

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL



Presencia de fitoplasmosis en Jocote de Corona (Anacardiaceae: *Spondias purpurea* L.) e interacción con insectos Homoptera: *Cicadellidae* (*Graphocephala* sp y *Coelidia* sp) en el volcán Chinchontepec, San Vicente y otros departamentos de El Salvador, C. A.

POR:

**JULIO CESAR BRAN HERNANDEZ
ENMANUEL DE JESUS CUADRA CAMPOS
ANGELA NOEMI LÓPEZ MÓNICO**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

SAN SALVADOR ABRIL DE 2009

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. AGR Y LIC. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÓNOMICAS

DECANO

DR. E ING. AGR. REINALDO ADALBERTO LOPEZ LANDAVERDE

SECRETARIO

ING. AGR. Y MSc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

ii

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL

ING. AGR. MSc. RAFAEL ANTONIO MENJIVAR ROSA.

DOCENTES DIRECTORES

ING. AGR. LEOPOLDO SERRANO CERVANTES

ING. AGR. JOSE MIGUEL SERMEÑO CHICAS

ING. AGR. JOSE LUIS MAYEN RAFAEL

iii
RESUMEN

La investigación se desarrollo en Cantón San Antonio Tras El Cerro, Municipio de San Vicente, Departamento de San Vicente a 985 msnm. Desarrollada en febrero de 2008 a febrero de 2009. Se sembraron estacas de Jocote de Corona (*Spondias purpurea*) en bolsas de polietileno y confinadas en jaulas cilíndricas siendo objeto de observación, registro y análisis de fitoplasma cada 8 días durante 1 mes, después de introducidos los insectos inmaduros y adultos, los cuales fueron colectados en áreas altamente infectadas con fitoplasma en el Volcán de Santa Ana en un rango de 990 a 1528 msnm. Los análisis se efectuaron en el laboratorio de biología molecular del CENTA*, para determinar la presencia del fitopatógeno en las estacas. Se extrajo ADN foliar y radicular utilizando la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con los cebadores (“primers”) universales P1/P7 y R16mR1/R16mF2 en PCR-Nested, que detectan específicamente fitoplasma, obteniéndose que de un total de 214 muestras analizadas en tejidos de Jocote de Corona, 132 resultaron positivas, lo cual confirma la transmisión del fitoplasma por el insecto *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.*, también se analizaron un total de 28 muestras de insectos encontrándose que 15 de estas resultaron positivas confirmando la adquisición de fitoplasma por el insecto en su estado ninfal y adulto; además con el apoyo de DGSVA** se muestrearon y georeferenciaron con GPS (E-trex), fincas altamente productoras en la zona Occidental, Paracentral y Oriental del país, elaborándose un mapa planimetrico de las áreas muestreadas mediante el software ArcGIS v. 9.0.

AGRADECIMIENTOS

1. A Dios padre todo poderoso, por concedernos bendición; la oportunidad de superarnos en un grado académico lleno de mucho esfuerzo y sacrificio y por ser nuestro guía para llevarlo a un exitoso termino.
2. A nuestros padres y familiares; por brindarnos todo el apoyo necesario para que nosotros lográramos alcanzar nuestra meta.
3. A nuestros asesores: Ing. Agr. Leopoldo Serrano Cervantes, Ing. Agr. José Miguel Sermeño Chicas y Ing. Agr. José Luis Mayen, por apoyarnos con todos los conocimientos y recursos necesarios para que se hiciera posible el desarrollo de ésta investigación.
4. Al Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central (PROMIPAC), por darnos apoyo económico y técnico para la ejecución del trabajo de investigación.
5. Al Ing. Agr. M Sc. Elmer Esquivel jefe de sanidad vegetal; de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA) por darnos el apoyo económico para la ejecución del trabajo de investigación.
6. A los Ing. Agr. Vielman y Guillen (DGSVA) por darnos su apoyo con transporte para la ejecución del trabajo de investigación, de igual manera al Ing. Agr. Nelson Pérez y colaboradores técnicos, por la colecta de follaje en arboles en el Departamento de Sonsonate.

7. A Dagoberto José López Mónico (Q.D.D.G) por darnos apoyo, momentos agradables, mano de obra y alimentación en la preparación y montaje del experimento.
8. Al señor Alejandro Serrano y familia, por concedernos utilizar un espacio en su vivienda para guardar materiales de campo y donar las estacas de jocote para la investigación.
9. Al señor Álvaro Rodríguez Guardado por proporcionarnos el transporte para los viajes a San Vicente.
10. A Amanda Duke, por brindarnos apoyo y ayuda en los viajes a San Vicente.
11. A Pedro Orellana, por apoyarnos en la investigación.
12. A Luis, Toño y Manuel por habernos dado un momento agradable y transporte
13. Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) por compartir con nosotros parte de sus instalaciones y equipo para esta investigación.
14. Al Ing. Agr. Adamid Beltrán, Técnico del Programa de Frutales del (CENTA) por compartir sus conocimientos y asesorarnos en la técnica de extracción de ADN mediante PCR y el acompañamiento en muestreos de campo.
15. A la Ing. Agr. Dora Antonia Villeda Castillo, quien puso a disposición sus conocimientos para la realización de ensayos sobre la evaluación de tres concentraciones de hipoclorito de sodio en la sobrevivencia de explantes in Vitro de jocote de corona (*Spondias purpurea* L.).

16. A la Dra. María Mercedes Roca, Profesora Asociada en Fitoprotección y Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana (ZAMORANO) por facilitarnos información con base a su experiencia para el trabajo de investigación.
17. A la Dra. Priscila Henríquez (IICA) por facilitarnos sus conocimientos con base a su experiencia para enriquecer el trabajo de investigación.
18. A la Dra. Vianney de Abrego. Especialista Biología Molecular. CENSALUD-UES por facilitarnos sus conocimientos con base a su experiencia para enriquecer el trabajo de investigación.
19. Al Ing. Agr. Miguel Hernández, Unidad De Posgrado de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador por la impresión de los mapas, de igual manera al Br. Irvin David Cruz por brindar las bases de datos para la elaboración de los mapas.
20. Al Ing. Agr. Adán Hernández, por proporcionarnos los tubetes de café utilizados en la micro jaula.
21. Al Ing. Agr. Dagoberto Pérez, por habernos proporcionado transporte para el traslado de las jaulas de San Salvador a San Vicente.
22. A los docentes de nuestra Facultad; por brindarnos de una u otra forma sus conocimientos y valores; y contribuir así en nuestra formación académica.
23. A la Asociación de Ciencias Agronómicas (ASECAS) especialmente a Fabrizio Urrutia por colaboración en la búsqueda de financiamiento para esta tesis.

DEDICATORIA

- **A Dios** Todo poderoso, por permitirme gozar de salud y por iluminarme durante mi camino, por darme paz y tranquilidad en los momentos justos de tomar decisiones y permitirme alcanzar el éxito de culminar mi carrera.

- **A mis padres Guillermo Hernández de Leon (Q.D.D.G.) Elba Irene Bran Flores**, por todo su apoyo, comprensión esfuerzo y sacrificio que realizaron durante mi formación académica y personal y sobre todo por creer en mi y enseñarme valores para luchar sobre toda adversidad que se me presente.

- **A mis hermanas Aida Esperanza Hernández y Edith Noemí Hernández** , por brindarme todo su apoyo , comprensión, cariño y ser la columna económica en mi educación académica.

-**A mis compañeros de tesis** por todos los buenos y malos momentos que pasamos y poder compartir la experiencia de trabajo en equipo, de poder aprender que cuando crees que ya tienes todas las respuestas ,de pronto, cambian todas las preguntas ; por su confianza y apoyo para poder salir adelante.

- **A todos los docentes** que nos formaron y compartieron sus conocimientos en nuestra carrera.

- **A todos mis amigos y compañeros de la Universidad** por compartir buenos y malos momentos, que Dios los bendiga a todos en sus vidas siempre.

Julio César Bran Hernández.

DEDICATORIA

- **A Dios** por estar conmigo siempre en los momentos más difíciles y por iluminar mi camino durante mi carrera.
- **A mis padres** José Antonio Cuadra y María de los Santos Campos por haberme formado bajo buenos principios, por apoyarme siempre para salir adelante y enseñarme que en la vida todo tiene su recompensa.
- **A mi hermanas** Rubia Marlene por ábreme brinda su apoyo económico, moral y espiritual desde niño y por haber forjado lo que ahora soy, a María Antonia por enseñarme la disciplina y el valor del estudio, a Reina Margarita por ser parte de las personas que me comprendieron y me aconsejaron a salir adelante siempre.
- **A mis tíos** por creer en mí e impulsarme cada día para salir adelante en la vida.
- **A mis amigos y amigas** Aarón Roscala, Luis Walter Escobar, Rafael Cano, Josué, al Lic. Omar, Walter Santos, Walter Vides, Castro, a Patricia Castillo, Sara, Marcela Yulissa, y muy en especial a Carlos Roscala y Rafael Q.D.D.G, por impulsarme a sacar mi carrera.
- **A mis compañeros y compañeras de la Universidad** Giovanni Nuñez y Daniel Yanes por hacer que las clases fueran divertidas, Irvin Cruz por apoyarme en mis trabajos, a Tomas Carrillo por enseñarme que la paciencia es lo más importante, a Moisés Campos por enseñarme a comprender a los demás, a Nuvia por brindarme su amistad y comprensión, a Dalila y Altagracia por ser muy buenas amigas y apoyarme en momentos difíciles, a Paty y Alondra por pasar momentos divertidos en la facultad.
- **A los Ingenieros** Leopoldo, Sermeño, Mayen y Doris por su apoyo y experiencia compartida, al Ing. Helmer Esquibel por confiar en nosotros, al Ing. Adamid por darnos su apoyo, al Ing. Miguel Hernández por su colaboración y a todos los Ingenieros que fueron parte de mi formación profesional
- **A mis compañeros de tesis** por compartir muchos momentos de trabajo y diversión.
Enmanuel de Jesús Cuadra Campos

DEDICATORIA

- **A Dios** Todo poderoso, por darme sabiduría, tenacidad y entendimiento para alcanzar mis metas.
- **A mis padres Dagoberto López y Evelyn Mónico de López**, por su apoyo moral y económico, por darme serenidad aun en tiempos adversos y enseñarme que todo es posible con la ayuda de Dios.
- **A Irma Tranthan, Paty Estevez, Hilda y Julio Sarceño, Julio y Roxana Monico**
- **A mis hermanas Geraldina e Irma**, por darme cariño, comprensión y apoyo.
- **A mi hermanito Dagoberto José (Q.D.D.G.)** Porque además de ser mi hermano fuiste mi mejor amigo, por enseñarme el verdadero valor de la vida, y alentarme a seguir mis sueños. Gracias por regalarme parte de mis mejores momentos.
- **A mis abuelitos**, por entenderme, apoyarme y darme mucho cariño.
- **A mis amigos** Rosarito Mosqueira, Nuvia García ^{eta}, Dalila Vega, Altagracia Zepeda, Debora, Amanda Rivas, Marcela, Giovanni Nuñez, Ricardo Zavala, Francisco Gutiérrez, Carlos Medina, Alejandro Rivas, y demás mara que estuvieron conmigo.
- **A Jose García (papimasix) y Vilma Quijano** por regalarme su más sincera amistad y sabios consejos.
- **A mis compañeros de tesis**. Enmanuel Cuadra (KIKO) y Julio Bran (muñeco) por darme la oportunidad de formar un equipo consensado de responsabilidad y paciencia.
- **A todos los docentes** que a través de toda la carrera compartieron sus conocimientos

Angela Noemi López Mónico

ÍNDICE DE CUADROS

		PAG.
Cuadro 1	Enfermedades asociadas al fitoplasma en el mundo	33
Cuadro 2	Espectro de Resolución de Fragmentos Lineales de ADN	46
Cuadro 3	Explantos de Jocote de Corona (<i>Spondias purpurea</i>) a diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio como desinfectante para el crecimiento celular	73
Cuadro 4	Georeferenciación de las fincas productoras de Santa Ana	82
Cuadro 5	Resumen de brotes desarrollados por las estacas de Jocote de Corona con presencia de fitoplasmosis en las jaulas.	106
Cuadro 6	Resumen de brotes desarrollados por las estacas de Jocote de Corona Libres de Fitoplasma en las jaulas.	107
Cuadro 7	Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR para el primer muestreo de reconfirmación fitosanitaria en brotes tiernos de Jocote de Corona.	114
Cuadro 8	Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en brotes tiernos de Jocote de Corona, 2 semana después de la interacción Insecto-planta.	115
Cuadro 9	Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en brotes tiernos de Jocote de Corona, 3 semana después de la interacción Insecto-planta.	116
Cuadro 10	Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en Raíces de Jocote de Corona 8 Semana después de Haber Introducidos los Insectos en las Jaulas.	117
Cuadro 11	Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en Insectos Vectores <i>Coellidia sp.</i> y <i>Graphocephala sp.</i> , Ninfas (N) – Adultos (A) introducidos dentro de las Jaulas.	118
Cuadro 12	Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR para el muestreo realizado en la zona Occidental y Oriental del país en brotes tiernos de Jocote de Corona.	119

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig.1	Insecto adulto del Barrenador del Tallo	29
Fig. 2	Huevo del barrenador del tallo visto en estereoscopio.	30
Fig. 3	Larvas de barrenador del tallo de Jocote de Corona	30
Fig. 4	Larva de (<i>Lagocheirus sp</i>), construyendo galeras en el centro de los árboles.	31
Fig. 5	Adulto de Barrenador del tallo de jocote en su celda de descanso.	31
Fig. 6	Orificio de ovoposición visto en el estereoscopio.	32
Fig. 7	Orificio de salida del adulto cuando completa su ciclo larval.	32
Fig. 8	Fitoplasmas (f) en el floema. ptc = poros de tubos cribosos; pc = pared celular	36
Fig. 9:	Transmisión de fitoplasma en Insectos homópteros	39
Fig.10	Ciclo de vida e interacción entre fitoplasma con el insecto.	40
Fig.11	Puentes de Hidrogeno y oligonucleótidos de la cadena de ADN	41
Fig.12	Termociclador	42
Fig.13	Separación de la cadena de ADN mediante la técnica PCR	43
Fig.14	División exponencial de los fragmentos de la cadena de ADN.	43
Fig.15	Optimización de las bandas de ADN en las geles de agarosa.	44
Fig.16	Morfología y distribución de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> .	44
Fig.17	Corte de las enzimas de restricción dentro de la cadena de ADN.	45
Fig.18	Electroforesis horizontal (agarosa) o vertical (poliacrilamida).	46
Fig.19	Equipo electroforético	46
Fig.20	Tinción de Agarosa con bromuro de etidio	47
Fig.21	Volcán de San Vicente	48
Fig.22	Jaula cilíndrica para insectos	49
Fig.23	Cubrición de jaulas con funda	50
Fig.24	Cosido de jaulas	50
Fig.25	Muestreo de arboles de Jocote de Corona en la parcela	51
Fig.26	Identificación y numeración de arboles de Jocote de Corona.	51
Fig.27	Muestreo estratificado del árbol	51
Fig.28	Colocación de brotes tiernos en sobres de papel	52
Fig.29	Humedecimiento de muestras con agua	52
Fig.30	Introducción de muestras vegetativas en bolsas plásticas	52
Fig.31	Sellado y rotulado de muestras	53
Fig.32	Corte y medición de estacas de Jocote de Corona	53
Fig.33	Exudado de savia	53
Fig.34	Cubierta de estacas con fundas de tela Tricot	54
Fig.35	Limpieza del Terreno	54
Fig.36	Elaboración de terrazas individuales	55
Fig.37	Tamizado de la tierra	55
Fig.38	Llenado y transporte de Bolsas de polietileno	55
Fig.39	Siembra de estacas de Jocote de Corona	56
Fig.40	Diagrama del diseño experimental	56
Fig. 41	Descripción de las unidades experimentales con su respectivo nivel de población	57
Fig. 42	Actividades principales para el Montaje del Experimento	57
Fig. 43	Proceso de Colecta y Confinamiento de insectos <i>Graphocephala sp.</i> Y <i>Coelidia sp</i> en el Departamento de San Vicente.	58
Fig. 44	Proceso para la Captura, mediante succionadores	59

