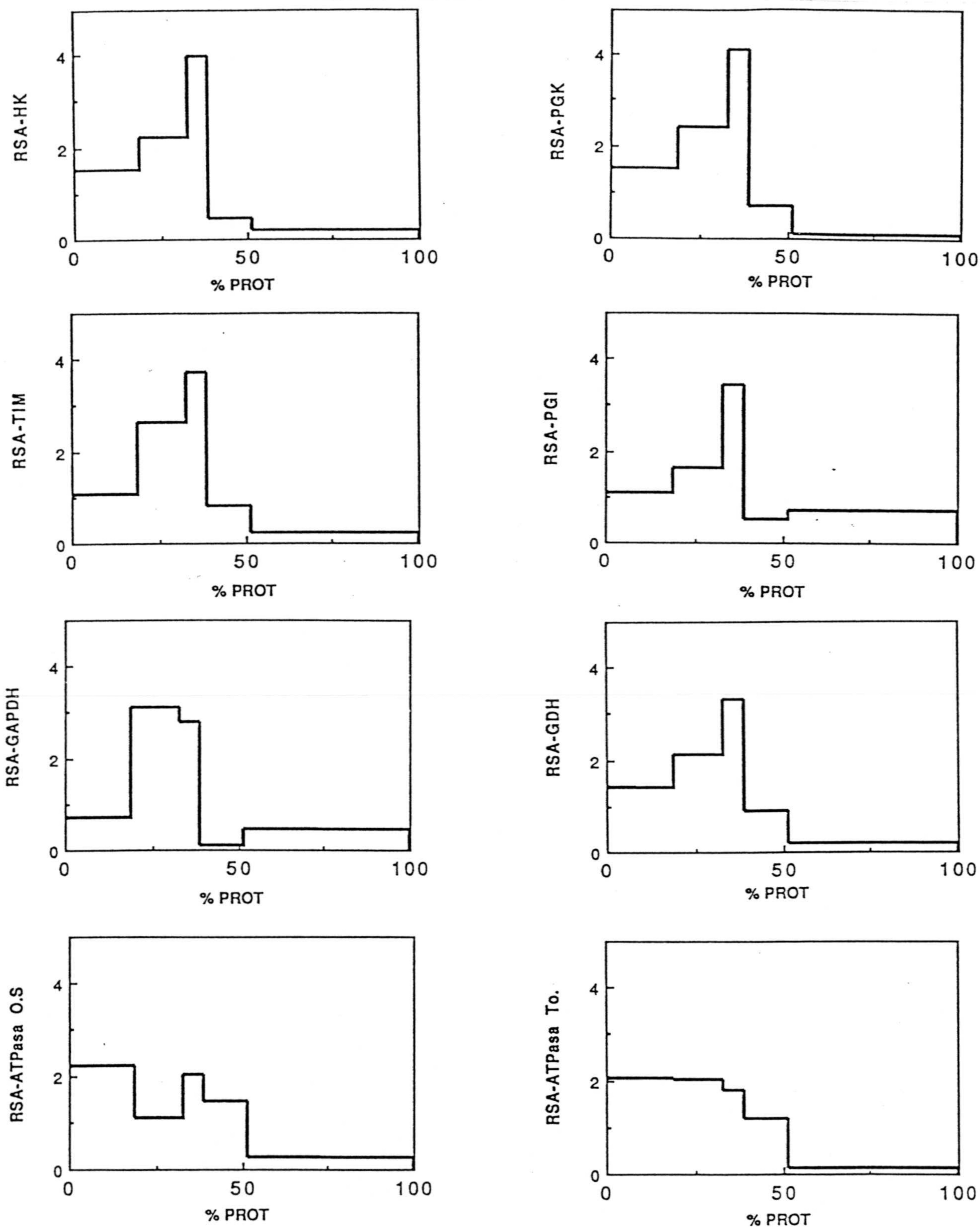


Figura 2. *Phytomonas* aisladas de *Lycopersicum esculentum*. Perfil de distribución de las enzimas ensayadas en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Las fracciones obtenidas son, de derecha a izquierda, nuclear, orgánulos grandes, orgánulos pequeños, microsomal y citosólica.