Fig. 45	Confinamiento de insectos con bolsas plasticas	59
Fig. 46	Resultado de esta técnica en época lluviosa	60
Fig 47	Perforaciones en la parte final de la bolsa contenedora de insectos en estudio	60
Fig. 48	Problemas de malezas en el area del experimento	60
Fig. 49	Limpieza de malezas en el área del experimento	60
Fig. 50	Esquema de la hoja de campo	61
Fig. 51	Proceso para el recuento de brotes desarrollados en estacas de Jocote de Corona	62
Fig. 52	Aplicación de hormona bio- Q a las estacas de Jocote de Corona	62
Fig. 53	Traslado de Jaulas	63
Fig 54	Reordenamiento de estacas después de traslado	63
Fig.55	Identificación, rotulación y apertura de nueva base de datos de estacas de Jocote de Corona.	64
Fig.56	Colocación de tierra alrededor de la base de la jaula conteniendo estacas de Jocote de Corona	64
Fig.57	Amarre de Jaulas conteniendo estacas de Jocote de Corona	65
Fig.58	Colecta de insectos <i>Graphocephala sp.</i> Y <i>Coelidia sp</i> confinadas en la microjaula e introducción hacia las jaulas conteniendo estacas de Jocote de Corona	65
Fig.59	Observación de síntomas de fitoplasmosis en Santa Ana	66
Fig.60	Observación de insectos presentes en Santa Ana	67
Fig.61	Colecta de insectos en Santa Ana en Arboles de Jocote de Corona	67
Fig.62	Observación y colecta de insectos en cafetales aledaños a arboles de Jocote de Corona en Santa Ana	68
Fig.63	Colecta de insectos en zonas cafetaleras del Departamento de Santa Ana, mediante redes entomológicas	68
Fig.64	Proceso de captura y confinamiento de insectos <i>Graphocephala sp.</i> Y <i>Coelidia sp</i> para su traslado desde Santa Ana a San Vicente	68
Fig.65	Observación e identificación de insectos <i>Graphocephala sp.</i> Y <i>Coelidia sp</i> , en Jocote de Corona y Café	69
Fig.66	Tubos de ensayos conteniendo insectos <i>Graphocephala sp.</i> y <i>Coelidia sp.</i> y brotes de Jocote de Corona	69
Fig.67	Bolsas plásticas de 25 lb, conteniendo insectos <i>Graphocephala sp.</i> y <i>Coelidia sp.</i>	70
Fig.68	Armazón de la microjaula	70
Fig.69	Introducción de tubetes de café a la microjaula	71
Fig.70	Insectos, <i>Graphocephala sp.</i> , <i>Coelidia sp.</i>	71
Fig.71	Identificación del sexo de los insectos <i>Graphocephala sp.</i> , <i>Coelidia sp</i>	72
Fig.72	Macho y Hembra <i>Graphocephala sp.</i>	72
Fig.73	Proceso para Siembra de brotes vegetativas procedentes de Estacas con fitoplasma en San Vicente, en Tubos de ensayo con solución nutritiva de "MURASHIGUE AND SKOOG"	73
Fig.74	Establecimiento del experimento en el Laboratorio de Fitotecnia	73
Fig.75	Proceso de colecta de muestras de tejido vegetal (brotes) en estacas de Jocote de Corona	74
Fig.76	Manipulación, envoltura y rotulación de muestras de tejido vegetal (brotes) para su respectivo análisis PCR	74
Fig.77	Liberación de los insectos <i>Graphocephala sp.</i> , <i>Coelidia sp.</i> , mediante la técnica de doble succión	75
Fig.78	Liberación de insectos <i>Graphocephala sp.</i> , <i>Coelidia sp.</i> , en San Vicente	76

Fig.79	Liberación del Insecto Mediante la Técnica de frascos pequeños de Vidrio	76
Fig.80	Puesta de tubos pequeños de vidrio dentro de las jaulas	77
Fig.81	Liberación de insectos <i>Graphocephala sp</i> , <i>Coelidia sp</i> mediante golpeteo suave al tubo pequeño de vidrio	77
Fig.82	Sellado de las jaulas	77
Fig.83	Colecta de tejido vegetal (brotes) una semana después de la interacción insecto -planta	78
Fig.84	Identificación por códigos de las estacas muestreadas y el día de recolección	78
Fig.85	levantamiento de jaulas para toma de muestras de raíces	79
Fig.86	Rotulación del código proveniente de cada estaca	79
Fig.87	Observación del crecimiento radicular y colecta de raíces absorbentes	80
Fig.88	Extracción de la mejor muestra	80
Fig.89	Corte de raíces para su respectivo análisis	80
Fig.90	Empaquetado y rotulación de muestra radicular	81
Fig.91	Agrupamiento y confinamiento de estacas de Jocote de Corona	81
Fig.92	Georeferenciación de fincas con presencia de fitoplasma en la zona Occidental del país.	82
Fig.93	Colecta de muestras en Santiago de María, Usulután	83
Fig.94	Rotulación de arboles muestreados en Santiago de María, Usulután	83
Fig.95	Toma de puntos geospaciales mediante GPS de los arboles muestreados	83
Fig.96	Toma de puntos geospaciales mediante GPS de los arboles muestreados en las Zonas Occidental, Paracentral y Oriental	84
Fig.97	Base de Excel elaborados a partir de los zonas georeferenciadas de Jocote de Corona.	84
Fig.98	Logo del Software utilizado para la elaboración de los mapas.	85
Fig.99	Ruta de acceso a las bases de datos elaboradas en Excel.	85
Fig.100	Procedimientos para la realización de mapas dentro del sistema.	86
Fig.101	Proceso de conversión de coordenadas espaciales a coordenadas planimétricas.	86
Fig.102	Referencia espacial de los mapas y datos de campo colectados	87
Fig.103	Ubicación de los Shape file dentro del programa	87
Fig.104	Ubicación espaciales de los puntos georeferenciados	88
Fig.105	Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona libres de fitoplasma en la zona Occidental en El Salvador.	89
Fig.106	Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona enfermos con Fitoplasma en la zona Occidental en El Salvador.	90
Fig.107	Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona enfermos con fitoplasmosis en la zona Occidental en El Salvador.	90
Fig.108	Ubicación de árboles de Jocote de Corona sanos enfermos con fitoplasmosis en La zona Paracentral de El Salvador.	91
Fig.109	Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona enfermos con fitoplasmosis en la zona Oriental de El Salvador.	91
Fig.110	Identificación y distribución de de árboles de Jocote de Corona sanos y enfermos con fitoplasmosis en El Salvador.	92
Fig.111	Macerado de tejidos vegetales de Jocote de Corona.	93
Fig.112	Aplicación de la Solución extractora y colocación en el Vortex.	93
Fig.113	Colocación de tubos eppendorf en baño de maría	94
Fig.114	Aplicación de la disolución solución a las muestras de tejido vegetal.	94

Fig.115	Recuperación del sobrenadante en las muestras de tejido vegetal	94
Fig.116	Kit REDEExtract-N-Amp para muestras de ADN en tejido vegetal.	95
Fig.117	Centrifugación de muestras vegetales.	95
Fig.118	Utilización del termociclador (PCR).	95
Fig.119	Preparación de geles de agarosa.	96
Fig.120	Macerado de insectos homópteros vectores	96
Fig.121	Aplicación de la solución Deodesil Sulfato de Sodio (SDS)	97
Fig.122	Aplicación de la Proteinasa K	97
Fig.123	Aplicación de la solución de Cloruro de Sodio (CINa) a una concentración 6 Molar (M), en tubos eppendorf	97
Fig.124	Primera Centrifugación de muestras de insectos	98
Fig.125	Recuperación del sobrenadante en insectos	98
Fig.126	Aplicación de la solución Tris y Etanol en muestras de insectos	99
Fig.127	Segunda centrifugación de muestras de insectos	99
Fig.128	Decantado de muestras de insectos	99
Fig.129	Aplicación de etanol y Descarte de sobrenadante	100
Fig.130	Aplicación de la solución buffer TE y RNAsa a las muestras de insecto	100
Fig.131	Pesado y Preparación de la solución líquida de agarosa para insectos	100
Fig.132	Mezclado del ADN de insectos con bromo fenol	101
Fig.133	Aplicación del ADN de insecto en las geles de agarosa	101
Fig.134	Corrido de muestras de ADN de insecto en geles de agarosa	102
Fig.135	Colocación de geles de agarosa en el transiluminador de luz ultravioleta (U.V)	102
Fig.136	Distribución y Ubicación de las jaulas dentro de las terrazas.	106
Fig.137	Desarrollo y Comportamiento de las estacas de Jocote de Corona con fitoplasmas en las jaulas (B=Terrazas y R=Repetición).	107
Fig.138	Desarrollo y Comportamiento de las estacas de Jocote de Corona libres de fitoplasma dentro de las jaulas (B=Terrazas y R=Repetición).	108
Fig.139	Daño causado por el barrenador en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente.	109
Fig.140	Orificio de entrada del barrenador del tallo	110
Fig.141	Extracción de ninfas del barrenador del tallo dentro de las estacas de Jocote de Corona.	110
Fig.142	Ataque de larva del barrenador del tallo en estacas de Jocote de Corona.	111
Fig.143	Alimentación de Insectos en cajas plásticas	111

INDICE DE ANEXO

Anexo 1	Cronograma de actividades	139
Anexo 2	Resultados obtenidos en el primer y segundo PCR al analizar las 53 muestras de insectos	140
Anexo 3	Colecta y registro de tejidos vegetales para PCR	142
Anexo 4	Registro y liberación de insectos dentro de las jaulas	143
Anexo 5	Presupuesto de materiales y reactivos usados en análisis de PCR	144
Anexo 6	Presupuesto general	145

N°	INDICE	PAG.
	RESUMEN	iii
	INDICE DE CUADROS	iv
	INDICE DE FIGURA	v
	INDICE DE ANEXO	vi
	1. INTRODUCCIÓN	21
	2. REVISION DE LITERATURA	24
	2.1 ANTECEDENTES.....	24
	2.1.2 Problemas que ocasionan los fitoplasmas en diversos cultivos.....	24
	2.1.3 Antecedentes de fitoplasma en el cultivo de Jocote de Corona en El Salvador.....	25
	2.2 Grupos taxonómicos de vectores de fitoplasma.....	27
	2.3 Familias de insectos asociadas a la diseminación de fitoplasmas en Jocote de Corona.....	27
	2.3.1 Familia Cicadellidae.....	27
	2.3.1.1 Descripción morfológica del insecto.....	27
	2.3.1.2 Hábito y ecología general.....	28
	2.3.1.3 Clasificación taxonómica.....	28
	2.3.2 Insectos asociados al Jocote de Corona.....	29
	2.3.2.1 El Barrenador del tallo de Jocote (Lagocheirus sp).....	29
	2.3.2.1.1 Clasificación taxonómica del Barrenador del tallo.....	29
	2.3.2.1.2 Descripción de los estados de desarrollo del insecto.....	29
	2.4. Generalidades sobre los fitoplasma.....	33
	2.4.1 Impacto de los fitoplasmas en la agricultura.....	33
	2.4.1.1 Origen de los fitoplasma.....	33
	2.4.1.2 Clasificación de los fitoplasma.....	35
	2.4.1.2.1 El Gen 16 rDNA.....	35
	2.4.2 Características específicas de los fitoplasmas.....	35
	2.4.3 Morfología y ultraestructura de los Fitoplasma.....	36
	2.4.4 Distribución de los fitoplasmas dentro de las plantas.....	36
	2.4.5 Patogenenicidad.....	37
	2.4.6 Mecanismos de acción infectiva en las plantas.....	37
	2.4.7 Sintomatología de las plantas infectadas por fitoplasma.....	37
	2.5 Establecimiento de los fitoplasma en los insectos vectores.....	38

2.5.1 Adquisición y transmisión del fitoplasma por el insecto.....	38
2.5.2 Transmisión transovarial.....	40
2.5.3 Factores de la capacidad de mediación de vectores.....	40
2.6 Métodos moleculares para la detección de enfermedades.....	41
2.6.1 Marcadores de ADN.....	41
2.7 Amplificación del ADN por PCR.....	42
2.7.1 Marcadores basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	43
2.7.2 Endonucleasas de restricción.....	44
2.8 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.....	45
2.8.1 Principio.....	45
2.8.2 Electroforesis en Geles de Agarosa.....	46
2.8.3 Tinción con Bromuro de Etidio.....	46
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1 FASE PRE-EXPERIMENTAL.....	47
3.1.2 Reconocimiento y Colecta de Información Básica del lugar.....	48
3.1.3 Colecta de Muestras Previas.....	48
3.1.4 Evaluación previa de emergencia y crecimiento de brotes en las estaca de Jocote de Corona.....	48
3.2 FASE DE CAMPO.....	49
3.2.1 Compra de materiales.....	49
3.2.2 Corte de tela.....	49
3.2.3 Elaboración de funda.....	49
3.2.4 Elaboración de Jaula.....	50
3.2.5 Traslado de jaulas a la parcela.....	50
3.2.6 Instalación de fundas en las jaulas.....	50
3.2.7 Muestreo fitosanitario en árboles de jocote de corona (<i>Spondias Purpurea L.</i>) dentro de la parcela.....	50
3.2.8 Colecta de muestras vegetativas para análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	51
3.2.9 Almacenado de muestras vegetativas.....	52
3.2.10 Corte y recolección de estacas en los árboles muestreados.....	53
3.2.11 Confinamiento de estacas dentro de la jaula metálica y fundas de tela sintética.....	54
3.2.12 Delimitación, limpia y preparación del terreno.....	54
3.2.13 Llenado de bolsas.....	55
3.2.14 Siembra de estacas.....	56
3.2.15 Instalación y distribución previa de los tratamientos experimentales.....	56
3.2.16 Instalacion del experimento en campo.....	57
3.2.17 Colecta y confinamiento de Insectos mediante redes entomológicas en San Vicente.....	57
3.2.17.1 Colecta con succionadores.....	58
3.2.18 Limpieza del terreno.....	60
3.2.19 Elaboración de la hoja de campo.....	61
3.2.20 Recuento de brotes desarrollados en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente.....	61
3.2.21 Aplicación de hormona Bio-Q en las estacas.....	62
3.2.21.1 Disolución y aplicación de la hormona.....	62
3.3 Traslado de jaulas.....	63

3.4 Observación de síntomas de fitoplasma en Santa Ana en arboles de plantaciones de avanzada edad.....	65
3.5 Colecta de insectos Homoptera: <i>Graphocephala sp</i> y <i>Coelidia sp.</i> , por medio de redes entomológicas.....	67
3.5.1 Traslado de insectos Homópteros: <i>Graphocephala sp.</i> , y <i>Coelidia sp.</i> , a las jaulas.....	68
3.5.1.2 Traslado de insectos en tubos de ensayo.....	69
3.5.1.3 Traslado de insectos en bolsas plásticas.....	70
3.5.1.4 Traslado del Insecto en micro jaula.....	70
3.5.2 Selección de la planta a Introducir en la Micro jaula.....	70
3.6 Sexado de insectos, <i>Graphocephala sp</i> , <i>Coelidia sp</i>	71
3.7 Ensayo sobre la evaluación de tres concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la sobrevivencia de explantes in-vitro de Jocote de Corona.....	72
3.8 Recolección de brotes vegetativos procedentes de estacas sanas para verificar el estado fitosanitario.....	74
3.9 Metodología Empleada para liberación de insectos dentro de la jaula.....	75
3.9.1 Liberación del Insecto Mediante la Técnica de Doble Succión.....	75
3.9.2 Liberación del Insecto Mediante la Técnica de frascos de Vidrio....	76
3.10 Colecta de tejidos vegetales una semana después de la interacción insecto – planta.....	78
3.10.1 Colecta de Raíces 1 Mes Después de la Interacción Insecto – Planta.....	79
3.11 Colecta y Recopilación de información con CENTA.....	81
3.11.1 Colecta y Recopilación de información con Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA).....	82
3.4 FASE DE GABINETE:	84
3.4.1 Elaboración de mapa y ubicación de las zonas con presencia de fitoplasma en Jocote de Corona en El Salvador.....	84
3.4.1.1 Colecta de información geográfica mediante el uso de GPS...	84
3.4.2 Procesamiento de la Información de Campo Utilizando el Formato Excel.....	84
3.4.3 Utilización del Software Arc GIS para la Elaboración de Mapas.....	85
3.4.3.1 Transformación de Coordenadas Geográficas a Coordenadas Planas.....	85
3.4.4 Finalización de mapas de las zonas con presencia de fitoplasma en Jocote de Corona en El Salvador.....	88
3.4.5 Identificación árboles de Jocote de Corona sanos y enfermos en las zonas altamente productoras de El Salvador.....	88
3.5 Fase de Laboratorio.....	92
3.5.1 Análisis de PCR en brotes tiernos de Jocote de Corona.....	92
3.5.1.1 Extracción ADN de material vegetativo (hojas, tallos y raíces).....	92
3.5.1.2 Extracción de ADN en insectos vectores.....	96
4. DISCUSION DE RESULTADOS	103
4.1 Resultado de campo	103
4.1.1 Siembra de estacas sanas y enfermas en sustrato orgánico	103
4.1.2 Evaluación de sustrato en bolsas de polietileno	103
4.2 Evaluación previa de emergencia y crecimiento de brotes en las estaca de jocote de corona.....	104

4.3 Resultados de PCR en Foliolos Jóvenes de Jocote de Corona por El Centro de Diagnóstico de Patógenos de la Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano) en Honduras.....	104
4.3.1 Análisis de los Resultados de PCR en foliolos de Jocote de Corona como punto de partida para la obtención de estacas.....	104
4.4 Recuento de brotes desarrollados en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente.....	105
4.4.1 Observaciones de campo encontradas durante el recuento de las estacas a los 51, 59, 70 y 102 días	105
4.5 Evaluación, comportamiento y desarrollo de estaca leñosas de Jocote de Corona procedente de arboles sanos y enfermos.....	105
4.5.1 Patrón de comportamiento de estacas de Jocote de Corona sanas y enfermas por fitoplasmosis.....	106
4.5.2 Conclusiones sobre el patrón de comportamiento de las estacas de Jocote de Corona sanas y estacas enfermas.....	108
4.6 Enraizamiento de las estacas de Jocote de Corona.....	109
4.7 Ataque del Barrenador del tallo (<i>Lagocheirus</i> sp) en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente.....	109
4.7.1 Acciones y Medidas Realizadas para el control y manejo del Barrenador.....	110
4.8 Evaluación de la Mejor Técnica de Traslado para Insectos Homopteros: <i>Graphocephala</i> sp. y <i>Coelidia</i> sp.....	111
4.8.1 Traslado de insectos en tubos de ensayo (1ra colecta).....	111
4.8.2 Traslado de insectos en bolsas plásticas (2da colecta).....	112
4.8.3 Elaboración de micro jaula para el traslado del insecto (3ra colecta).....	112
4.9 Evaluación de la mejor técnica de liberación de insectos dentro de las jaulas.....	112
4.10 Resultados sobre la evaluación de tres concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la sobrevivencia de explantes in-vitro de Jocote de Corona.....	113
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	114
5.1 Análisis de Resultados de PCR para brotes tiernos de Jocote de Corona como Reconfirmación Fitosanitaria de Estacas.....	114
5.2 Análisis de resultados de PCR para brotes tiernos de Jocote de Corona 1 semana después de haber introducidos los insectos en las jaulas....	115
5.3 Análisis de resultados de PCR para brotes tiernos de Jocote de Corona 2 semana después de haber introducidos los insectos en las jaulas.....	116
5.4 Análisis de resultados de PCR en raíces de Jocote de Corona 3 semana después de haber introducidos los insectos en las jaulas.....	117
5.5 Análisis de resultados de PCR en insectos homópteros vectores <i>Coelidia</i> sp., y <i>Graphocephala</i> sp., Ninfas (N) – Adultos (A).....	118
5.6 Análisis y discusión de resultados de PCR para brotes tiernos en árboles de Jocote de Corona muestreados en la zona Occidental y Oriental del país.....	119
5.7. DISCUSIÓN GENERAL.....	120
5.7.1 Discusión de resultados en las estacas confinadas.....	121
5.7.2 Discusión de resultados sobre las estacas confinadas después de la interacción insecto-planta.....	121
5.7.3 Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN en geles de agarosa.....	122

5.7.4	Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN de insecto vectores en geles de agarosa.....	124
5.7.5	Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN en raíces de jocote corona.....	124
5.7.6	Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN en zonas altamente productoras de Jocote de corona en el país.....	124
6.	CONCLUSIONES.....	126
7.	RECOMENDACIONES.....	127
8.	BIBLIOGRAFIA.....	128
9.	ANEXOS.....	139

1. INTRODUCCIÓN

Spondias purpurea L. (jocote) es una especie arbórea originaria de Centroamérica y México su nombre proviene del Náhuatl "Xocotl", término genérico de frutos agrios. Su fruto cuando madura puede ser de color rojo, púrpura o naranja encendido, tiene forma ovoide y posee pequeñas protuberancias en la base del fruto, parecidas a una pequeña corona, razón por la cual recibe su nombre (FRUTAL-ES, 2005).

Es un fruto con un potencial económico importante tanto en el mercado nacional como internacional, debido a sus múltiples usos. Dentro de estos se puede mencionar: el alimenticio (fruta fresca, mermeladas o bebidas), estimulante (confección de vinos y otras bebidas), forrajeros (follaje como alimento de animales), industrial (su madera es adecuada para la fabricación de papel y su resina se utiliza en la elaboración de pegamentos y gomas), medicinal y saponifera (Bautista-Baños et al.,2000; Macía y Barfod, 2000). Posee una pulpa jugosa de color amarillo, con un sabor y aroma agradable. Su peso oscila de 30 a 42 gramos (FRUTAL-ES, 2005).

La producción de Jocote de Corona en El Salvador ha evolucionado en los últimos años ya que ha pasado de generar 436 mil dólares en 2000 a 2.6 millones de dólares en 2004. El mercado para esta fruta, se ha considerado que puede seguir creciendo porque existe mucha demanda, no sólo en los salvadoreños residentes en Estados Unidos, sino también por otros centroamericanos que son residentes en ese país. Además el programa FRUTAL-ES se ha encargado de incentivar este rubro por medio de la Agroindustria que ha favorecido a la exportación de frutas frescas y procesadas hacia Estados Unidos.

No obstante, la producción está en desarrollo y los agricultores aún no saben cómo reaccionar en caso de problemas serios en el cultivo de Jocote de Corona. Algunas

enfermedades asociadas con la sintomatología de Fitoplasmas, que atacan las plantaciones de Jocote pueden generar pérdidas totales de la inversión. Además se enfatiza en la necesidad de desarrollar mejores manejos de protección fitosanitaria (FRUTALES-IICA, 2005).

Los Fitoplasmas son transmitidos de planta a planta por insectos vectores, ellos atraviesan la pared del tracto intestinal del insecto, y se multiplican en la hemolinfa, al pasar a través de las glándulas salivales se multiplican aún más, y así sucesivamente hasta infectar el floema de una nueva planta (Agrios, 1997).

La presencia de fitoplasma fue estudiada por primera vez en El Cerro Verde, Municipio del Congo, Departamento de Santa Ana, en el periodo 1998-2001; por técnicos del Laboratorio de Parasitología Vegetal del CENTA, Sede Central. Mediante pruebas de reacción de la cadena de Polimerasa (PCR), realizada en 1999 y posteriormente en 2001 por el Natural Resources Institute (NRI) de la Universidad de Greenwich de Inglaterra. Mientras que en el 2006 el Ing. Agr. José Luis Mayen Rafael con colaboración de Jorge Alberto Duran Rodríguez mediante el estudio denominado “identificación de artrópodos asociados al cultivo de jocote corona (*Spondias purpurea*) en El Salvador, C.A.” realizando colectas en la zona de San Vicente, Cerro verde y Comasagua. Entre los resultados obtenidos se encontraron 8 familias de homópteros entre ellas: Acanaloniidae, Achillidae, Issidae, Fulgoridae, Membracidae, Cixiidae, Cicadellidae y Psyllidae, siendo estas tres últimas reportadas como vectores de fitoplasmas en otros cultivos.

El primer informe de fitoplasma fue realizado en Japón por la Dr. Roxana Parada Jaco y colaboradores en el año 2005, con muestras provenientes de El Salvador obteniendo en el análisis filogenético, un fitoplasma agrupado en el 16S rIII enfermedad X.

Por lo cual la identificación e interrelación de estos organismos causantes de fitoplasma con este tipo de vectores es de suma importancia en el control y distribución de esta enfermedad en plantaciones a grandes distancias (APSNET, 2007).

La presente investigación consistió en determinar a través del análisis de laboratorio cual de los insectos *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.* evaluados son infectivos y vectores potenciales en Jocote de Corona y demostrar mediante pruebas de laboratorio la presencia de fitoplasma en tejidos vegetales de Jocote de Corona en la zona Occidental, Paracentral y Oriental de El Salvador.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1 ANTECEDENTES

2.1.2 Problemas que ocasionan los fitoplasmas en diversos Cultivos.

La presencia de fitoplasmas en la franja costera de Cataluña, en España en arbustos de *Spartum junceum*, tanto espontaneo como ornamentales, ha presentado una enfermedad característica, la cual consiste en malformaciones en forma de escoba de bruja y decaimiento de la planta o solo en algunas ramas. El síntoma de mayor importancia es la escoba de bruja que se desarrolla a partir de la yema axilar. Las plantas afectadas se secan y en ocasiones, mueren en pocos años. El agente causal de la sintomatología descrita es un fitoplasma del grupo "Apple Proliferacion" 16 SrX (Torres, E.; Botti, S.; Paltrineri, M.; Martin, M.P.; Bertacini, A., 2002).

Otro caso de fitoplasma es el observado en el cultivo de zanahoria (*Daucus carota L.*) en los últimos 15 años, el cual presenta sintomatologías anormales que causa amarillamiento y enrojecimiento de las hojas adultas, así como la proliferación de hojas, deformación de raíces, reducción del tamaño y envejecimiento prematuro de las mismas. El posible agente causal de esta enfermedad es el fitoplasma incluido dentro del grupo "Stolbur" (Font, I.)

Estados unidos reporto que en el año de 1909 en el estado de Colorado, una enfermedad que afectaba a las plantas de papa, y que era transmitido por un insecto homoptero conocido como el nombre de *Triosa cockerelli* que es un Psyllido, cuyo nombre fue asignado por Crawford en 1911, pero no fue hasta 2006, que el Psyllido de la papa causo una grave plaga en Guatemala y Honduras donde fue asociado con decoloración y daño en los tubérculos de papa, además esta puede encontrarse en los cultivos de tomate, chile verde, provocando enfermedades conocidas como amarillamiento de las plantas. El agente causal de esta enfermedad es el fitoplasma llamado "Yellow diseases" (Crawford, D. L., 1911).

Un ejemplo más es la muerte regresiva del peral en España, que consiste en el decaimiento progresivo y muerte de la planta, sintomatología que ya había sido observada de forma esporádica en algunas zonas del cultivo frutícola desde los años 60 (Rallo, 1973). La primera información acerca de la existencia de esta enfermedad, data del año 1934 en Italia, donde se conocía con el nombre de "moria" del peral (Catoni, 1934). Luego en la década de los años 40 fue citada en USA y Canadá por McLarty (1948), el impacto de esta enfermedad en peral ha sido y continúa siendo, muy importante. En Alemania, a principios de los 70, se registro un 27,8% de muertes en cultivos de 8 años de edad por dicha enfermedad (Németh, 1986). Es así como en 1994 se da la confirmación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del fitoplasma responsable de la enfermedad (Avinent et al., 1997), el fitoplasma causante de esta enfermedad se clasifica dentro del grupo 16S X subgrupo C (Seemüller et al., 1998).

Otro caso reciente de enfermedades producidas por fitoplasma es el amarillamiento letal que afecta al cocotero (*Cocos nucifera L*) la cual ha causado la muerte de miles de palmas en la región del Caribe, América Central y México (Howard, 1983; Escamilla et al., 1995; Ashburner et al., 1996; Oropeza et al., 1997). Desde hace varias décadas se descubrió que esta enfermedad en cocotero es causada por un fitoplasma que se encuentra en los elementos cribosos del floema de las plantas infectadas, donde son

adquiridos por *Myndus crudus* Van Duzee (Homoptero: Cixidae), conocido comúnmente como Chicharrita Pálida y que actúa como vector de la enfermedad (Howard, 1983; 1995)

2.1.3 Antecedentes de fitoplasma en el cultivo de Jocote de Corona en El Salvador.

En septiembre de 1998, la agencia de extensión de Armenia reporto al laboratorio de Parasitología Vegetal del CENTA, un problema fitopatológico en el cultivo de Jocote de corona (*Spondias sp*).

- En respuesta, a esta demanda el personal del laboratorio de parasitología vegetal visito dichas plantaciones, ubicadas en la la Finca San Francisco, cantón Lomas de San Marcelino, Departamento de Santa Ana; donde se observaron arboles de Jocote de corona fructificación, que presentaban los siguientes síntomas: arboles con proliferación de hojas terminales y cantidades de frutos que nacían de un mismo punto y con pulpa delgada; estos árboles con el tiempo tendían a secarse, igualmente sucedía con las nuevas plantaciones realizadas por los agricultores con estaca visiblemente sanas.

Se colectaron aproximadamente 10 muestras de diferentes plantaciones que presentaban los mismos síntomas. Se llevaron al laboratorio y se realizaron análisis fitopatológicos. Los resultados obtenidos (hongos: *Penicillium*, *Rizopus*, *Pestalotia*, *Fusarium* y *Colletotrichum*) no demostraron que se trataba de un patógeno que pudiera ser identificado con las técnicas de diagnóstico disponibles, además, con las observaciones de los síntomas de los árboles enfermos en el campo, se sospecho que se trataba de un fitoplasma.

En una segunda visita a principios de 1999, acompañados de la Dra. Priscila Henríquez quien trabajaba con el personal del laboratorio, que tiene experiencia en la identificación de virus y fitoplasmas sugirió coleccionar nuevamente muestras para un segundo análisis. Se colectaron muestras que presentaban síntomas semejantes a los producidos por un fitoplasma, pero debido a que el laboratorio no contaba con técnicas de diagnóstico adecuadas, esta sospecha no pudo ser confirmada. Se estimó entonces que la única manera de establecer un diagnóstico para la enfermedad era someter las muestras a análisis moleculares para diagnóstico de virus y fitoplasmas, para ello se solicitó apoyo al Natural Resources Institute (NRI) University of Greenwich, Inglaterra, a través de los contactos de la Dra. Henríquez.

En marzo de 1999, llegó al país el Dr. Lawrence Kenyon, virólogo y fitoplasmaólogo del NRI, acompañado del personal de parasitología Vegetal, visito las fincas afectada por la enfermedad para observar la sintomatología que presentaban los árboles y hacer un sondeo de la magnitud de la epidemia. Se colectaron muestras de los árboles sintomáticos, las cuales fueron llevada a Inglaterra, las muestras fueron transportadas en estado fresco y deshidratado; también se colectaron brotes de árboles enfermos para enraizarlos en los invernaderos del NRI. Las muestras fueron analizadas usando métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), este método se considera una prueba de diagnóstico para cualquier fitoplasma. Con este análisis se detectaron seis muestras que contenían un fitoplasma, lo que permitió concluir que la enfermedad era causada por un fitoplasma.

Un segundo grupo de muestras fueron enviadas al Dr. Nivel Harrison en 1999 (University of Florida) a través del NRI las cuales se procesarían con las mismas técnicas de Inglaterra desafortunadamente las muestras se deterioraron en el transporte y no pudieron ser analizadas.

En octubre del 2000, los extensionistas de la agencia Santa Ana recibieron una solicitud de asistencia técnica a la finca "Don Nico", ubicada en el cantón Planes de la Laguna,

caserío Santo Domingo, Departamento de Santa Ana. La finca cuenta con un área de 42 mz cultivadas de café en asocio con jocote de corona. Los extensionistas solicitaron nuevamente los servicios del laboratorio de parasitología vegetal ya que se trataba de un problema parasitológico y estos acompañados del personal del laboratorio realizaron la visita; que tenía como objetivo observar la sintomatología y coleccionar muestras del cultivo de jocote que había sido reportada como una enfermedad llamada por los agricultores "jocote Jobo". Se observó que eran los mismos síntomas que habían reportado en el año 1998.

Las muestras coleccionadas fueron llevadas nuevamente al laboratorio para realizar los análisis fitopatológicos y nematológicos correspondientes. Sin embargo con los antecedentes de este problema reportados en 1998, los resultados obtenidos no reflejaron ningún patógeno responsable del problema; apoyados en la literatura consultada y el diagnóstico realizado en Inglaterra se comenzó a gestionar ayuda internacional para confirmar que se trataba de un fitoplasma.

Se hizo contacto con el Dr. Romero Cano, director del departamento de protección vegetal del instituto nacional de investigaciones agrarias (INIA) en España. El Dr. Romero Cano ofreció su colaboración gratuita para realizar los análisis respectivos en este instituto por lo que se programó nuevas visitas para recolectar muestras para ser llevadas a España.

En noviembre del 2000 se visitó nuevamente la finca de "Don Nico", para coleccionar muestras del cultivo de jocote de corona, tomar fotografías de árboles enfermos y probablemente sanos; para su envío al instituto de España. El costo de este envío fue cubierto por CENTA, las muestras fueron recibidas y se informó que se procedería de inmediato a su procesamiento los primeros informes enviados al INIA, acerca de los análisis realizados notificaron que no se pudo amplificar el fitoplasma a pesar que se utilizaron técnicas como el Nested, sin embargo, consideraron que las extracciones de ADN no fueron realizadas adecuadamente por lo que se repitieron todos los experimentos.

A finales de noviembre del 2000 se notificó desde España vía e-mail, que se habían podido hacer buenas amplificaciones del patógeno, esto les permitió afirmar que la enfermedad es producida por un fitoplasma, confirmando los resultados iniciales obtenidos por el Dr. Kenyon.

Simultáneamente se contactó con la Dra. Priscila Henríquez que a la fecha de escritura de este documento fungía como coordinadora regional de la Red Mesoamericana de Recursos Fitogenéticos REMERFI (IICA - GTZ), quien ha priorizado las investigaciones en cultivos nativos de Mesoamérica. Y que actualmente trabaja como Especialista nacional en competitividad del IICA.

Según los resultados obtenidos en el análisis filogenético, se trata de un fitoplasma agrupado en el 16S rIII enfermedad X, el cual fue el primer informe de presencia de fitoplasma realizado en El Salvador. (Parada. 2005 et al).

Así mismo se reveló la presencia de esta enfermedad hace 10 años, aunque 20 años atrás ya se encontraba como brotes dispersos en las plantaciones (FRUTALES-IICA, 2005). De acuerdo con CENTA, (2006), y el Programa IICA-Frutales (2005), a partir del año 2004, se demostró que esta enfermedad destruye alrededor del 10% de árboles de jocote al año, en las plantaciones del volcán Chinchontepec en San Vicente. Por ello el CENTA, está tomando como prioridad la identificación del vector que trasmite esta enfermedad causada por un "Fitoplasma".

Además en Noviembre del 2006, el Ing. Luís Mayen, técnico del Área de Investigación de PROMIPAC (Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central), realizó un

trabajo de investigación sobre los posibles vectores asociados al fitoplasma en Jocote de Corona en la zona del volcán Chinchontepec en San Vicente, en donde se capturaron insectos homópteros asociados al cultivo, que luego fueron seleccionados e identificados, para ser enviados y analizados por medio de pruebas de PCR en laboratorio en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras; para reconocer su relación con la transmisión de fitoplasma en el cultivo. Como resultado de esta gestión se encontraron un conjunto de 8 familias de homópteros: *Acanaloniidae*, *Achillidae*, *Issidae*, *Fulgoridae*, *Membracidae*, *Cixiidae*, *Cicadellidae* y *Psyllidae*, las últimas confirmadas como vectores o portadoras de fitoplasmas en otros cultivos (Mayen, J.L.; Duran, J. 2006) (Ver anexo 1)

2.2 Grupos Taxonómicos de Vectores de Fitoplasma

El único orden más exitoso de insectos vectores de fitoplasma es el Homoptera, este grupo colectivo posee grandes cantidades de características que hace de estos miembros vectores muy eficientes a la enfermedad, entre algunas características que presenta este grupo de insectos son:

- a) Todos son insectos hemimetábolos, o exopterigotos, es decir, la ninfa a menudo se parece al adulto o similarmente ya que están en la misma localización física, tanto los inmaduros como adultos son capaces de transmitir el fitoplasma.
- b) Ellos se alimentan específicamente y selectivamente de ciertos tejidos de las plantas que lo hacen más eficientemente vectores de patógeno residentes en estos tejidos lo que hace que la alimentación de ellos sea si no más destructiva. Promoviendo más exitosamente la inocuidad en el sistema radicular de la planta sin dañar los tejidos conductivos y las respuestas de la planta.
- c) Estas tienen una propagación persistente relacionada con el fitoplasma.
- d) Estos son procariontes obligados simbióticos que lo pasan a su progenie por transmisión transovarica, el mismo mecanismo que permite la transmisión del fitoplasma. (Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K., et al. 2000).