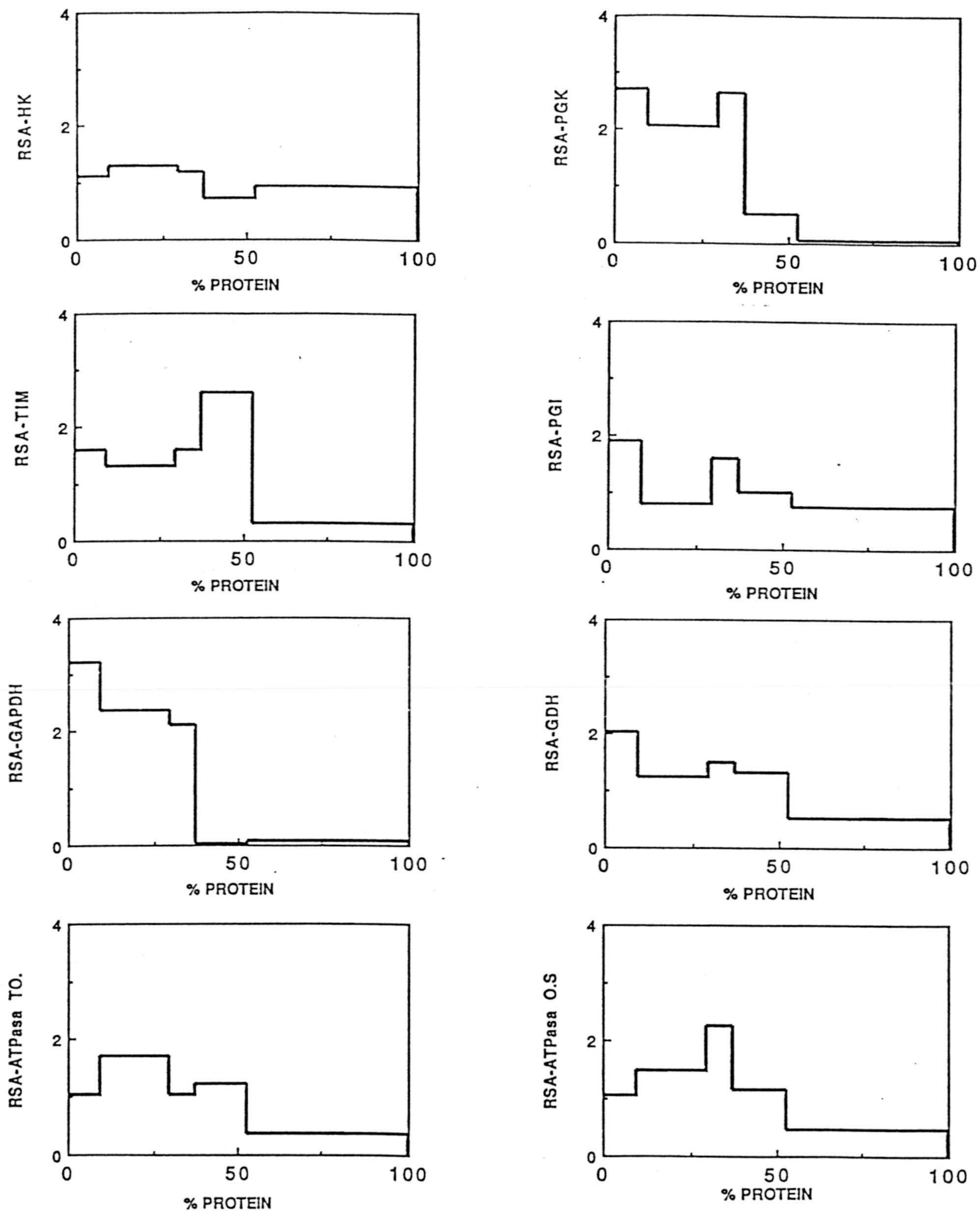


Figura 3. *Phytomonas* aisladas de *Cocos nucifera*. Perfil de distribución de las enzimas ensayadas en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Las fracciones obtenidas son, de derecha a izquierda, nuclear, orgánulos grandes, orgánulos pequeños, microsomal y citosólica.



Los resultados fueron confirmados con los obtenidos tras el fraccionamiento del extracto postnuclear por centrifugación en gradiente lineal de sacarosa. Las enzimas glucolíticas de las *Phytomonas* aisladas de tomate estaban ligadas a una densidad de  $1.24 \text{ g cm}^{-3}$ , densidad a la que se ha visto están asociados los glicosomas (Sánchez-Moreno y col., 1992), sin embargo al analizar las *Phytomonas* del cocotero se obtenía un patrón de distribución de densidad muy diferente.

El principal interés de este estudio era demostrar que las *Phytomonas* aisladas de frutos y del floema presentan glicosomas y que en estos aislados, la vía glucolítica está compartimentalizada de manera similar a la de *Phytomonas* aisladas de *E. characias*, previamente estudiada (Sánchez-Moreno y col., 1992).

Las enzimas glucolíticas, en el caso de los aislados de fruto, estaban asociadas a los glicosomas a juzgar por su comportamiento en los experimentos de centrifugación diferencial y de gradiente. En el caso de las *Phytomonas* aisladas del floema, el perfil más heterogéneo de las enzimas glucolíticas, podría estar relacionado con esta localización intrafloemática, asociada a una patología clara.

#### 4.3.3. Estudios de respiración mitocondrial

Los experimentos de respiración mitocondrial fueron realizados en un electrodo de oxígeno. Cuando las mitocondrias de los flagelados estudiados, fueron mezcladas con glicerol-3-fosfato, se observaba un aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial (Figura 4a, 4b). Esta especial respiración no pudo ser inhibida por los bloqueadores clásicos de la cadena respiratoria, tales como antimicina, cianuro y acida. Mientras que el ácido salicilhidroxámico, inhibidor de la respiración insensible a cianuro, tanto en plantas como en tripanosomátidos (Opperdoes, 1997), inhibía completamente la respiración. Esto indica que en estos flagelados la vía glucolítica sirve como la principal, si no la única, fuente de ATP dentro de la célula.



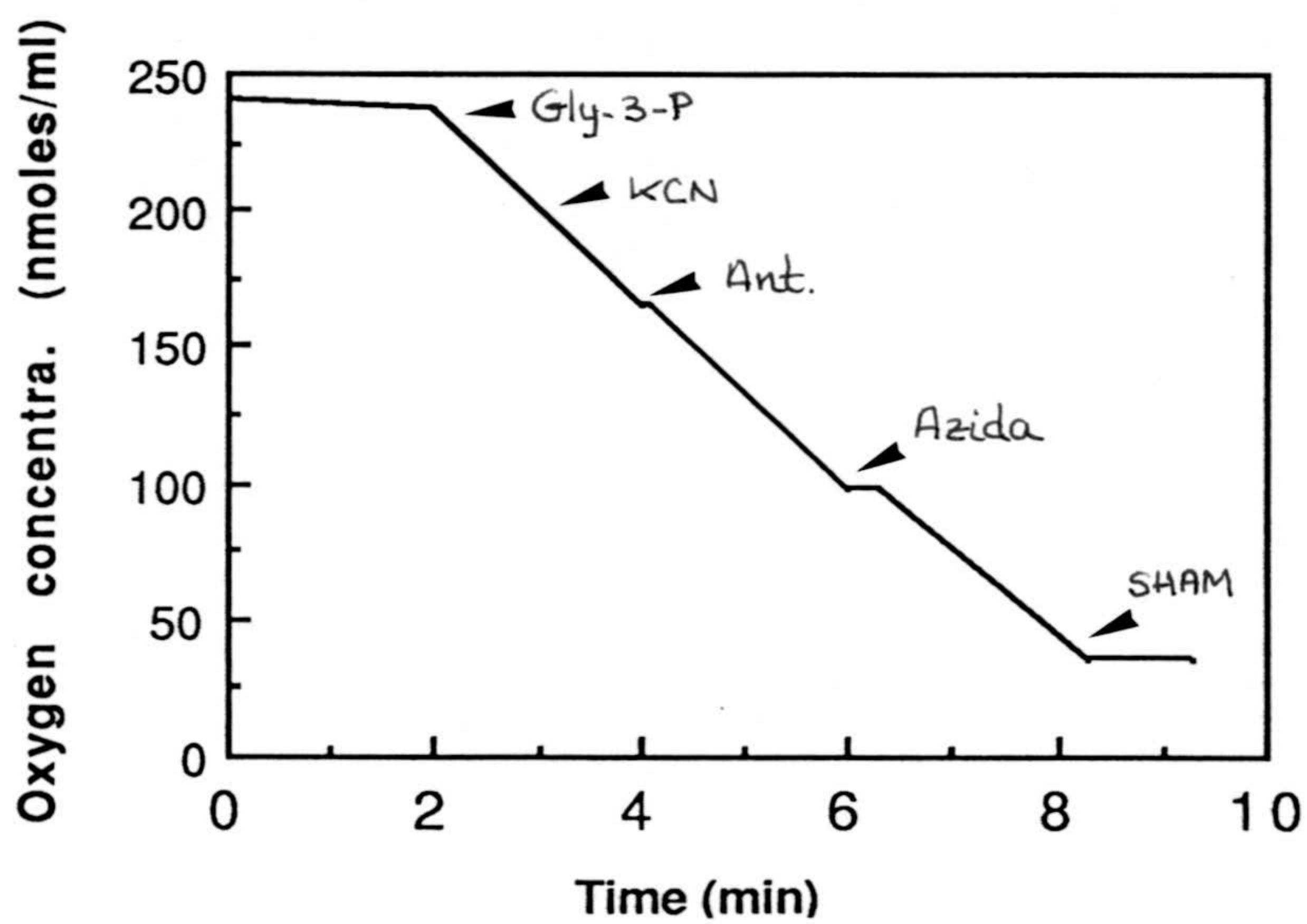
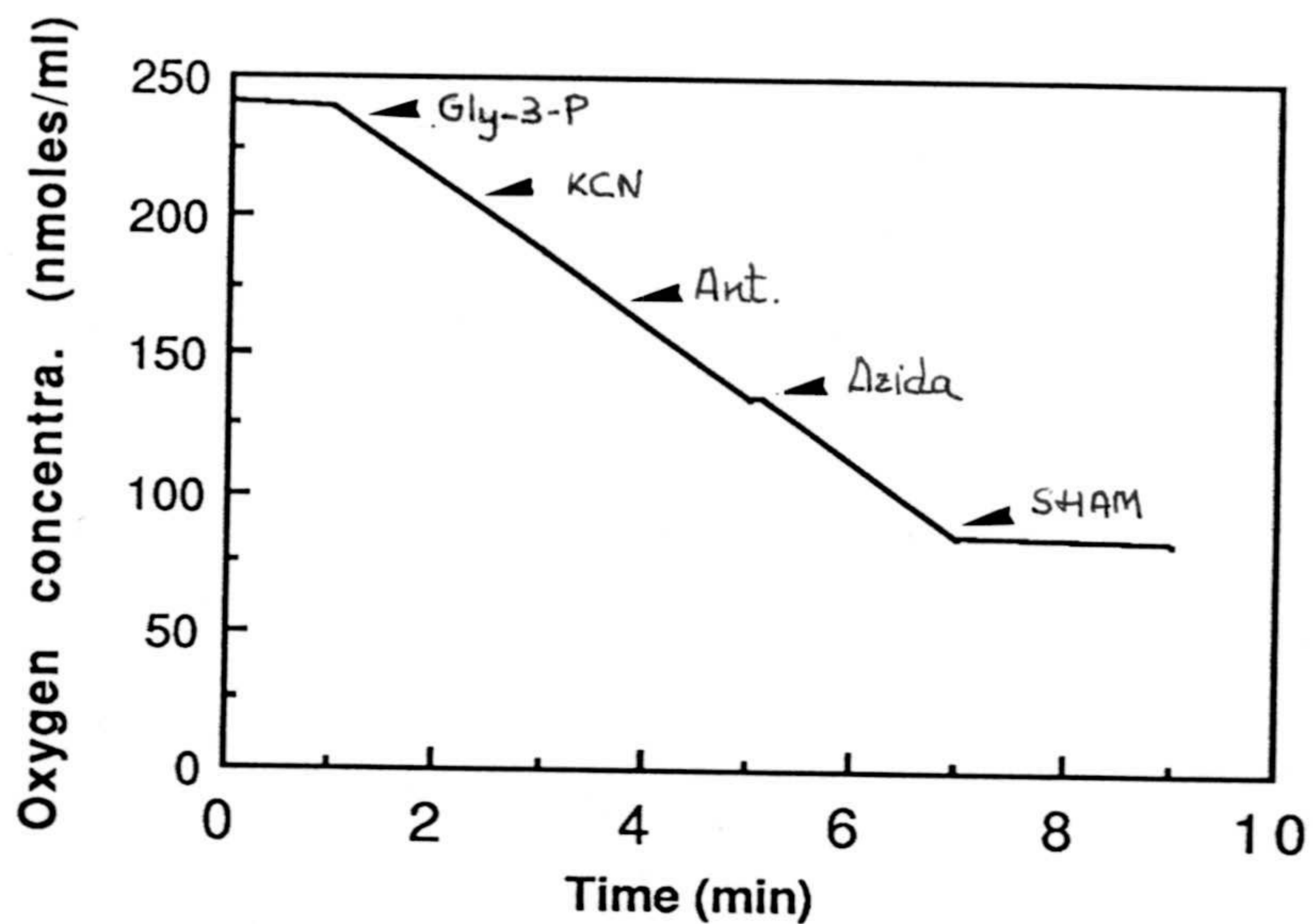