Los fitoplasmas son limitados al floema, además únicamente los insectos que se alimentan del floema pueden tener potencial de transmitir el patógeno, también el grupo conjunto de insectos que se alimentan del floema únicamente están divididos en tres grupos taxonómicos pueden ser confirmados como vectores del fitoplasma. La súper familia que contiene el número más largo de especies vectores es la Membracoidea (Dietrich, C.; Rakitov, R.; Holmes, J.; Black, W., 2001), junto a ello se le conoce hasta la fecha, vectores que son confirmados como *Cicadellidae*.

El más pequeño suborden es el *Sternorrhyncha* en la cual únicamente 2 géneros en la familia *Psyllidae* han sido confirmados como vectores. Y algunos membracidos son relativamente pobres transmisores de virus comparado con las chicharritas (Nielson, M., 1979).

2.3 Familias de Insectos Asociadas a la Diseminación de Fitoplasmas en Jocote de corona

2.3.1 Familia *Cicadellidae*

2.3.1.1 Descripción morfológica del insecto.

Esta familia comprende un grupo numeroso de insectos, hasta la fecha se conocen 2,500 especies. Su forma, tamaño y color son variables, se caracterizan porque sus tibias posteriores poseen 1 o más hileras de espinas. Raras veces el tamaño del adulto

sobrepasa los 13 mm y algunos miden pocos milímetros. Muchas especies están marcadas con hermosos patrones de coloración. Se caracterizan por tener seis generaciones al año, pero algunas especies tienen dos o tres. La época lluviosa es donde generalmente se convierten en adultos y ovipositan. (Borja, C. et al., 2008).

2.3.1.2 *Habito y ecología general.*

Los *cicadélidos* son llamados también chicharritas o saltahojas. Estos insectos se alimentan exclusivamente de savia de los tejidos de muchas especies de plantas, usando el estilete de sus partes bucales chupadoras. Al alimentarse la mayoría pone a funcionar un músculo que bombea grandes cantidades de savia de la cual extraen su alimento y energía. Mientras se alimentan también eliminan o excretan por el ano las sustancias que son absorbidas en exceso o que no le son útiles.

Las especies que se alimentan de savia del floema excretan un líquido azucarado y las que se alimentan de la savia del xilema excretan grandes cantidades de agua. Otras se alimentan de las células del mesófilo de las hojas y es muy poco el líquido que ingieren. Desafortunadamente se conoce poco de la relación de la mayoría de las especies con las plantas hospederas, pero algunas son bien conocidas por su especificidad.

Algunos *cicadélidos* son muy conocidos por su capacidad de transmitir virus y bacterias que son causantes de enfermedades de las plantas (por ejemplo, el Virus del Rayado Fino del Maíz, transmitido por *Dalbulus maidis*).

La mayoría de los miembros de esta familia producen sonidos de baja intensidad y que pueden ser transmitidos a través del sustrato. Pueden ser emitidos por vibración de unos órganos llamados timbales que se encuentran en la base del abdomen y en forma similar como lo hacen las chicharras, pero les falta la bolsa de aire responsable de la alta intensidad del sonido de estas.

Las hembras poseen un ovopositor con el cual ponen sus huevos bajo la superficie del tejido de las plantas. Los *cicadélidos* se desarrollan rápidamente y pueden tener hasta 6 generaciones o más en un año. Estas pasan por 5 estadios ninfales para convertirse posteriormente en adultos que pueden vivir de unas semanas a algunos meses (Godoy, C. 2008).

2.3.1.3 *Clasificación Taxonomía:*

Reino: Animalia

Filo: Artrópoda

Clase: Insecta

Orden: Homoptera

Suborden: Auchenorrhyncha

Familia Cicadellidae:

Género *Coelidia*; *Graphocephala*. (Wikipedia, 2006)

2.3.2 Insectos asociados al Jocote de Corona

2.3.2.1 El Barrenador del tallo de Jocote (*Lagocheirus sp.*).

Hasta hace unos años se pensaba que el ataque de barrenadores del tallo era específicamente para el Jocote de Verano, ya que en el año 2002, El Centro de Investigación de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), divulgó un boletín técnico sobre los daños causados por este insecto en la zona Occidental del departamento de Ahuachapán en el cual se describe que existe un área aproximada de 420 Ha sembradas con Jocote de Verano, en las cuales reportan la presencia de un gusano minador del tallo en arboles jóvenes y viejos. Algunos de los daños reportados dentro de arboles jóvenes y viejos presentan perforaciones en la base de los tallos hasta llegar al centro de este, formando galerías las cuales interrumpen el paso de nutrientes en el árbol causándole así una muerte lenta. Así mismo describe que el insecto desarrolla todo su ciclo de vida dentro del árbol. (CENTA, 2002)

Información muy importante pero la cual no debe limitarse al Jocote de Verano, ya que después de 6 años de realizado y divulgado el boletín hacemos constar dentro de nuestra investigación que; el ataque de barrenador del tallo no se limita al Jocote de Verano si no también debe extenderse hasta el cultivo de Jocote de Corona, es decir que esta “plaga” ha logrado extenderse en diversidad y altura de ataque, ya que por medio de nuestra investigación hacemos constatar que en la zona Occidental específicamente en el Volcán de San Vicente existe la presencia del gusano minador del tallo (*Lagocheirus sp.*).

2.3.2.1.1 Clasificación taxonómica del Barrenador del tallo

Nombre científico: *Lagocheirus sp*

Orden: Coleóptero

Familia: Cerambycidae

Subfamilia: Cerambycinae

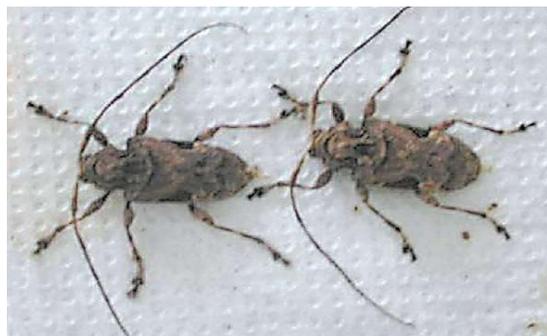


Figura 1: Insecto adulto del Barrenador del Tallo

2.3.2.1.2 Descripción de los estados de desarrollo del insecto

a) Huevo

Presenta un color blanco translúcido, de un tamaño aproximado de 1 a 2 mm, de forma ovoide, tarda 7-10 días para eclosionar. Es muy difícil de observar a simple vista, se requiere del uso de una lupa con aumento de 10 X para observarlo en el campo, Para ello, se recomienda revisar cuidadosamente la base del árbol hasta mas o menos 1 metro hacia arriba. Si la plaga está presente, se encontrarán pequeñas raspaduras de la corteza que son hechas por la hembra para depositar sus huevos. (CENTA, 2002)



Figura 2: Huevo del barrenador del tallo visto en estereoscopio

b) Larva

La larva recién eclosionada tiene un tamaño muy pequeño, de 1mm. Incrementa su tamaño hasta alcanzar 5 a 6 cm de longitud. Otros autores afirman que insectos de esta familia puede sobrevivir hasta 2 años como larva hasta completar su desarrollo. La larva tiene cabeza redonda de color café, mandíbulas fuertes y endurecidas, con cuerpo de apariencia torneada y cilíndrica. (CENTA, 2002)



Figura 3: Larvas de barrenador del tallo de Jocote de Corona

Es el estado de desarrollo posterior al último estadio larval. En esta fase se inmoviliza sin alimentarse más, hasta completar su ciclo y transformarse en insecto adulto, la duración de este estadio es de 10 a 12 días. Cada larva, al completar su desarrollo larvario, entra en una etapa en que limita todos sus hábitos; detiene su crecimiento y no se alimenta más. Justo en ese momento empieza a formar dentro del árbol una especie de cápsula, donde se protege y entra en un estado de descanso (diapausa) hasta convertirse en adulto. A esa etapa de desarrollo se le conoce como pupa. (CENTA, 2002)

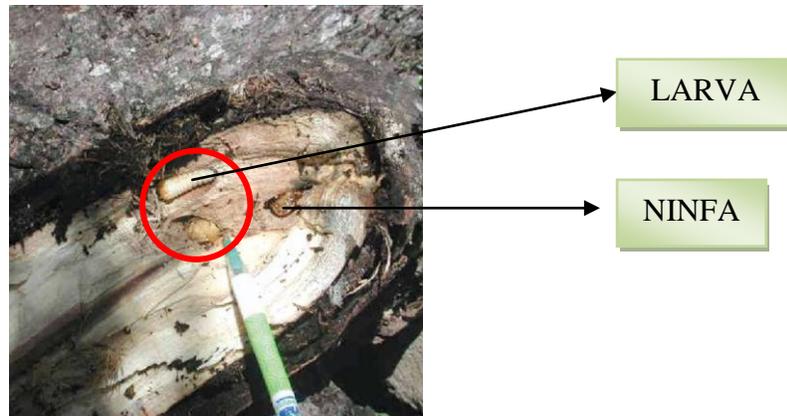


Figura 4: Larva de (*Lagocheirus sp*), construyendo galerías en el centro de los árboles.

c) Adulto

Es un coleóptero que alcanza tamaños entre 5 a 10 centímetros de longitud. Posee un par de élitros (alas endurecidas) con manchas grises que le permiten disimularse en la corteza de los árboles, mandíbulas fuertes y endurecidas de coloración café que le sirven para hacer cortes bien definidos en la corteza de los árboles y usarlos como lugares de refugio durante el día. Cubre el agujero de entrada con residuos de la misma madera del árbol. La única diferencia morfológica que existe entre la hembra y el macho adulto es el tamaño, siendo de mayor tamaño la hembra. Todos los insectos de esta familia se caracterizan por tener antenas más largas que su cuerpo. (CENTA, 2002)



Figura 5: Adulto de Barrenador del tallo de jocote en su celda de descanso.

d) Hábitos de oviposición

Las hembras ovipositan en la base de los árboles hasta 1 metro sobre la superficie del suelo; antes de ovipositar, con su fuerte aparato bucal, raspan la corteza del tallo. En ese lugar depositan los huevos (colocan 1 huevo en cada postura). Otro lugar que utiliza el insecto para ovipositar son las grietas de la corteza de los tallos.

Orificio de entrada del insecto: para detectar la presencia del insecto en el árbol, a simple vista únicamente se observa las raspaduras hechas por la hembra adulta al depositar el huevo, pero no se logra observar el orificio donde deposita el huevo. Para verlo se requiere de una lupa con un aumento de 10 X. (CENTA, 2002)



Figura 6: Orificio de oviposición visto en el estereoscopio.

Orificio de salida del insecto: el insecto cuando se alimenta hace galerías dentro del árbol; lo interesante de estas galerías es que no se conectan entre sí, lo que significa que en cada galería se encuentra una larva que no tiene conexión con otra galería, situación que hace un tanto difícil su control mediante el uso de insecticidas gasificantes aplicado en las galerías. Completa su estado larvario dentro del árbol y al pasar al estado adulto tiende a salir a la superficie dejando orificios en la corteza de un tamaño aproximado de 1 cm para completar su ciclo de desarrollo (el apareamiento) fuera del árbol. (CENTA, 2002)



Figura 7: Orificio de salida del adulto cuando completa su ciclo larval.

Orificio de resguardo (descanso): el insecto adulto de *Lagocheirus* sp. hace en la corteza de los árboles, un corte circular de un tamaño aproximado de unos 5 centímetros. Este corte presenta, en el fondo, otro orificio pequeño de tamaño aproximado de 1 centímetro, en el cual normalmente hay presencia de aserrín. Algunas veces el corte circular de la corteza, mantiene una tapadera de la misma corteza del árbol, en el lugar de descanso del insecto adulto. (CENTA, 2002)

Síntomas de daños

Cuando la hembra adulta oviposita en la corteza del árbol, se inicia el daño en la planta, aunque por el tamaño muy pequeño del huevo no es notorio a simple vista; lo único que se observa son las pequeñas raspaduras que hace la hembra adulta en la corteza del árbol para colocar los huevos. Los primeros síntomas de los árboles dañados por el barrenador es la disminución progresiva de la producción de frutos, luego empiezan a mostrar apariencia de muerte de ramas terminales, las cuales van avanzando hasta dar muerte completa del árbol. (CENTA, 2002)

2.4. Generalidades sobre los Fitoplasma

2.4.1 Impacto de los fitoplasmas en la agricultura

2.4.1.1 Origen de los Fitoplasma

Se conocen desde hace unas tres décadas, en 1967 gracias a la microscopía electrónica se determinó que algunas enfermedades llamadas “yellow diseases” eran producidas por células procariontas y no por virus (Doi et al., 1967).

El descubrimiento de estos organismos parecidos a los micoplasmas, causantes de enfermedades a los animales, dio origen a los estudios exhaustivos y la búsqueda de su parentesco con el resto de sus microorganismos. En un inicio se les llamó mycoplasma-like organisms o MLO. En el año de 1994, el comité de taxonomía de Mollicutes de la IOM (International Organization for Mycoplasma) estableció el nombre actual de fitoplasma. Recientemente ha sido propuesto el término fitoplasma como candidato al género “*Candidatus phytoplasma*” (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2003) Pytoplasma taxonomy group (2003).

Cuadro 1: Enfermedades asociadas al fitoplasma en el mundo.

CULTIVO	ENFERMEDAD	VECTOR	PAISES	REFERENCIAS
Raphanus sativus	Grupo 16SrVI		Oman	Al-Subhi, A.; Al-Saady, N.; Al-habsi, K.; Khan, A.
Vid	Grupo 16Srl-B, 16Srl-C, 16SrVII-A, 16SrXII-A	Delthocephalinae, Agallinae, Cixiidae, Delphacidae.	Chile	Gonzalez, F.; Paltrinieri, S.; Calari, A.; Bertaccini, A.; Alma, A.; Picciau, L.; Araya, J.; Fiore, N.
Algodón	Grupo 16Sr-IIC	Subfamilia Delthocephalinae	Mali, Italia	Bosco, D.; Coulibaly, A.; Marzachi, C.
Maíz	Grupo 16Srl-B	Dalbulus maydis	Colombia, Serbia	Duduk, B.; Mejia, J.; Paltrinieri, S.; Contaldo, N.; Alvarez, E.; Varon, F.; Bertaccini, A.
Tabebuia pentaphylla	Escoba de bruja		Brasil	Pimentel, J.; Cunha-Junior, J.; Guglielmi-Montano, H.
Momordica charantia L.	ChWBIII		Brasil	Albornoz, N.; Oliveira, J.; Carvalho, E.; Guglielmi-

				Montano, H.
Cultivos varios	12 fitoplasmas diversos		Grecia	Sainis, P.; Dovas, C.; Maliogka, V.; Katis, N.
Melocotón	Enfermedad X		Canada	Wang, L.; Michelutti, R.
Durazno	ESFY		República Checa	Nečas, T.; Mašková, V.; Krška, B.
Caña de azúcar, Papaya, Coco, tabaco, zanahoria, etc.	16Srl, 16Srll		Cuba	Arocha, Y.; Acosta, K.; Piñol, B.; Almeida, R.; Miranda, I.; Lucas, J.
Pennisetum purpureum	16Srlll enfermedad X, 16SrXI		Este de Africa, etiopia, Uganda	Arocha, Y.; Acosta, K.; Wilson, M.; Hanson, J.; Proud, J.; Zerfy, T.; Abebe, G.; School, M.; Mulaa, B.; Bean, T.; Cools, H.; Fraaije, B.; Wilkinson, M.; Jones, P.; Lucas, J..
Alfalfa			Arabia Saudita	Alhudaib, K.; Arocha, Y.; Lucas, L.
Cultivos nativos y malezas	16Srl, 16Srlll, 16SrVII		Argentina	Conci, L.
Papa, Hortalizas diversas	Punta Morada, 16Srlll enfermedad X		Sinaloa, México	Santos, M.; Chávez, J.; Acosta, J.; Méndez, J.; Leyva, N.
Cocotero	Amarillamiento letal del cocotero	Subfamilia Typhlocybinae, Delthocephalinae, Cicadellinae, Agallinae, Xerophloeinae	Cuba	Llauger, R.; Collazo, C.; Fabre, S.; Otero, L.; González, C.; Pérez, L.; Rodríguez, R.; Alonso, M.; Luis, M.; Cueto, J.; Dollet, M.;

				Gato, M.
Chile, Papa y Tomate	16Srl, 16SrlI y 16SrXIII	<i>Bactericera cockerelli</i>	México	García, C.; Chávez, J.; Santos, M.; Méndez, J.; Leyva, N.

2.4.1.2 Clasificación de los Fitoplasma

2.4.1.2.1 El Gen 16 rDNA

El gen 16 rDNA está constituido por 1500 bases, se encuentra dentro del operón ribosómico de los procariotas, junto con otros 2 genes de ADN ribosómicos, el 23S de 2900 bases y el 5S de 120 bases. Su orden es 16S, 23S y 5S. Entre estos genes se encuentra las regiones espaciadoras, que pueden contener uno o más genes de ADNt o de transferencia. Los operones ribosómicos en los procariotas se transcriben en una sola molécula de ARN y más adelante se separan por cortes enzimáticos. (Condon et al., 1992).

El estudio del gen 16s rDNA (con regiones conservadas) mediante los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), se ha utilizado para separar los fitoplasmas en grupos y subgrupos (Razin, 1992 et al., 1993; Schneider et al., 1993).

Mediante la amplificación de segmentos del gen 16S rDNA por PCR y RFLP, se han clasificado los fitoplasmas en 20 grupos (Seemüller et al., 1992), o en 14 grupos (Lee et al., 1998), sin embargo este gen parece no tener mucha variabilidad como para permitir diferenciar aislados que, siendo clasificados como el mismo fitoplasma, difieren en la planta o en los insectos que lo hospedan.

Actualmente se está abordando el estudio de genes diferentes al 16S rDNA para la comprensión de la biología de los fitoplasmas (Oshma et al., 2002; Kirkpatrick, et al., 2003), y en con el estudio de la genómica, también se espera dar respuesta a cuáles son las condiciones necesarias para su cultivo, así como los factores que intervienen en la especificidad vector/ planta.