Figura 4. Medida del consumo de oxígeno detectada en la fracción mitocondrial en *Phytomonas* de tomate (a) y de palma de cocotero (b).



**Conclusiones**



## Capítulo 5

### 5. Conclusiones

1ª Se han encontrado protozoos parasitos pertenecientes al Orden Kinetoplastida, en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y chirimoya (*Annona cherimolia*) en el sureste español.

Los flagelados se han detectado siempre en los frutos, nunca han sido observados en el floema o en otras partes de las plantas.

2ª Estos flagelados han sido aislados y adaptados al cultivo "in vitro" en un medio monobásico. Presentando una morfología y ultraestructura similar a la de otras especies del genero *Phytomonas*.

3ª Mediante la caracterización por técnicas de aglutinación por lectinas, análisis isoenzimático y perfil de restricción del kDNA hemos podido diferenciar nuestros aislados de los obtenidos de plantas laticíferas, empleadas como control.

4ª Mediante técnicas bioquímicas se ha intentado su caracterización con logros más que probados.



## Bibliografía



## Capítulo 6

### 6. Bibliografía

Adroher, F. J., Osuna, A. & Lupiáñez, J. A. 1987. Fructose 1,6-bis-phosphatase activity in two *Trypanosoma cruzi* morphological forms. *J. Parasitol.*, 73: 438-441.

Adroher, F. J., Lupiáñez, J. A. & Osuna, A. 1988. Influence of saccharides and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Differ.*, 22: 165-170.

Ahomadegbe, J. C., Dollet, M., Coulaud, D., Gargani, D. and Riou, G. 1990. Kinetoplast DNA permits characterization of pathogenic plant trypanosomes of economic importance. *Biol. Cell.* 70:167-176.

Ahomadegbe, J. C., Dollet, M. and Riou, G. 1992. Kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for the Hartrot disease in coconut trees. *Biol. Cell* 74:273-279.

Aragão, H. de B. 1927. Sur un flagellé du latex de *Manihot palmata*, *Phytomonas francai* n. sp. *C. R. Soc. Biol.* 97:1077-1080.

Aragão, H. de B. 1931. Sur un flagellé du latex du *Manihot palmata*, *Phytomonas francai* II. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 25:303-306.

Asgarali, J. and Ramkalup, P. 1985. Study of *Lincus* sp. (Pentatomidae) as a possible vector of hartrot in coconut. *De Surinaamse Landbouw* 33:56-61.

Attias, M. and de Souza, W. 1986. Axenic cultivation and ultrastructural study of a *Phytomonas* sp. isolated from the milkweed plant *Euphorbia hyssopifolia*. *J. Protozool.* 33(1):84-87.

Attias, M., Roitman, I., Camargo, E. P., Dollet, M. and de Souza, W. 1988. Comparative analysis of the structure of four isolates of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 35(3):365-70.

Ayala, S. C., de Quintero, O. B. and Barreto, P. 1975. Trypanosomatideos de plantas laticíferas y sus insectos transmisores en Colombia y Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 23:5-15.

Bacchi, C. J., Hutner, S. H., Ciaccio, E. I. & Marcus, S. M. 1968. O<sub>2</sub>-Polarographic studies on soluble and mitochondrial enzymes of *Crithidia fasciculata*,



glycerophosphate enzymes. *J. Protozool.*, 15: 576-584.

Bergmeyer, H. V. 1988. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag-Chemie/Academic Press. New York.

Bouet, G. and Roubaud, E. 1911. Sur le présence au Dahomey et le mode de transmission du *Leptomonas davidi* Lafont, flagellé parasite des euphorbiacées. *C. R. Soc. Biol.* 70:55-57.

Brun, R. and Schönenberger, M. 1979. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Tropica* 36:289-292.