Hasta el momento se han encontrado genes que codifican para proteínas de membrana de diferentes fitoplasma, a partir de los cuales se han desarrollado sueros monoclonales y policlonales (Yu et al., 1998; Berg et al.,; Blomquist et al., 2001; Mergenthaler et al., 2001, Morton et al., 2003). Estas proteínas de membrana, al igual que otros Mollicutes, podrían estar implicadas en el reconocimiento específico del huésped y patogénesis (Wise et al., 1992; Ye et al., 1997; Berg et al., 2000)

2.4.2 Características específicas de los fitoplasmas

Son parásitos estrictos de hábitat intracelulares de las plantas e insectos vectores. Su tamaño y desarrollo dependen del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan, con capacidad de pasar lentamente a través de los poros de las células cribosas del floema. Las células de los fitoplasma están rodeadas por una membrana plasmática trilaminar, de unos 10 nm de grosor, compuesto, al igual que el resto de procariotas, de 2/3 de proteína y 1/3 de lípidos. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis proteica, y una molécula de ADN doble circular. Se ha detectado también la presencia de ADN extracromosómico (Davis et al., 1988; Nishigawa et al., 2001). Se asocian con enfermedades de las plantas, y se sabe que causan más de 600

enfermedades en varios cientos de especies de plantas (Kirkpatrick, 1994; McCoy et al., 1989).

2.4.3 Morfología y Ultraestructura de los Fitoplasma

Los fitoplasmas se revelan en microscopía electrónica, con dos morfotipos predominantes: *esféricos* y *filamentosos* (Fig.8). Las formas redondeadas tienen un diámetro entre 60 y 1100 nm. En las formas filamentosas el diámetro es de unos 35 a 45 nm y su longitud aproximada es de 1200nm. Los estudios de modelos tridimensionales a partir de cortes seriados revelan la verdadera morfología de los fitoplasmas, ya que estos son organismos pleomórficos, filamentosos a menudo alineados paralelamente a la longitud de los tubos cribosos. Si estos filamentos se cortan transversalmente los fitoplasmas aparecen como pequeñas células esféricas (Florance, E., et al. 1978; Wathers, J., Hunt, 1980).

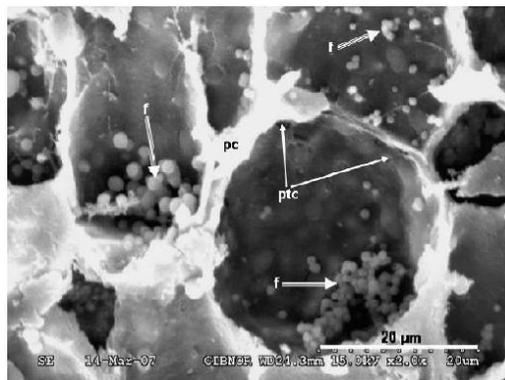


Figura 8: Fitoplasmas (f) en el floema. ptc = poros de tubos cribosos; pc = pared celular

Se supone que las formas filamentosas pueden estar involucradas en el crecimiento y reproducción de los fitoplasmas (D'agostino, G., 1991). Por otra parte, su tamaño y desarrollo parece depender del grado de desarrollo de los tubos cribosos, donde se localizan normalmente los patógenos. (Kim, Y. 1990)

2.4.4 Distribución de los fitoplasmas dentro de las plantas

Estudios realizados en la detección e identificación del agente causal del Amarillamiento Letal (AL) en palmas de cocotero en los años setenta mediante microscopía electrónica han encontrado que los microorganismos (fitoplasmas) están presentes principalmente en tejidos con crecimiento activo como inflorescencias cerradas, hojas inmaduras, ápice del tallo y ápice de las raíces y muy raramente en tejidos maduros como hojas basales y en hojas intermedias (Thomas, 1979; Parthasarathy, 1974).

Esto concuerda con la entrevista realizada a la Dra. Priscila Henríquez especialista nacional en Competitividad del IICA (Instituto interamericano de Cooperación para la Agricultura), quien realizó una investigación en achaparramiento de maíz en Centro de Investigación Científica de Yucatán (CIMYT) y encontró que gran movilidad de los fitoplasmas en las plantas de maíz, así mismo ella establece que los fitoplasmas se traslocan a las partes con mayor actividad vegetativa, y concluye que los fitoplasmas pueden traslocarse en las plantas dependiendo de la época seca o lluviosa, ya que en época lluviosa la actividad en la planta es mayor, por el apareamiento de los brotes (para el caso del jocote), mientras que, en la época seca la actividad es poca y está limitada a

la actividad vascular de la planta la cual es centrada a la formación de frutos por parte del árbol, y los fitoplasmas bajan hasta las raíces de las plantas donde existe mayor actividad metabólica.

2.4.5 Patogenecidad de los fitoplasmas.

Oropeza y colaboradores (1997) propusieron un modelo de patogenecidad del Amarillamiento Letal (AL) en palmas de cocotero, que va desde el proceso de infección de la palma hasta su muerte. Este modelo propone que uno de los primeros órganos de las palmas que resulta dañado es el sistema radicular (Islas-Flores et al., 1999), como resultado de la disminución del aprovisionamiento de nutrientes debido al daño y mal funcionamiento del floema (eden-green,1982) infligido por la presencia de los fitoplasmas y/o la formación de callosa en estos conductos. Una vez que el sistema radicular es afectado, esto provocara el cierre permanente de estomas (Eskafi et al., 1986 León et al 1996) y otros síntomas en las partes aéreas como consecuencia de un desbalance hormonal (Dabet y Hunt 1976; León et al.,1996) que probablemente se origina en las raíces. Una vez que los estomas se han cerrado, esto da lugar a otras alteraciones fisiológicas y bioquímicas (Leon et al.,1996) que en conjunto finalmente ocasionan la muerte de la palma.

Según Belli (1984) la visualización de los fitoplasmas en órganos de vid infectados es difícil empleando microscopia electrónica en secciones ultrafinas, dando mejores resultados utilizando scanner. En todo caso, no se pueden distinguir especies diversas, teniendo que recurrir a métodos de biología molecular (PCR,RFPL, etc.), con los que se ha podido poner en evidencia la frecuente asociación de dos especies de fitoplasmas (que pertenecen a los grupos de AY y EY) con la flavesencia dorada. La época mas adecuada para la identificación de la enfermedad es a finales de verano y comienzo del otoño. Los años lluviosos son mas favorables para su extensión por producirse un mayor desarrollo de las cicadelas. (Hidalgo,L; Gavilan,U.2002)

2.4.6 Mecanismos de acción infectiva en las plantas

En la actualidad son cuatro los mecanismos conocidos para introducir el fitoplasma en el tejido vulnerable de las plantas hospederas:

- a) Propagación vegetativa del material de plantas infectadas.
- b) Conexiones vasculares hechas entre la infección y no infección de plantas hospederas de plantas parasitas.
- c) La alimentación del insecto vector en plantas hospederas no infectadas.
- d) La transmisión por semilla (por que el floema está altamente conectado a la semilla). (Dale, J., Kin, K. (1969); Helmes, K. (1962); Cordoba, I., et al 2003)

2.4.7 Sintomatología de las plantas infectadas por fitoplasma.

En general los síntomas que presentan las plantas con mayor frecuencia son:

- Amarillamiento o clorosis.
- Enrojecimiento precoz de la hoja.
- Esterilidad de las flores.
- Virescencia (los pétalos adoptan un color verde).
- Filodia (transformación de los órganos florales en estructuras foliares).

- Proliferación de yemas adventicias dando lugar a “escobas de bruja”.
- Enanismo generalizado.
- Desarreglos vegetativos.
- Enrollamiento de hojas y Decaimiento general.

Alguno de estos síntomas son casi exclusivos de espiroplasma y fitoplasma (virescencia, filodia, escoba de bruja) (Lepka et al., 1999; Musetti et al., 2000)

2.5 Establecimiento de los fitoplasma en los insectos vectores

2.5.1 Adquisición y transmisión del fitoplasma por insectos vectores

Los fitoplasmas son transmitidos de planta a planta por insectos vectores (Fig.9). El tiempo que pasa desde la adquisición inicial hasta la habilidad para transmitir el fitoplasma se le conoce como periodo latente y este algunas veces es llamado **periodo de incubación**. El periodo latente depende de la temperatura y sus rangos, este puede ir desde unos pocos días, hasta unos 80 días de duración.(Murrall DJ,et al 1996; Nagaich BB,et al 1995.)

Un claro ejemplo de esto son algunas especies del genero *Cacopsyllia* (del Orden Homoptera: Suborden Sternorrhyncha), que funcionan como vectores del fitoplasma responsables del decaimiento del peral. Estos insectos vectores adquieren el patógeno después de alimentarse de la planta infectada durante varias horas o días, pero lo transmiten hasta haber pasado un periodo de incubación de entre 10 a 45 días, pero esto puede variar dependiendo de la temperatura y de la época en que estos se alimenten. (Lepka et al., 1999; Musetti et al., 2000)

La duración necesaria de alimentación para adquirir suficiente proporción de fitoplasma puede ser corta y puede ir desde unos cuantos minutos, pero este factor es generalmente medido en horas. Esto proporciona mayor espacio para la adquisición de fitoplasma, así mismo el periodo de adquisición puede depender también de la proporción o cantidad de fitoplasma presente en la planta (Purcell A., 1982).

También se ha demostrado que cuando la cigarrita inocula una hoja de crisantemo, el fitoplasma migra del ápice a las raíces en 2 días pero requiere cerca de 3 semanas para infectar todas las hojas. Contrariamente se encontró que el fitoplasma nunca se detecto en hojas de papaya donde estas maduraban después que la planta había sido infectada, lo cual nos da una idea de la dinámica de movilidad de los fitoplasma en las plantas (Siddique, A. et al 1998).

El fitoplasma puede pasar intracelularmente dentro de las células epiteliales del sistema bucal del insecto y replicarse dentro de una vesícula o también pueden pasar entre dos células del intestino medio (Lefol, C. 1994) y a través de la membrana basal para entrar a la hemocelula.

El fitoplasma circula en la hemolinfa donde esta puede infectar otros tejidos como el de los tubos de Malpighi (Lherminier, J. 1990), cuerpo grasos y cerebro (Lefol, C.1994; Nakashima, K. 1995) como también en los órganos reproductivos (Kawakita, H et al. 2000); la replicación en estos tejidos aunque no es esencial para la transmisión puede ser indicativo de una larga duración coevolucionaria entre el hospedero y el patógeno.

Según Agrios (1997) los fitoplasmas atraviesan la pared del tracto intestinal, se multiplican en la hemolinfa, y al pasar a través de las glándulas salivales se multiplican aún más (Fig.

1). Luego, sucede el establecimiento de la enfermedad con los insectos vectores de fitoplasma que por medio de sus fluidos salivales infectan el floema de una nueva planta.

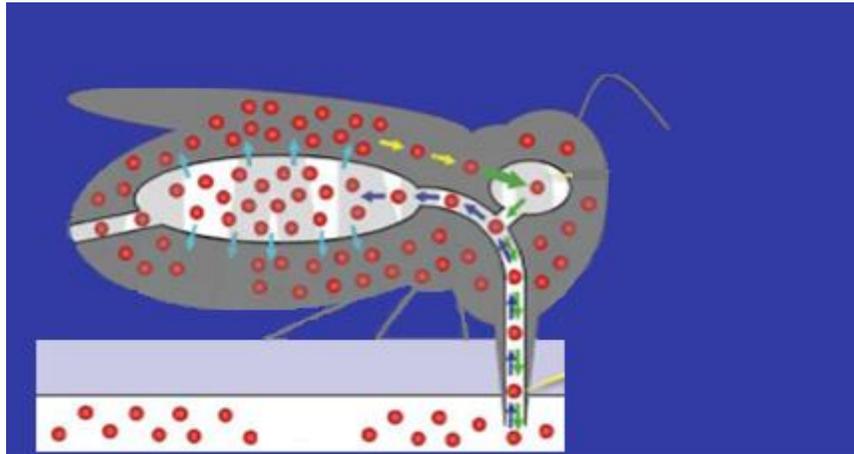


Figura 9: Transmisión de fitoplasma en Insectos homópteros

Los insectos que se alimentan del floema adquieren el fitoplasma pasivamente durante su alimentación en plantas infectadas. (Purcell A., 1982; Universidad de Tokyo. 2001).

Los estudios realizados por Cavallinil (1998) establecen que los fitoplasmas pueden sobrevivir en malezas u otros hospedantes, aunque sobreviven por largos periodos en la hemolinfa del vector, donde se multiplica, puesto que no existe transmisión transovarica.

Para que los fitoplasmas sean transmitido en las plantas debe penetrar específicamente en las células de las glándulas salivares y altos niveles deben ser acumulados en las posteriores células acinares de las glándulas salivares antes de que pueda ser transmitido. Hasta este punto y en este proceso puede que el fitoplasma falle para entrar o salir del tejido, ya que el insecto deber ser hábil para transmitir la enfermedad.

Para ilustrar este punto Wayadande (1997) demostró que una sola glándula salivar tiene tres barreras que los patógenos deben atravesar antes de que puedan ser expulsadas con la saliva; *la lamina basal*, *el plásmamela* (o membrana plasmática) y *el plasma apical*, claro ejemplo son las cigarritas que pueden ser infectadas con un fitoplasma y no ser hábil para transmitirlo a una planta sana, esto quizás se deba a las barreras que tiene que penetrar las glándulas salivares.

Es tan complejo su mecanismo de alimentación de algunos insectos, cuando se alimentan secretan una pequeña cantidad de saliva dentro del medio ambiente interno de la hoja, creando un medio de protección para el delicado estilete del insecto cuando este solidifica. (Backus EA, et al 2005; Buduca C, et al 1996; Lett JM, et al 2001.)

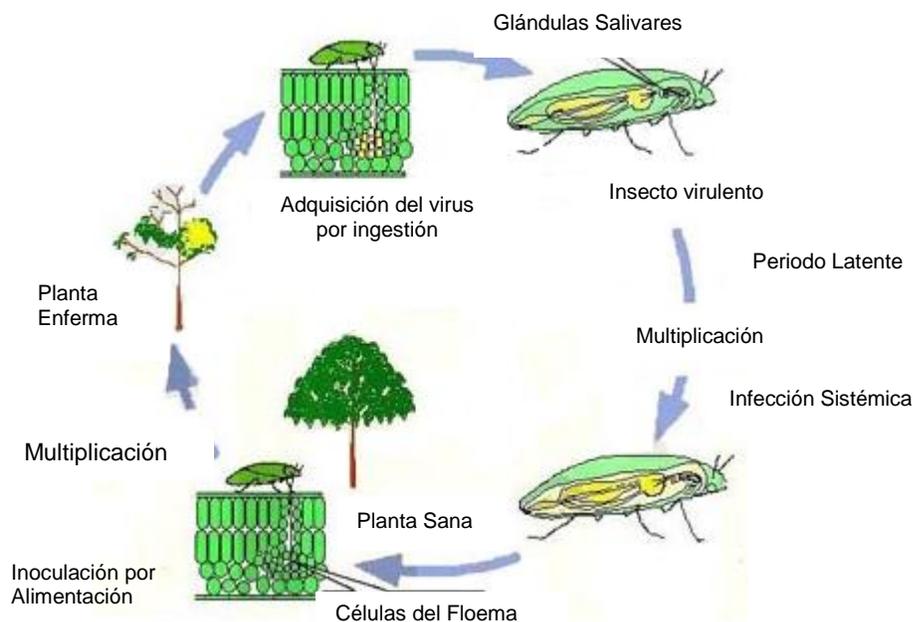


Figura 10: Ciclo de vida e interacción entre fitoplasma con el insecto

Los vectores infectivos transmiten el patógeno a plantas sanas cuando se alimentan por varias horas del floema, luego la multiplicación y alimentación del patógeno en el floema resulta en el desarrollo de los síntomas característicos (Cavallini, F. 1998; Universidad de Tokyo. 2001).

2.5.2 Transmisión transovarial

Estudios recientes elaborados por Alma et al (1997) establecen que algunos virus patógenos de las plantas y procariontes simbióticos pueden ser transmitidos transovarialmente donde el fitoplasma no está directamente transmitido por el vector de la hembra para la progenie. También en años recientes muchas investigaciones han reportado transmisiones transovariales de fitoplasmas como el vector de GY en viñedo transmitido por un cicadellido (*S. titanus Ball*) en Europa, en donde las hembras son hábiles para poner sus huevos en las plantas hospederas sanas y sus ninfas eclosionan para luego transmitir la enfermedad a la planta hospedante en todos sus estadios incluyendo el adulto quien infecta y transmite la enfermedad.

2.5.3 Factores de la capacidad de mediación de vectores

Algunos reportes recientes sugieren que la edad es un factor importante en la transmisión de fitoplasma, en algunos casos la transmisión se incrementa cuando el fitoplasma es adquirido por ninfas más que por adultos (Moya-Raygoza G.; Nault L., 1998) y (Murrall D.; Nault, L.; Hoy C.; Madden L.; Miller S. 1996).

La edad del fitoplasma y las condiciones ambientales son factores que pueden interactuar con la edad del vector en la capacidad de las cigarritas para transmitir la enfermedad (Murrall D.; Nault, L.; Hoy C.; Madden L.; Miller S., 1996).

Otros aspectos relevantes a considerar son planteados en el cultivo del peral, donde las ninfas del género *Cacopsylla*, además de transmitir la enfermedad de decaimiento del peral, provocan otros daños: como es el caso de las ninfas que contienen toxinas en su

saliva. Estas provocan un shock en la planta mientras el insecto se alimenta de su savia, ocasionando una disminución del crecimiento de las yemas y brotes, debilitando la planta y, en algunos casos, provocando deformaciones y defoliaciones importantes (Beers et al., 1993)

2.6 Métodos moleculares para la detección de enfermedades

2.6.1 Marcadores de ADN

Los avances de la biología molecular durante la década de los 80's, han aportado una clase nueva de marcadores genéticos que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homologas de los microorganismos. Esas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homologas.

Este tipo de marcadores detecta variaciones a nivel del ADN y tiene ventajas tales como el hecho de ser codominantes, de desarrollarse de manera estable, de carecer de efectos pleiotrópicos y sobre todo, de no estar sujetos al ambiente en donde se desarrolla el organismo en estudio, principalmente. Las propiedades mencionadas hacen que estos sean extremadamente útiles, para compararlos con los análisis a nivel de morfológico o de proteínas (del tipo isoenzimas). (Kahl, G., 2000 ; Valadez , E. 2000)

Para obtener marcadores del ADN se utilizan diferentes métodos que se pueden agrupar de manera convencional en tres categorías.

- La primera categoría se basa en la técnica conocida como **Hibridación tipo "Southern"**, que explora variaciones en la longitud de los fragmentos del ADN, ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular. En estas categorías se incluye a los métodos conocidos como (RFLP's) **Restriction Fragment Length Polymorphism** y (VNTR) **Variable Number of Tandem Repeats**. Por sus siglas en inglés respectivamente.
- La segunda categoría involucra las metodologías basadas en la tecnología de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR** por sus siglas en inglés (Fig11). Esta tecnología utiliza la secuencia de oligo nucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de seis kilo bases (**6kb**) en promedio.

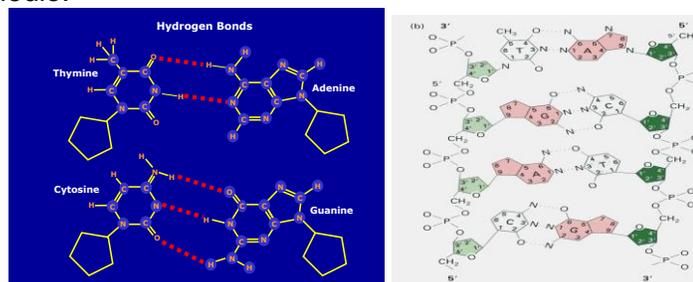


Figura 11: Puentes de Hidrogeno y oligonucleótidos de la cadena de ADN.

Fuente: Abrego, V.

Estas secuencias iniciadoras pueden ser aleatorias , semialeatorias o específicas, con las cuales ha sido posible caracterizar genomas de diferentes organismos , detectar y aislar organismos , e incluso diferenciar organismos genéticamente diferentes. Para esta tecnología, se pueden citar, se pueden citar por ejemplo las

metodologías empleadas que generan los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AP-PCR (*Arbitrarily PCR*), DAF (*DNA Amplification Polymorphic Fingerprinting*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), entre otras.

- c) La tercera categoría involucra las metodologías que combinan el PCR o sus productos de ADN mas la hibridación tipo “Southern”. Por ejemplo la técnica de RAHM (*Random Amplific Hybridization Microsatellites*) , que requiere las síntesis de ADN con cualquiera de las metodologías de PCR y la posterior hibridación con alguna sonda que detecte microsatélites. La combinación de ambas permite la optimización de un ensayo de amplificación, ya que con el resultado de la PCR se detecta un patrón particular de fragmentos, llamado de “primera generación”; pero al hibridar esas huellas genómicas con alguna sonda radioactiva que detecte micro satélites, es posible revelar otro patrón totalmente diferente llamado de “segunda generación” con lo que se optimiza el ensayo. (Kahl, G.,2000 ; Valadez , E. 2000)

2.7 Amplificación del ADN por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo. Esta tecnología se ha venido utilizando con bastante éxito desde que fue patentada en 1985 y se ha empleado en diferentes campos de conocimiento, tales como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalística, principalmente. Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas “**primer**”, una enzima de ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleotidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado “**termociclador**” (Fig.12), que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado.



Figura 12: Termociclador.

El PCR consiste en tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización del ADN y sirve para separar mediante temperatura de 94°C la molécula doble del ADN a cadenas sencillas, que sirvan como moldes para la síntesis del o los fragmentos respectivos. (Fig.13), En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el **alineamiento** (o reconocimiento) de las moléculas iniciadoras a la secuencia del ADN blanco molde. Las moléculas iniciadoras pueden variar de longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para aparearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar de 25 a 65° C. En el tercer paso, se lleva acabo el **alargamiento** o **extensión** de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa a 72°C. (Kahl, G.,2000 ; Valadez , E. 2000)

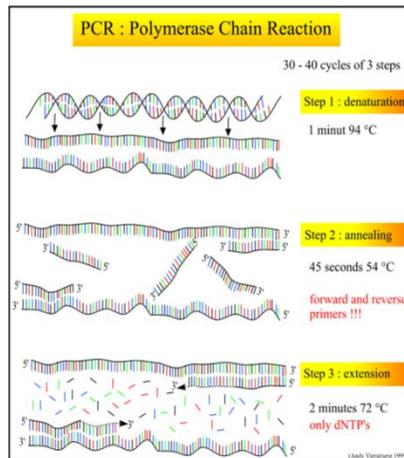


Figura 13: Separación de la cadena de ADN mediante la técnica PCR
Fuente: Abrego, V.

Lo más recomendable es que el ADN polimerasa seleccionada tolere la temperatura de desnaturalización y se mantenga activa durante el número de ciclos que se requieran; por ejemplo, en muchas investigaciones se utiliza el ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* debido a que tolera la temperatura de desnaturalización sin alterar su función de polimerización.

Estos tres pasos se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del modelo de ADN (Fig.14); por ejemplo, en una molécula de ADN, estas secuencias amplificadas (sintetizadas de *novo*), pueden ser visualizadas en un gel de agarosa con técnicas de tinción convencionales. (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

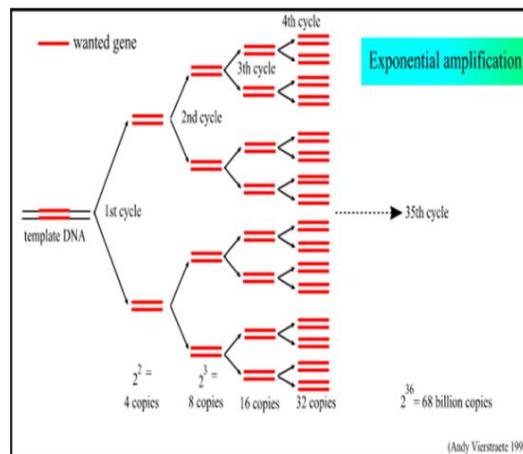


Figura 14: División exponencial de los fragmentos de la cadena de ADN.
Fuente: Abrego, V.

2.7.1 Marcadores Basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta metodología utiliza el ADN a investigar como plantilla, para sintetizar convenientemente fragmentos discretos de ADN, la cual presenta ventajas para el análisis de genomas a diferencia de los RFLP's que requieren grandes cantidades de ADN de

buena calidad para la detección de copias únicas y alto grado de manipulación de las muestras para detectar una fracción variable de secuencias existentes en el genoma, lo cual hace que su información sea limitada.

Existen muchas metodologías de PCR pero todas ellas requieren de pequeñas cantidades de moléculas sintéticas iniciadoras (oligonucleótidos) de secuencias conocidas y de enzimas de polimerasa para ADN que sea termoestable; por ejemplo la ADN polimerasa Taq (Fig.15). (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

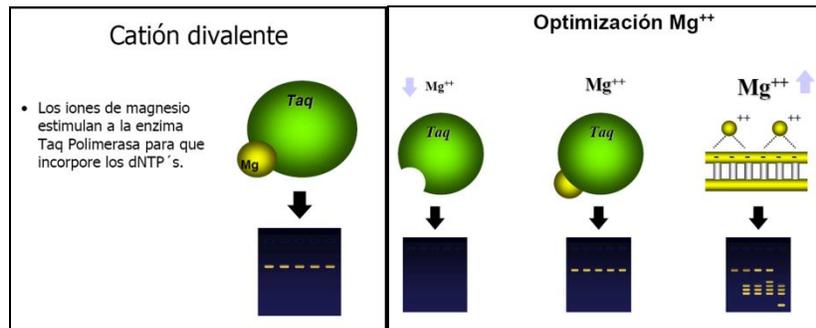


Figura 15: Optimización de las bandas de ADN en los geles de agarosa
Fuente: Abrego, V.

Además la técnica de PCR permite la duplicación exponencial (*síntesis de novo*) de regiones específicas de ADN a partir, incluso, de ADN's complejos como es el caso del genómico. Las pequeñas muestras del ADN duplicado (fragmentos) pueden compararse directamente por su polimorfismo al separarlas en geles de agarosa y teñirlas con bromuro de etidio. (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

2.7.2 Endonucleasas de Restricción

Las endonucleasas de restricción se encuentran en las bacterias como parte de un mecanismo que utilizan para degradar al ADN extraño o exógeno (Fig.16). Son proteínas que se pegan en particularmente a la doble cadena del ADN y la rompen en sitios específicos.

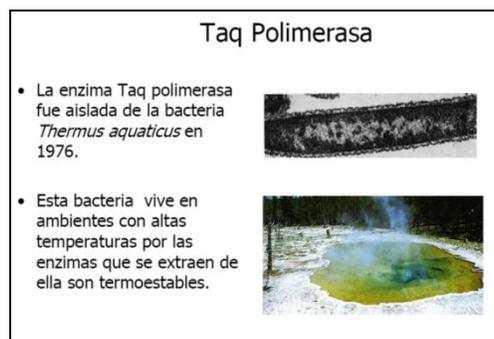


Figura 16: Morfología y distribución de la bacteria *Thermus aquaticus*
Fuente: Abrego, V.

Esta clase de enzimas se han clasificado en tres categorías principales, cada una de ellas son características particulares: (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

- Clase I: son endonucleasas compuestas de tres subunidades (R, restricción; M, metilación; S, secuenciación de reconocimiento) y exhiben tanto funciones de

restricción como de modificación. Por ejemplo la enzima Eco B, que reconoce la secuencia TGA(N)₈ TGCT, en donde N puede ser cualquier nucleotido, se pega y corta al ADN de manera no específica con una reacción de ATP en el extremo 3' a una distancia de 1 kb aproximadamente.

- b) Clase II: la mayoría de las enzimas que se utilizan en la tecnología de ADN recombinante pertenece a este grupo. Ellas conocen secuencias particulares de bases nitrogenadas que consisten de tetra, penta, hexa, hepta, u octanucleotidos llamada “**palindrome**” con un eje de simetría rotacional. Al ser cortados estos sitios de reconocimiento se da lugar a dos mitades simétricas, por ejemplo, la enzima Eco R1 reconoce la siguiente secuencia: 5'G↓AATTC 3' y 3'CTTAA↑G 5'. (Fig.17)

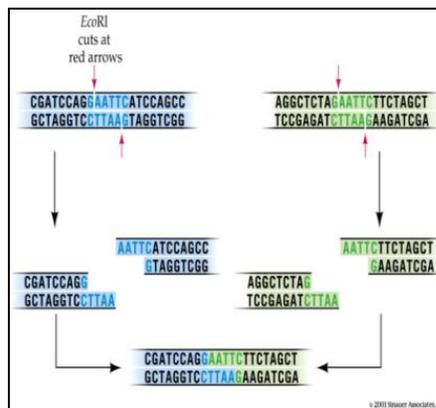


Figura 17: Corte de las enzimas de restricción dentro de la cadena de ADN.

Fuente: Abrego, V.

- c) Clase III: son endonucleasas compuestas de 2 subunidades, reconocen secuencias asimétrica estrecha, se pegan y catalizan el corte a una distancia de 24 a 26 pb (pares de bases) con una reacción que requiere ATP, además de Mg²⁺, utiliza a la S-adenosil metionina solo para la estimulación. Cuando el ADN se fragmenta con endonucleasas de restricción y los fragmentos se separan por electroforesis en geles de agarosa, relativamente poco se puede apreciar acerca de su estructura. Sin embargo, si los fragmentos se transfieren a una membrana de nailon o nitrocelulosa y se prueban para secuencias específicas, puede resultar un número limitado de fragmentos de diferente tamaño, lo que proporciona una evidencia interna del ADN ubicado alrededor de la secuencia que fue usada como sonda. Lo cual lo hace muy importante para la detección de marcadores genéticos.

2.8 Separación de Fragmentos de ADN por Electroforesis

2.8.1 Principio

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN producidos por el corte de las enzimas de restricción, es necesario utilizar una matriz inerte y semisólida. Esta matriz o soporte, puede ser de agarosa o poliacrilamida y dependiendo de la longitud esperada de los fragmentos, se opta por utilizar alguna de las dos.

La agarosa normalmente separa fragmentos que van desde 200 pb a 30 kb; mientras que la poliacrilamida resuelve fragmentos inferiores a 200 pb. La movilidad del ADN a través de la matriz está en función de su carga negativa, por lo que los fragmentos tenderán a

emigrar hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis. (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

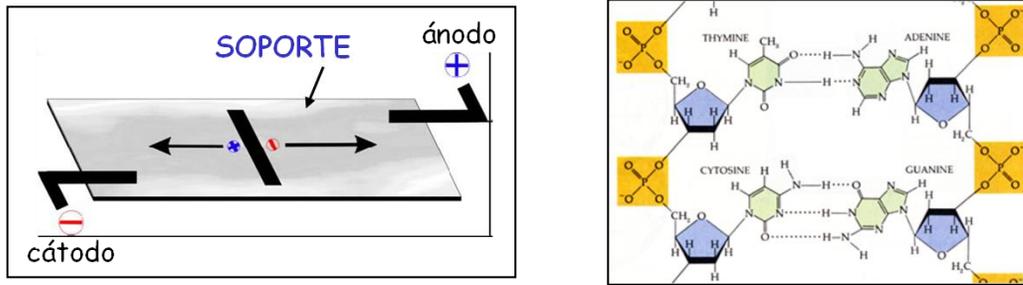


Figura 18-19: Electroforesis horizontal (agarosa) o vertical (poliacrilamida)

Fuente: Abrego, V.

Separación sólo por **TAMAÑO** Densidad de carga igual para todas las moléculas por los grupos fosfato
Ácidos nucleicos = carga (-)

2.8.2 Electroforesis en Geles de Agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es un método simple y eficiente para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN de varias longitudes (Cuadro 1). Los geles estándares de agarosa separan y resuelven fragmentos de 0.1 a 25 kb. Cuando se requiera resolución de fragmentos mayores de 10 a 2000 kb, se recomienda el uso de electroforesis de pulso de campo.

Cuadro 2: Espectro de resolución de fragmentos lineales de ADN

% de Agarosa	Fragmentos de ADN
0.5	30 a 1.0
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

El porcentaje de agarosa con el que se elabora el gel, depende del tamaño de las moléculas de ADN que van a separarse. Normalmente, la agarosa al 0.8% separan fragmentos provenientes de la digestión con enzimas de restricción que reconocen seis pares de base, mientras que la concentración de 1.0%, se utiliza para separar fragmentos generados por las enzimas que reconocen cuatro pares de bases, debido a que son pequeños, sin embargo, el uso de otras concentraciones de agarosa, permiten hacer más eficiente la separación de los fragmentos. (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

2.8.3 Tinción con Bromuro de Etidio.

El ADN puede visualizarse en el gel por previa tinción con una solución de bromuro de etidio (0.4 a 1.0µg/ml) durante 15 minutos y posterior observación con luz ultravioleta (Fig. 20). El bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino-6-etil-5-fenilfenantridio) es un colorante fluorescente y cancerígeno que se intercala entre las paredes de las bases de la doble cadena de ADN o ARN, la cantidad de ADN que puede visualizarse dependerá del grosor del gel y del tamaño del pozo. En un mini gel (de 10 a 11 ml de agarosa en una placa de vidrio de de 7.5 por 5 cm) y un pozo de 0.3 cm, la cantidad mínima de ADN que se puede

visualizarse es de 1ng. También es posible la detección de ácidos nucleicos cuando el bromuro de etidio se incorpora a la muestras de electroforesis. (Kahl, G., 2000; Valadez, E. 2000)

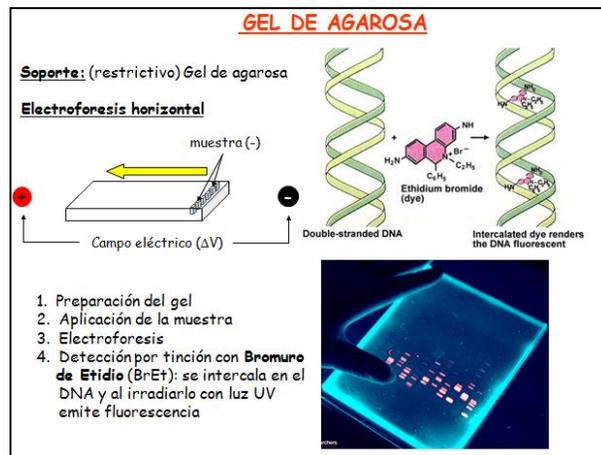


Figura 20: Tinción de agarosa con bromuro de etidio
Fuente: Abrego, V.

*Detección por tinción con **Bromuro de Etidio (BrEt)**: se intercala en el DNA y al irradiarlo con luz UV. Emite fluorescencia.*

En el caso de los fitoplasmas, las técnicas moleculares son de particular importancia si consideramos que estos patógenos no se pueden cultivar en medios nutritivos y además generalmente están presentes en concentraciones muy bajas, lo que dificulta seriamente su detección por técnicas convencionales como la microscopía (Dollet, 1999).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Fase Pre-experimental

Ubicación Geográfica:

La fase de campo se realizó en el Cantón San Antonio Tras El Cerro, Finca San Pedro, Municipio de San Vicente, específicamente en las faldas del Volcán Chinchontepec, Departamento de San Vicente a una elevación de 985 msnm.