Brunk, U., Collins, V.P., y Arro, E., The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM, *Journal of Microscopy*, 123:121, 1981.

Camargo, E. P., Coelho, J. A., Moraes, G. & Figueiredo, E. N. 1978. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp. Parasit.*, 46: 141-144.

Camargo, E. P., Silva, S., Roitman, I., De Souza, W., Jankevicius, J. V. and Dollet, M. 1987. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 34:439-441.

Cannata, J. J. B., Valle, E., Docampo, R. and Cazzullo, J. J. 1982. Subcellular localization of phosphoenol pyruvate carboxykinase in the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6:151-160.

Cazzullo, J. J. 1984. Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B(3): 309-320.

Cazzullo, J. J., Franke de Cazzullo, B. M., Engel, J. C. & Cannata, J. J. B. 1985. Ends products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16: 329-343.

Conchon, I., Campaner, M., Sbravate, C. and Camargo, E. P. 1989. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. *J. Protozool.* 36:412-14.

Da Silva, J. B. T. and Roitman I. 1990. Growth of *Phytomonas serpens* in a defined medium; nutritional requirements. *J. Protozool.* 37(6):521-23.

Desmier de Chenon, R. 1984. Recherches sur le genre *Lincus* Stal, Hemiptera, Pentatomidae, Discocephalinae, et son role éventuel dans la transmission de la marchitez du palmier à huile et du hartrot du cocotier. *Oleagineux* 39:1-6.



- Dixon, H. 1966. Blood platelets as a source of enzyme activity in washed trypanosomes suspensions. *Nature* 210:428.
- Dollet, M. 1984. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). *Ann. Rev. Phytopathol.* 22:115-32.
- Dollet, M. 1991. Infection of plants by flagellate protozoa (*Phytomonas spp.*, trypanosomatidae). In: *Electron Microscopy of plant Pathogens* (ed. K. Mendgen and D. E. Lessemann) Springer-Verlag, 307-16.
- Dollet, M. 1994. Plant trypanosomes case study. In: *Identification and Characterization of Pest Organisms* (ed. D. L. Hawksworth). CAB International, pp. 415-426.
- Dollet, M. and Lopez, G. 1978. Etude sur l'association de protozoaires flagellés à la marchitez sorpresiva du palmier à huile en Amérique du Sud. *Oléagineux* 33:209-217.
- Dollet, M. and Wallace, F. G. 1987. Compte Rendu du Premier *Phytomonas* Workshop, Cayenne, Mars 1987. *Oléagineux* 42:461-468.
- Dollet, M. and Gargani, D. 1989. Mixed infection of *Asclepias curassavica* L. in Ecuador: *Rhabdovirus*-like particles and *Phytomonas sp.* *J. Phytopathology* 125:269-273.
- Dollet, M., Gianotti, J. and Ollagnier, M. 1977. Observation de protozoaires flagellés dans les tubes cribles de palmiers à huiles malades. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* 284:643-645.
- Dollet, M., Cambrony, D. and Gargani, D. 1982. Culture axénique in vitro de *Phytomonas sp.* (trypanosomatidae) d'Euphorbe transmis par *Stenocephalus agilis* Scop (Coreide). *C. R. Acad. Sci. Ser. III.* 295:547-550.
- Dollet, M., Cambrony, D. and Dzido, J. L. 1983. Observations of flagellate protozoa (*Phytomonas sp.*) in the xylem of *Euphorbia lasiocarpa* in Ecuador. *Can. J. Bot.* 61:237-240.
- Donovan, C. 1909. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorrhinus*). *Lancet* 177:1495-1496.
- Echlin, P., Sputter coating techniques for S.E.M., Scanning Electron Microscopy, (I):217, IITRI, Chicago. 1975.
- Fairlamb, A. H. and Bowman, I. B. R. 1977. The isolation and characterization of particulate sn-glycerol-3-phosphate oxidase from *Trypanosoma brucei*. *Int. J.*



Biochem. 8:659-668.

Fairlamb, A. H., Opperdoes, F. R. 1986. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes with special reference to the glycosome. In Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells, ed. M. J. Morgan, pp. 183-224. New York/ London: Plenum.

Fairlamb, A. H., Opperdoes, F. R. and Borst, P. 1977. New approach to screening drugs for activity against African trypanosomes. Nature 265:270-271.

Fantham, H. B. 1925. Protozoa found in South Africa. VIII. Soc. Afric. J. Sci. 22:346-354.

Fernández-Becerra, C., Sánchez-Moreno, M., Dollet, M. and Osuna, A. 1993. Characterization of *Phytomonas* isolated from *Lycopersicon esculentum* and *Anona cherimolla* fruits from south-eastern Spain by DNA-kinetoplast analysis. IX Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Ref.: Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88:285.

Flynn, I. W. and Bowman, I. B. R. 1973. The metabolism of carbohydrate by pleomorphic African trypanosomes. Comp. Biochem. Physiol. 45B:25-42.

Franca, C. 1914. La flagellose des Euphorbes. Archiv. Protistenk. 34:108-132.

Franca, C. 1920. La flagellose des euphorbes II. Ann. Inst. Pasteur 34:432-465.

Franca, C. 1921. Sur deux phytoflagellés (*L. elmassiani* et *L. bordasi* sp. n.). Ann. Soc. Belge Med. Trop. 1:245-254.

Franchini, G. 1923. Sur un protozoaire d'*Euphorbia cereiformes* et sur sa culture. Bull. Soc. Pathol. Exot. 16:642-646.