Figura 21: Volcán de San Vicente

3.1.2 Reconocimiento y Colecta de Información Básica del lugar

La fase pre-experimental comienza con una gira de campo a la parcela, en la cual se realizó una entrevista al productor para obtener información básica de la zona, dando como resultado que este tiene un área de total de terreno de 2.14 mz, de las cuales 1.37 mz son dedicadas a la producción de Jocote de Corona, la cantidad de árboles dentro de esta área es de 150 árboles a un distanciamiento de 8x8 m, de los cuales solo 70 de ellos están en producción, estos tienen una edad promedio de 29 años, los árboles restantes tienen una edad promedio de 8 años. La plantación fue establecida en un primer momento por su padre en un área pequeña y posteriormente extendida por él. Esta información fue muy importante ya que dentro de su parcela solo registra un caso de aparente ajobamiento o apitarramiento en el Jocote de Corona. Lo cual fue de suma importancia para la investigación, puesto que era un buen punto de partida para la obtención de material sano.

3.1.3 Colecta de Muestras Previas

Esta actividad consistió en conocer de antemano por medio de la vista en campo, la sintomatología que presentaba el único árbol de Jocote de Corona infectado con fitoplasma en la parcela del productor, y que de acuerdo con la vivencia y experiencia de él, este había reducido su tamaño, calidad, apariencia y sabor del fruto, posteriormente se obtuvieron 6 estacas. Así mismo se optó en ese momento cortar y obtener 3 estacas, esto se realizó con el propósito de dejar llorar las estacas durante un periodo de 15 días para luego sembrarlas en bolsas de polietileno y evaluar dos tipos de sustrato; uno con tierra negra más materia orgánica y el otro solo con tierra negra. La finalidad de esto fue observar el comportamiento y desarrollo de las estacas. Para luego obtener información de cual sustrato fue el más adecuado para el desarrollo de éstas.

3.1.4 Evaluación Previa de Emergencia y Crecimiento de Brotes en las Estaca de Jocote de Corona

Esta práctica consistió en observar y anotar cuantos días tardaron las estacas en emerger el primer meristemo o primordio vegetativo, para lo cual se llevó un registro a diario en una libreta de campo, al mismo tiempo se midió la longitud (cm) y desarrollo en cm del meristemo o brote lateral. Esta actividad se llevó a cabo hasta los 53 días de sembradas las estacas. La finalidad de esta práctica fue comparar el patrón de crecimiento de los brotes en las estacas.

3.2 FASE DE CAMPO:

3.2.1 Compra de Materiales

El primer paso para la compra de materiales consistió en estimar en número de varillas de hierro de $\frac{1}{4}$ pulgada cilíndrica lisa que se necesitaban para elaborar las jaulas. Para esto se definió primero el diseño que deberían de tener las jaulas, para ello se consensó junto con los asesores que el mejor diseño era la forma cilíndrica, puesto que los insectos no tendrían esquinas en las cuales ocultarse. Posteriormente se definieron las dimensiones que tendrían las jaulas y se calculó el total de material a utilizar. Además se compraron 3 libras de electrodo H0 dulce B3/32P, para el soldado de hierro de las jaulas.

Así mismo se definió con los asesores cual sería la tela idónea para elaborar las fundas tomando en cuenta el costo, resistencia y espacio entre agujeros, llegando a la conclusión que el mejor tipo de tela a utilizar sería la comercialmente conocida como Tricot de color blanco. Además se compraron zipper plástico de 18 pulgadas e hilo para complementar el diseño de las trampas, así como la compra de retazos para la elaboración de las mangas y por último se compraron 2 yardas de plástico de forro de 0.5 de grosor para la elaboración de las ventanas.

3.2.2 Corte de tela

Esta actividad consistió en adecuar el corte de tela de acuerdo con las dimensiones requeridas de las jaulas al largo de estacas de Jocote de Corona. Dado que el rollo de tela Tricot tenía una altura de 1.40 m de alto, se tuvo que cortar a una altura de 90 cm y un largo de 2.60 m, esto fue así porque el largo del rollo era $104\frac{7}{8}$ yardas.

3.2.3 Elaboración de funda

A la funda se le creó un diseño que constaba de una ventana elaborada con forro plástico transparente cuya función era facilitar la observación del desarrollo, crecimiento, comportamiento y sintomatología de las estacas, como también la movilidad de los insectos dentro de la jaula, además se le creó una manga de tela la cual permitió introducir el brazo para realizar maniobras de volteo de hojas, captura y extracción de insectos muertos dentro de la jaula.

Cada jaula contaba con una zipper a un costado de la jaula, el cual ayudo a la entrada de atomizadores que permitían la aplicación de hormona en las estacas, así como la entrada de recipientes plásticos para el riego de las estacas (Fig. 22).



Figura 22: Jaula cilíndrica para insectos

3.2.4 Elaboración de Jaula

Esta fase consistió en la elaboración de 48 jaulas de forma cilíndricas, con varilla de hierro de 1/4", en las cuales se considero un diámetro de 60 cm y un alto de 80 cm (Fig. 23), así mismo estas fueron cubiertas con una funda de tela o malla comercialmente conocida como "Tricot" cuya función era no permitir la salida de los insectos que se deseaban evaluar dentro del experimento.



Figura 23: Cubrición de jaulas con fundas

3.2.5 Traslado de jaulas a la parcela

Para el traslado de las trampas a la parcela fue necesario el uso de un camión que pudiera transportar un gran volumen, puesto que el esqueleto o armazón de las jaulas era pesado, pero si ocupaba un gran espacio. Por lo cual se pensó en un camión. El cual fue proporcionado por la Facultad Multidisciplinaria Paracentral, de la Universidad de El Salvador, con sede en la ciudad y departamento de San Vicente.

3.2.6 Instalación de fundas en las jaulas.

Esta actividad se realizo en conjunto con cada uno de los asesores y consistió en coser a mano cada uno de las trampas al pie de la estructura metálica con el propósito de darle rigidez a la tela y sellar las trampas para lograr un mayor confinamiento de las estacas de Jocote de Corona (Fig. 24). Posteriormente estas fueron cosidas y unidas con una bolsa plástica de color negro a nivel del suelo para no permitir la entrada de pulgones u otros animales que salieran de la superficie del suelo.



Figura 24: Cosido de jaulas

3.2.7 Muestreo fitosanitario en árboles de jocote de corona (*Spondias purpurea*) dentro de la parcela.

Para la realización de esta práctica, se conto con la ayuda del productor, la cual consistió en realizar un recorrido dentro de su parcela (Fig. 25), con el propósito de observar e identificar arboles de Jocote de Corona que aparentemente estuvieran sanos o enfermos con fitoplasma.



Figura 25: Muestreo de árboles de Jocote de Corona en la parcela

Durante el muestreo se abarcó un área de 640 m² dentro de la parcela, seleccionando aleatoriamente dentro de ella un lote de 10 árboles de Jocote de corona aparentemente sanos, los cuales fueron identificados y marcados con atomizadores de pintura de aceite (“espray”) de color naranja fluorescente en su base (Fig. 26), escribiendo números correlativos desde el 1 al 10.



Figura 26: Identificación y numeración de árboles de Jocote de Corona.

3.2.8 Colecta de muestras vegetativas para análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la recolección de muestras vegetativas el árbol fue dividido en tres partes: parte baja, media y alta del follaje (Fig.27). Para lo cual a la parte baja del follaje se le asignó el número 1.1, a la parte media se le designó el valor de 1.2, y a la parte alta del follaje se le dio el valor de 1.3.

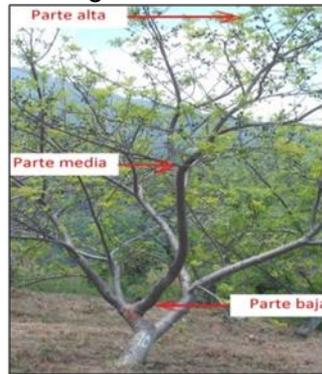


Figura 27: Muestreo estratificado del árbol

Después a cada uno de los árboles muestreados, se les colectó 1 gr de tejido vegetal de los folíolos más jóvenes (Fig.28).

Luego fueron colocados en pedazos recortados de papel de empaque con su respectiva identificación (árbol de procedencia).



Figura 28: Colocación de brotes tiernos en sobres de papel

Después fueron humedecidos con agua purificada para conservar la humedad (Fig. 29), después estos fueron colocados en una bolsa plástica de 2 lb.



Figura 29: Humedecimiento de muestras con agua

Y posteriormente rotulados con un pedazo de tirro con la información correspondiente (fecha, árbol de procedencia y lugar) y guardadas en refrigeración para su respectiva conservación.

3.2.9 Almacenado de Muestras Vegetativas

Las muestras vegetativas se colocaron dentro de una bolsa plástica de 5 libras (Fig. 30), las cuales fueron rotuladas con plumón permanente sobre un pedazo de tirro grueso que fue pegado sobre la bolsa plástica.



Figura 30: Introducción de muestras vegetativas en bolsas plásticas

Posteriormente estas fueron colocadas dentro de otra bolsa plástica de la misma capacidad (Fig. 31), con el propósito que estas quedaran bien selladas.

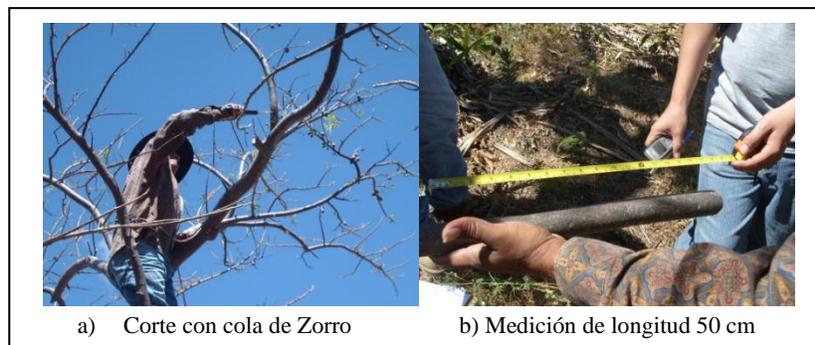


Figura 31: Sellado y rotulado de muestras

Luego estas fueron enviadas al Centro de Diagnóstico de Patógenos de la Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano), Honduras. Para ser sometidas a pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para comprobar su estado fitosanitario.

3.2.10 Corte y recolección de estacas en los árboles muestreados

Durante esta fase, también se contó con la ayuda del productor y esta consistió en la poda de ramas de los árboles de Jocote de Corona ya identificados, para lo cual se cortaron ramas con un promedio de 3 a 4 m de largo (Fig. 32). De las cuales se obtuvieron estacas de aproximadamente 50 cm de longitud con diámetros variables.



a) Corte con cola de Zorro

b) Medición de longitud 50 cm

Fig. 32: Corte y medición de estacas de Jocote de Corona

A las cuales se dejó un bisel en la parte superior de la estaca con el propósito de un mejor escurrimiento del agua de lluvia y otro bisel de menor ángulo en la parte inferior para propiciar un área de mayor enraizamiento.

Luego estas se dejaron reposar dentro de jaulas durante un periodo de 12 días después de haber realizado la poda (Fig.33), ya que de acuerdo con la experiencia del productor Alejandro Serrano dueño de la propiedad en donde se ubico el presente estudio. Esta actividad permitió que la estaca produzca resina y vuelva más efectivo el enraizamiento en el suelo.



Fig.33: Exudado de savia

Cada una de las estacas fue identificada con el número del árbol seleccionado durante el muestreo y fueron cubiertas con tela para conserva su aislamiento.

3.2.11 Confinamiento de estacas dentro de la jaula metálica y funda de tela sintetica.

Esta actividad consistió en cubrir o tapar las estacas con las jaulas elaboradas (Fig. 34), con lo cual se evito la llegada de insectos succionadores que pudieran alterar el estado fitosanitario de las estacas colectadas. El tiempo que pasaron las estacas bajo la protección de las jaulas fue de 12 días antes de ser sembradas en las bolsas de polietileno.



Fig. 34: Cubierta de estacas con fundas de tela Tricot

3.2.12 Delimitación, Limpia y Preparación del Terreno

Para la delimitación del terreno, primero se procedió a definir el área de trabajo en donde se colocaría las trampas, para cual se tomo en cuenta un área 91 m^2 , considerando una dimensión de 13 m de largo por 7 m de ancho. Una vez definida esta área se procedió a la limpieza o desmonte del terreno (Fig.35), la cual se realizo por medio de labranza mínima.



Fig.35: Limpieza del Terreno

Luego se procedió a la preparación del terreno realizando terrazas tipo bancal con un ancho de 1.60 m de superficie plana en donde se colocaron las jaulas (Fig.36), luego se dejo una caída de 1m para la división de la segunda terraza y así sucesivamente para la tercer terraza.



Fig.36: Elaboración de terrazas individuales

3.2.13 Llenado de Bolsas

La siguiente fase consistió en la recolección de tierra para el llenado de 200 bolsas de polietileno, para esta actividad se procedió a extraer y coleccionar tierra del mismo lugar con el propósito de crear un medio adecuado y familiar a las estacas, y reducir al máximo el estrés de estas, evitando transportar tierra con problemas desanidad.

Posteriormente se tamizo por medio de tela sarán (Fig.37), esto se hizo con la finalidad de eliminar piedras y otros materiales que obstruyeran el proceso de enraizamiento de las estacas.



Fig.37: Tamizado de la tierra

Luego esta tierra fue colocada en las bolsas de polietileno (Fig. 38) con dimensiones de 9x12" y posteriormente estas fueron trasladadas en jabs plásticas al lugar del experimento.

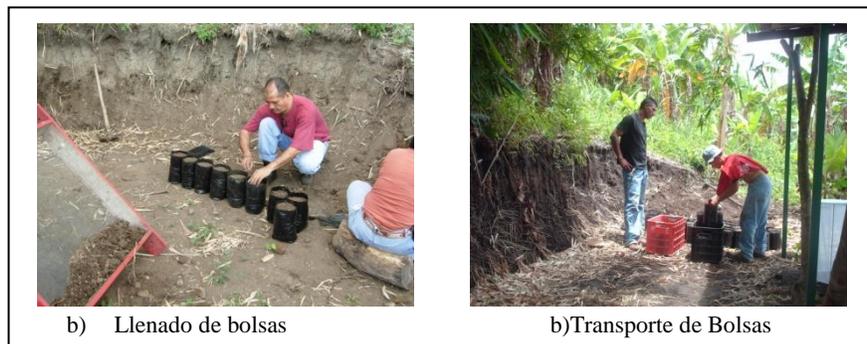


Fig. 38: Llenado y transporte de Bolsas de polietileno

3.2.14 Siembra de Estacas

Posteriormente las 200 estacas que habían sido confinadas durante 12 días se introdujeron o se sembraron dentro de las bolsas de polietileno (Fig. 39) con el sustrato conformando grupos de 4 estacas dentro por cada jaula elaborada.

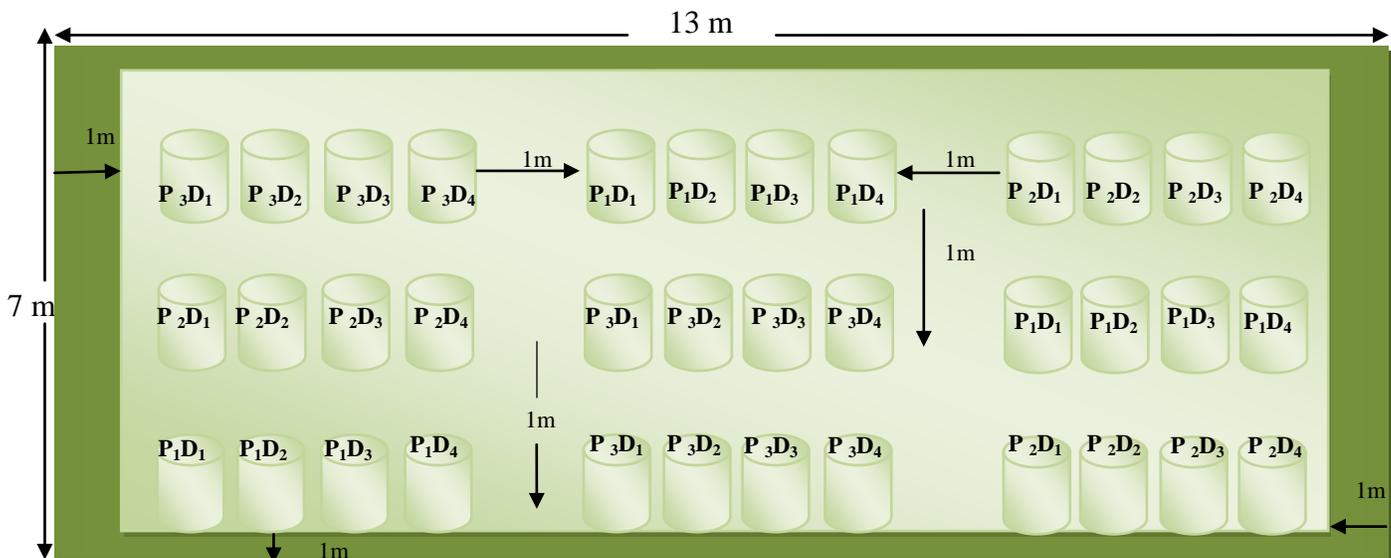


Fig. 39: Siembra de estacas de Jocote de Corona

3.2.15 Instalación y distribución Previa de los Tratamientos Experimentales.

Esta actividad consistió en realizar un diagrama del diseño experimental y distribución de los tratamientos (Fig.40 y Fig. 41), luego se realizó una azarización de los tratamientos en cada una de las repeticiones dentro de cada terraza.