Franchini, G. 1931. Etude sur un flagellé special du latex d'un figuier de l'Erythrée (*Ficus hochstetteri* (Ng.) A. Rich). Bull. Soc. Pathol. Exot. 24:843-848.

Gargani, D., Menara, A., Segur, C. and Dollet, M. 1992. In vitro cultivation of *Phytomonas* from latex and phloem-restricted *Phytomonas*. Oléagineux 47:596.

Gibbs, A. J. 1957. *Leptomonas serpens* n.sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. Parasitol. 47: 297-303.

Grant, P. T. and Sargent, J. R. 1960. Properties of L-a-glycerophosphate oxidase and its role in the respiration of *Trypanosoma rhodesiensi*. Biochem. J. 76:229-237.

Hanson, W. L., McGhee, R. B. and Blake, J. D. 1966. Experimental infection of



various latex plants of the family Asclepiadaceae with *Phytononas elmassiani*. J. Protozool. 13:324-327.

Hart, D. T. and Opperdoes, F. R. 1984. The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. Mol. Biochem. Parasitol. 13:159-172.

Holmes, F. O. 1925. The relation of *Herpetomonas elmassiani* (Migone) to its plant and insect hosts. Biol. Bull. 49:323-337.

Holmes, F. O. 1925. Non-pathogenicity of the milkweed flagellate in Maryland. Phytopathology 15:294-296.

Holmes, F. O. 1930. Protozoa of latex plants. In: Problems and Methods of Research in Protozoology (R. Hegner and J. Andrews, eds.) pp. 257-275. Macmillan, New York.

Holmes, F. O. 1931. *Herpetomonas bancrofti* n. sp. from the latex of a *Ficus* in Queensland. Contr. Boyce Thompson Inst. Plant. Res. 3:375-383.

Jankevicius, J. V., Jankevicius, S., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L. A., Teixeira, M. M. G., Freymuller, E, and Camargo, E. P. 1989. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. J. Protozool. 36(3):265-271.

Kastelein, P. and Pasardi, M. 1988. The axenic cultivation of *Phytomonas* flagellates (Trypanosomatidae) associated with laticiferous plants in Suriname. J. Protozool. 35:533-536.

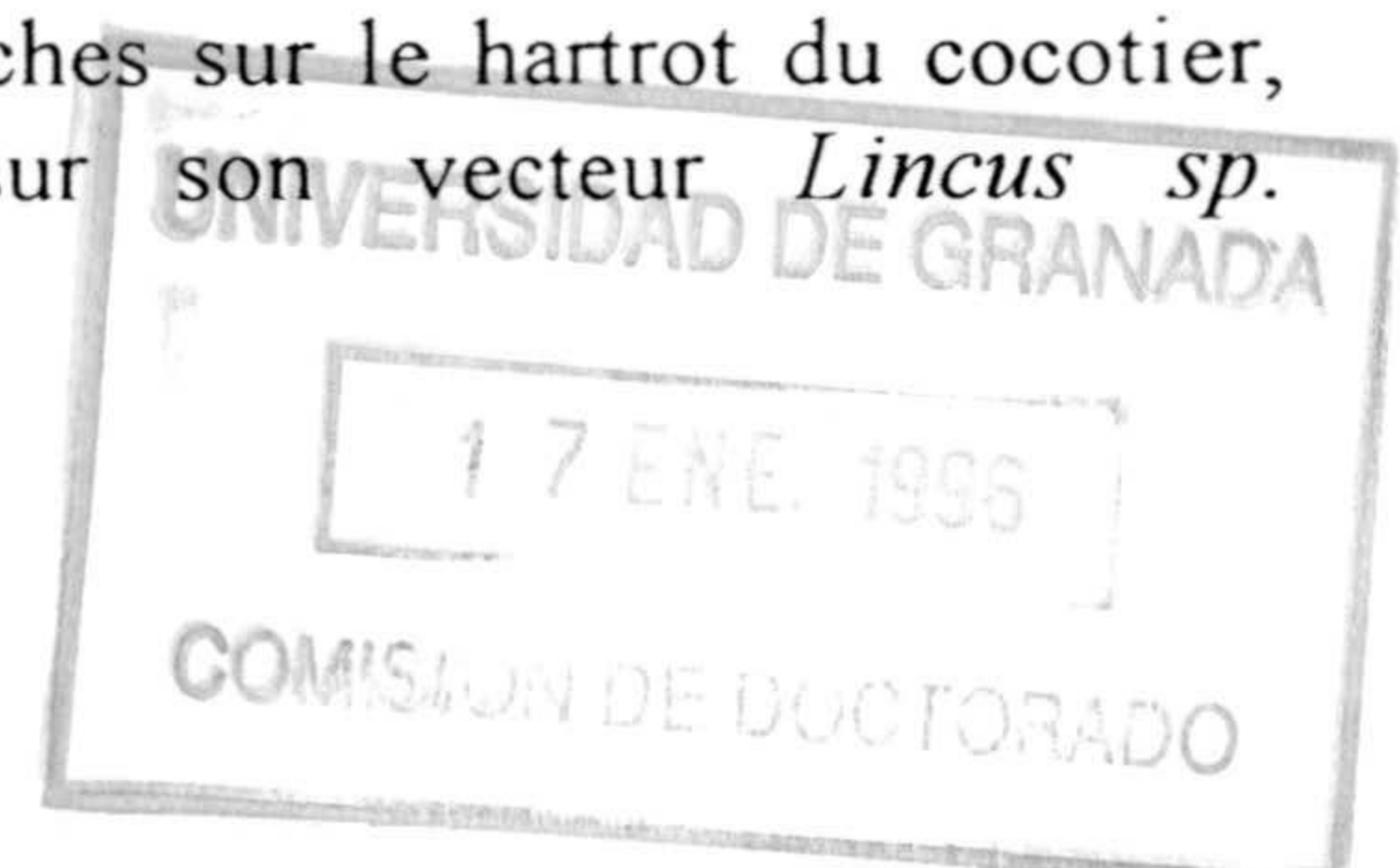
Kitajima, E. W., Vainstein, M. H. and Silveira, J. S. M. 1986. Flagellate protozoan associated with poor development of the root system of cassava in the Espiritu Santo State, Brazil. Phytopathol. 96:638-642.

Lafont, A. 1909. Sur la présence d'un parasite de la classe des flagellés dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. C. R. Soc. Biol. 66:1011-1013.

Lafont, A. 1910. Sur la présence d'un *Leptomonas*, parasite de la classe des flagellés, dans le latex de trois Euphorbiacées. Ann. Inst. Pasteur 24:205-219.

Lafont, A. 1911. sur la transmission du *Leptomonas davidi* des euphorbes par un hémiptère, *Nysius euphorbiae*. C. R. Soc. Biol. 70:58-59.

Louise, C., Dollet, M. and Mariau, D. 1986. Recherches sur le hartrot du cocotier, maladie à *Phytomonas* (Trypanosomatidae) et sur son vecteur *Lincus* sp.





(Pentatomidae) en Guyane. *Oléagineux* 41:437-46.

McGhee, R. B. and Hanson, W. L. 1964. Comparison of the life cycle of *Leptomonas oncopelti* and *Phytomonas elmassiani*. *J. Protozool.* 11(4):555-562.

McGhee, R. B. and Hanson, W. L. 1971. Changes in structure of *Phytomonas elmassiani* in experimental infections of apocynaceae, a presumably foreign plant host. *J. Protozool.* 18:80-81.

McGhee, R. B. and Postell, F. J. 1976. Axenic cultivation of *Phytomonas davidi* Lafont (Trypanosomatidae), a symbiote of laticiferous plants (Euphorbiaceae). *J. Protozool.* 23:238-241.

McGhee, R. B. and McGhee, A. H. 1979. Biology and structure of *Phytomonas staheli* sp. n., a trypanosomatid located in sieve tubes of coconut and oil palms. *J. Protozool.* 26:348-351.

McGhee, R. B. and Postell, F. J. 1982. Transmission of the trypanosomatid flagellate *Phytomonas davidi*, a symbiont of the Euphorbiaceae, by the hemipteran bug, *Pachybrachius bilobatus scutellatus*. *J. Protozool.* 29:445-448.

Menara, A., Dollet, M., Gargani, D. and Louise, C. 1988. Culture in vitro sur cellules d'invertébrés, des *Phytomonas* sp. (trypanosomatidae) associés au Hartrot, maladie du cocotier. *C. R. Acad. Sci. Ser. III.* 307:597-602.

Migone, L. E. 1916. Un nouveau flagellé des plantes, *Leptomonas elmassiani*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 9:356-359.

Molyneux, D. H. and Ashford, R. W. 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*. In: *The biology of Trypanosoma and Leishmania*, parasites of man and domestic animals (D. H. Molyneux and R. W. Ashford, eds.). Taylor and Francis, London. Pp. 3-13.

Monestier, A., Sánchez-Moreno, M., Fernández-Becerra, C. y Osuna, A. 1992. Aislamiento de *Phytomonas* sp. en explotaciones agrarias del sur de España. Second *Phytomonas* workshop. Ref.: Vickerman, K. and Dollet, M. *Oléagineux* 47:595-597.

Morel, C., Chiari, E., Camargo, E. P., Mattei, D. M., Romamha, A. J. and Simpson, L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6810-6814.

Mukkada, A. J. 1985. Energy metabolism in *Leishmania*. In: *Leishmaniasis*. (Chang/Brey eds.), Elsevier Science Publishers. B. V. Biomedical Division, 49-64.



- Nieschulz, O. 1924. Zur morphologie der kulturformen einer *Herpetomonas* aus *Euphorbia cereiformis*. Zentralbl. Bakt. Abt. 61:311-316.
- Noguchi, H. and Tilden, E. B. 1926. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias. I. Cultivation of herpetomonads from insects and plants. J. Exp. Med. 44:307-325.
- Opperdoes, F. R. 1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Annu. Rev. Microbiol. 41:127-151.
- Opperdoes, F. R. and Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. FEBS Lett. 80:360-364.
- Opperdoes, F. R., Borst, P. and Fonck, K. 1976. The potencial use of inhibitoes of glycerol-3-phosphate oxidase for chemotherapy of African trypanosomiasis. FEBS Lett. 62:169-172.
- Opperdoes, F. R., Borst, P., Bakker, S. and Leene, W. 1977a. Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD<sup>+</sup>-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 76:29-39.
- Opperdoes, F. R., Borst, P. and Spits, H. 1977b. Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 76:21-28.
- Osuna, A., Jiménez-Ortiz, A. & Lozano, J. 1979. Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Ibér. Parasitol., 36: 129-133.
- Osuna, A., Adroher, F.J. & Lupiáñez, J. A. 1990. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Differ., 30: 89-95.
- Parthasarathy, M. V., van Slobbe, W. G. 1978. Hartrot of fatal wilt of palms. I. Coconuts (*Cocos nucifera*). Principes 22:3-14.
- Parthasarathy, M. V., van Slobbe, W. G. and Soudant, C. 1976. Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. Science 192:1346-48.
- Paulin, J. J. and McGhee, R. B. 1971. An structural study of the trypanosomatid, *Phytomonas elmassiani*, from the milkweed, *Asclepias syriaca*. J. Parasitol. 57:1279-1287.
- Petry, K., Schottelius, J. and Dollet, M. 1987. Differentiation of *Phytomonas* sp. and



- lower trypanosomatids (*Herpetomonas*, *Crithidia*) by agglutination tests with lectins. Parasitol. Res. 74:1-4.
- Petry, K., Gargani, D., Baltz, Th., Kastelein, P. and Dollet, M. 1989. Use of monoclonal antibodies for differentiation of different isolates of *Phytomonas* (plant trypanosomatids). J. Phytopathology 126:59-68.
- Podlipaev, S. A. 1986. *Phytomonas elmassiani* (Mastigophora: Trypanosomadida) from the plant *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan. Proc. Zool. Inst. USSR Acad. Sci. Leningrad 144:61-65. (In Russian).
- Reichenow, E. 1940. Ostafrikanische Beobachtungen an Trypanosomiden. Arch. Protistenk. 94:267-287.
- Resende, M. L. V., Borges, R. E. L., Bezerra, J. L. and Oliveira, D. P. 1986. Transmissão da murcha de *Phytomonas* a coqueiros e dendezeiros por *Lincus lobulliger* Breddin, 1908 (Hemiptera, Pentatomidae): Resultados preliminares. Rev. Theobroma 16:149-154.
- Rodhain, J. and Bequaert, J. 1911. Présence de *Leptomonas* dans le latex d'une Euphorbe congolaise. Bull. Soc. Pathol. Exot. 4:198-200.
- Roitman, C., Roitman, I. and Azevedo, H. P. 1972. Growth of an insect trypanosomatid at 37 °C in a defined medium. J. Protozool. 19:346-349.
- Ruiz, A. 1958. Contribución al estudio del género *Phytomonas* Donovan en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 6:87-93.
- Ruiz, L. M., López, M., Osuna, A., Gamarro, F., Castanys, S. & Craciunescu, D. 1988. Activity of rhodium (III) complexes against *Trypanosoma cruzi*. Drug Research, 2: 312-15.
- Ryley, J. F. 1962. Studies on the metabolism of protozoa. 9. Comparative metabolism of bloodstream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiensi*. Biochem. J. 85:211-223.
- Sanchez-Moreno, M., Lasztity, D., Coppens, I. and Opperdoes, F. R. 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Mol. Biochem. Parasitol. 54:185-200.
- Sbravate, C., Campaner, M., Camargo, L. E. A., Conchon, I., Teixeira, M. M. G. and Camargo, E. P. 1989. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous Hemiptera in Brazil. J. Protozool. 36:543-547.



- Stahel, G. 1931. Zur kenntnis der Siebröhrenkrankheit (Phloemnekrose) des Kaffeebaumes in Surinam. I. Phytopath. Z. 4:65-82.
- Teixeira, M. and Camargo, E. P. 1989. Monoclonal antibodies for the identification of the genus *Phytomonas*. J. Protozool. 36(3):262-264.
- Thompson, S. N. 1991. Applications of nuclear magnetic resonance in parasitology. J. Parasitol., 77(1): 1-20.
- Vainstein, M. H. and Roitman, I. 1986. Cultivation of *Phytomonas francai* associated with poor development of root system of cassava. J. Protozool. 33:511-13.
- Vainstein, M. H., Tavares da Silva, J. B., Goncalves de Lima, V. M. Q., Roitman, I., De Souza, W., Dollet, M. and Camargo, E. P. 1987. Electrophoretic analysis of isoenzymes in the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. J. Protozool. 34(4):442-444.
- Van Slobbe, W. G., Parthasarathy, M. V. and Heslen, J. A. J. 1978. Hartrot or fatal wilt of palms. II. Oil palm (*Elaeis guineensis*) and other palms. Principes 22:15-25.
- Vermeulen, H. 1963. A wilt of *Coffea liberica* in Surinam and its association with a flagellate, *Phytomonas leptovosorum* Stahel. J. Protozool. 10:216-222.
- Vermuelen, H. 1968. Investigations into the cause of the phloem necrosis disease of *Coffea liberica* in Surinam, South America. Neth. J. Plant Pathol. 74:202-218.
- Vickerman, K. 1962. Observations on the life cycle of *Phytomonas elmassiani* (Migone) in East Africa. J. Protozool. 9:26-33.
- Von Brand, T. 1979. Biochemistry and Physiology of endoparasites. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Wallace, F. G., Roitman, I. and Camargo, E. P. 1992. Trypanosomatids of plants. In: Parasitic Protozoa. (J. K. Kreier and J. R. Baker, eds.) Academic Press, New York. Vol:2. Pp.55-84.
- Waters, H. 1978. A wilt disease of coconuts from Trinidad associated with *Phytomonas* sp., a sieve tube-restricted protozoan flagellate. Ann. Appl. Biol. 90:293-302.
- Yunker, C. E., Vaughn, J. L. and Cory, J. 1967. Adaptation of an insect cell line (Grace's Antheraea cells) to medium free of insect hemolymph. Science 155:1565-1566.