Figura 40: DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL
VISTA FRONTAL



TRATAMIENTOS:

P₁D₁	<i>Graphocephala sp.</i> ; población 5	P₂D₁	<i>Coelidia sp.</i> ; población 5
P₁D₂	<i>Graphocephala sp.</i> ; población 10	P₂D₂	<i>Coelidia sp.</i> población 10
P₁D₃	<i>Graphocephala sp.</i> ; población 15	P₂D₃	<i>Coelidia sp.</i> población 15
P₁D₄	Insecto 0; población 0	P₂D₄	Insecto 0; población 0
P₃D₁	<i>Psyllidae sp.</i> ; población 5		
P₃D₂	<i>Psyllidae sp.</i> ; población 10		
P₃D₃	<i>Psyllidae sp.</i> ; población 15		
P₃D₄	Insecto 0; población 0		

Figura 41: Descripción de las unidades experimentales con su respectivo nivel de población

3.2.16 Instalación del Experimento en Campo.

El montaje del experimento fue una de las actividades principales dentro de la investigación (Fig. 42.), la cual consistió en trasladar las bolsas de polietileno llenas a cada una de las terrazas que conformarían cada repetición, posteriormente estas se cubrieron con las jaulas conformando 12 jaulas por terraza y haciendo un total de 48 jaulas en los 3 terrazas.



Figura 42: Actividades principales para el Montaje del Experimento

3.2.17 Colecta y confinamiento de Insectos mediante redes entomológicas en San Vicente.

Se dispuso la colecta con base a 10 pasos de red de cada uno de los árboles dentro de la finca, aumentándolo cada vez más conforme fuera necesario (Fig. 43), con el objetivo de capturar la mayor cantidad de *Graphocephala sp.* Y *Coelidia sp.*, para su consecutivo confinamiento.



Figura 43: Proceso de Colecta y Confinamiento de insectos *Graphocephala sp.* Y *Coelidia sp.*, En el Departamento de San Vicente.

3.2.17.1 Colecta con succionadores.

Se utilizo un dispositivo de succión hecho con mangueras de vinil 5/12" y tubos plásticos transparente, esqueletos de boligrafos, con revestimiento en ambas puntas del esqueleto con tela Tricot, cuya función es evitar el paso del insecto hacia la cavidad bucal, de esta manera se garantiza la retención del insecto dentro de este esqueleto, dando mayor resultado en la manipulación del mismo.

Al identificar el insecto en la planta se procede a la captura del insecto mediante la red batidora, esto para reducir el paso del insecto, para luego proceder a la aspiración y captura.

Con tubos de ensayo de vidrio con su respectiva tapadera se colectan los insectos, teniendo el cuidado de poner en diferentes tubos (Fig. 44).

Luego se coloca el insecto en bolsas revestidas con tela Tricot a ambos lados, para que el insecto no muriera por falta de oxigeno, las bolsas conteniendo los insectos se colocaban alrededor de la rama de Jocote de Corona para que continuaran alimentándose (Fig.45), teniendo el cuidado de colocar cinta adhesiva entre la bolsa y la rama para que el insecto no migrara de un lugar a otro manteniéndose concentrada en las hojas de la rama.



Figura 44: Proceso para la Captura, mediante succionadores

La cual no estuviera en contacto directo con el sol para evitar muertes por las elevadas temperaturas dentro de la bolsa. Durante un mes, esto con el fin de que el insecto se alimentara de las hojas.

Para el confinamiento de los insectos, se diseñaron bolsas de capacidad para 25 lb con respiradores a ambos lados con tela Tricot con una dimensión de 17 cm X 17 cm. Para facilitar evo transpiración dentro de la bolsa.



Figura 45: Confinamiento de insectos con bolsas plasticas

Esta actividad se realizo en época lluviosa (Fig. 46), dándonos como resultado acumulación de agua dentro de las bolsas.



Figura 46: Resultado de esta técnica en época lluviosa

Para contrarrestar esto, se optó por abrirle una serie de perforaciones debajo de la bolsa para que sirviera de drenaje del agua (Fig 47).



Figura 47: Perforaciones en la parte final de la bolsa contenedora de insectos en estudio

3.2.18 Limpieza del terreno

Esta actividad consistió en la eliminación de la maleza desarrollada en las jaulas y calles del experimento (Fig. 48), para lo cual se procedió a limpiar, la maleza de hoja ancha y angosta que ocupaban un gran espacio dentro de las jaulas, provocando en algunos casos el enredamiento de estos en las estacas.



Figura 48: Problemas de malezas en el área del experimento.

Así mismo se realizó la limpieza de maleza fuera de la jaula y entre las calles (Fig. 49) teniendo cuidado de no cortar la funda de la jaula con el filo de la cuma.



Figura 49: Limpieza de malezas en el área del experimento

3.2.19 Elaboración de la hoja de campo

Para la recolección de datos en campo fue necesaria la utilización de una hoja de datos (Fig.50), se contemplo que debía tener la ubicación e información individual de cada una de las jaulas dentro de cada tratamiento, así como la ubicación de este dentro de cada bloque para lo cual fue necesario tener en cuenta los siguientes aspectos

- ✘ Número de Estacas
- ✘ Estacas enraizadas
- ✘ Número de Estacas sin Brotes
- ✘ Número de Brotes/ estacas
- ✘ Promedio de Brotes por Estaca enraizadas
- ✘ Promedio de brotes por Estaca enraizadas en repetición
- ✘ % de estacas enraizadas por repetición
- ✘ % de estacas sin Brote por repetición
- ✘ Observaciones generales

HOJA DE CAMPO			FECHA
REGISTRO Y OBSERVACIÓN DE ESTACAS CON DESARROLLO DE BROTES DENTRO DEL EXPERIMENTO			
B1	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____
B2	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____
B3	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____	 #Est. _____ #Est./Peg. _____ #Est./Muert. _____ #Brotes _____ Prom./Bot. _____ Promedio de brotes por repetición _____ Promedio de estacas pegadas por repetición _____ Promedio de estacas muertas _____ Observaciones: _____

Figura 50: Esquema de la hoja de campo

3.2.20 Recuento de brotes desarrollados en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente

Una vez terminado el diseño y elaboración de la hoja de campo se procedió a la toma de información de cada una de las jaulas para lo cual se conto el número de brotes desarrollados en cada una de las estacas a los 50 días después de sembrada las estacas en campo (Fig. 51). Se conto con el apoyo logístico de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).



Figura 51: Proceso para el recuento de brotes desarrollados en estacas de Jocote de Corona

Una vez que los datos eran recolectados se procedió a realizar el análisis estadístico, para conocer cuál había sido el comportamiento de las estacas y brotes desarrollados en cada uno de los recuentos siguientes; 58, 69 y 101 días después de sembradas las estacas.

Además esta recolección de datos facilitó información real para la toma de decisiones en campo.

3.2.21 Aplicación de hormona bio-Q en las estacas

Esta actividad consistió en aplicar un estimulador hormonal a cada una de las estacas, con el fin de mejorar la nutrición y acelerar de alguna forma el proceso de formación de callo en las estacas, puestos que estas aun no habían desarrollado raíces absorbentes (esta actividad se repitió 3 veces).

3.2.21.1 Disolución y aplicación de la hormona

La preparación de la hormona consistió en diluir la hormona de acuerdo a las dosis recomendadas en el panfleto por medio de una jeringa y un recipiente con capacidad de 100cc (Fig. 52), posteriormente se agitó para tener una mejor homogenización del producto, después este se introdujo dentro de la jaula aplicándose 3 rociadas por estaca.



Figura 52: Aplicación de hormona Bio- Q a las estacas de Jocote de Corona

Cabe mencionar que la aplicación se hizo en horas frescas en horas frescas y dirigirse a las partes verdes para obtener una mejor absorción de la hormona por parte de las estacas.

3.3. Traslado de Jaulas

Esta actividad consistió en mover las jaulas a unos 15 metros de donde había sido montado el experimento inicialmente (Fig. 53), ya que por problemas económicos de transporte y acceso al lugar se hacía muy difícil una vista constante para el riego y mantenimiento de las estacas. Por lo cual se busco un lugar donde se aprovechara la sombra y que mantuviera la humedad de las estacas dentro de las bolsas de polietileno, además que este lugar proporcionara una cobertura vegetal buena por árboles para que actuara como barrera rompe vientos y evitar así un nuevo volteo de las jaulas.

Así pues, se decidió realizar un sondeo rápido dentro del terreno lográndose ubicar dentro de la parcela un conglomerado de bambú de la india, el cual proporcionaba un buen microclima para ubicar las jaulas por debajo de ellos y reducir así la pérdida de humedad por las horas de exposición al sol, ya que la época lluviosa había concluido y las bolsas de polietileno donde habían sido sembradas las estacas estaban perdiendo la humedad contenida en el suelo, pasando de la capacidad de campo al punto permanente de marchitez.



Fig. 53 Traslado de Jaulas

Por lo cual las jaulas fueron trasladadas sin ningún problema a este lugar, para lo cual se tomaron las siguientes medidas; primero se limpio la superficie del suelo por medio de un azadón y luego se ubico sobre la superficie del suelo pedazos de tela Tricot o fundas dañadas por la acción del viento (Fig.54).

Después cada una de las bolsas de polietileno fueron colocadas por encima de estas como medida de protección contra insectos del suelo (medida que no tuvo mucho éxito porque dentro de cada muestreo realizado; siempre se encontraron insectos dentro de las jaulas).



Fig. 54 Reordenamiento de estacas después de traslado

Seguidamente, aquellas estacas que habían sido trasladadas fueron identificadas nuevamente con marcador permanente con el número del árbol muestreado, para evitar que se borrara por la acción del tiempo o la lluvia (de acuerdo con esto creemos que; una práctica y fácil para conservar la identificación de la estaca es la utilización de papel plastificado con la codificación escrita a lápiz y amarrado con hilo en la estaca). Partiendo se identificaron las estacas; pero durante el proceso se encontraron algunos inconvenientes como el borrado de los códigos o números en las estacas dificultando de la identificación de estas (Fig.55). Por lo cual se opto por una nueva codificación o identificación la cual era estaca "Sin número" mas el numero correlativo partiendo desde 1, el cual se abrevio de la siguiente manera "Sn 1", "Sn2" y así sucesivamente en cada una de las estacas no identificadas.



Fig 55. Identificación, rotulación y apertura de nueva base de datos de estacas de Jocote de Corona.

Posteriormente cada una fue cubierta con tierra en su base (Fig.56), con la finalidad de proporcionar una mayor rigidez a estas y evitar así nuevos volteos.



Fig. 56 Colocación de tierra alrededor de la base de la jaula conteniendo estacas de Jocote de Corona

Por último de las 48 jaulas existentes solo 10 fueron colocadas en línea y luego reforzadas por medio de 3 pitas de nylon, las cuales pasaban en la parte superior, parte media y parte baja de las jaulas (específicamente a unos 20 cm del nivel del suelo), para que después fueran fijadas sobre dos estacas ubicadas al inicio y al final de la línea formada por las jaulas (Fig. 57), así mismo se pusieron dos estacas en la parte media de la línea para evitar el volteo de estas en la parte de central.



Fig. 57 Amarre de Jaulas conteniendo estacas de Jocote de Corona

En conclusión el nuevo lugar brindo mejores condiciones para de crecimiento y desarrollo para las estacas (Fig. 58), facilitando de esta forma: el control de malezas, los problemas de riego de las estacas y facilitando el manejo e introducción de insectos en las jaulas.



Fig. 58 Colecta de insectos *Graphocephala sp.* Y *Coelidia sp* confinadas en la microjaula e introducción hacia las jaulas conteniendo estacas de Jocote de Corona

3.4 Observación de síntomas de fitoplasma en Santa Ana en arboles de jocote corona, en plantaciones de avanzada edad.

Para la realización de esta actividad se conto con la ayuda y participación del Ing.Agr. Adamid Beltrán técnico en jocote de corona del Programa Frutales de CENTA. El cual nos llevo por varios recorridos por Santa Ana específicamente a aquellos cantones y caseríos donde el fitoplasma había acabado con plantaciones enteras de más de 40 años de edad y donde se conoce la enfermedad desde hace unos años atrás (Fig.59).

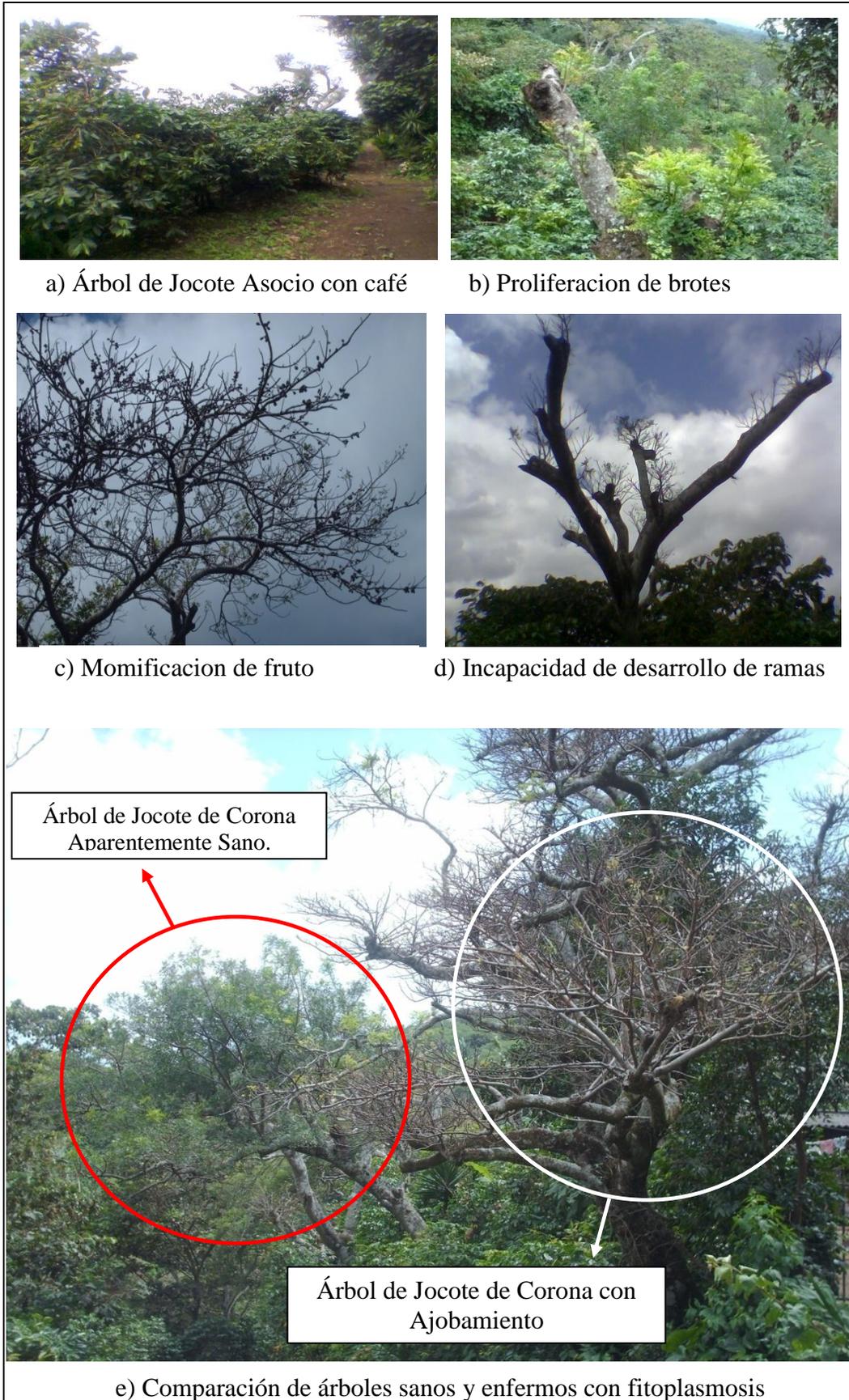


Fig. 59 Observación de síntomas de fitoplasmosis en Santa Ana

Así mismo se aprovecho este viaje para observar la entomofauna del lugar y constatar la abundancia de 2 vectores de fitoplasma entre ellos *Graphocephala sp.* y *Coelidia* por medio de redes entomológicas (Fig.60), además de otras especies de homópteros sospechosos de transmitir la enfermedad.



Fig. 60 Observación de insectos presentes en Santa Ana

3.5 Colecta de insectos Homoptera: *Graphocephala sp* y *Coelidia sp.*, por medio de redes entomológicas.

Una semana después de haber realizado la gira en campo en Santa Ana y ver la abundancia de los insectos aparentemente transmisores de la enfermedad y compararla con la poca abundancia o presencia de estos insectos en San Vicente, se toma la decisión con los asesores de coleccionar estos insectos en Santa Ana e introducirlos en las jaulas cilíndricas con estacas de jocote de corona en el volcán de San Vicente (Fig. 61).

Así que se procedió a la búsqueda y colecta de insectos en árboles de jocote de corona, siendo muy difíciles de ubicar puesto que los árboles eran muy altos por su avanzada edad y por tener muy pocas hojas en sus ramas, así que se fue un poco más minucioso en la búsqueda de estos insectos.



Fig. 61 Colecta de insectos en Santa Ana en árboles de Jocote de Corona

Después de unas horas de búsqueda y con la ayuda del Ing. Agr. Adamid Beltran se logro observar que estos insectos se encontraban en las hojas de los cafetales (Fig.62), que se encontraban en asocio con Jocote de Corona, así que se decidió buscar insectos en un radio de 3 mt del tronco del árbol de Jocote de Corona, asumiendo que los insectos que estaban en los cafetales podrían haberse infectado al alimentarse del árbol de Jocote de Corona por estar cerca de él y por ende podrían haberse alimentado de ambos arboles debido a su cercanía.



Fig. 62. Observación y colecta de insectos en cafetales aledaños a arboles de Jocote de Corona en Santa Ana

Entonces se procedió a sacudir las partes altas de los arboles de café donde se ubican las hojas mas tiernas con ayuda de la red entomológica, logrando exitosamente la captura de insectos como *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.* (Fig.63), siendo los primeros un poco más difíciles de capturar por ser muy activos y poco frecuentes.



Fig. 63 Colecta de insectos en zonas cafetaleras del Departamento de Santa Ana, mediante redes entomológicas

Luego estos eran succionados con ayuda de aspiradores hechos de tubo de vinil transparente (Fig.64 y 65) seguido de un pedazo de 1 x 1 cm de tela Tricot metido sobre la estructura de un lapicero transparente.



Fig. 64 Proceso de captura y confinamiento de insectos *Graphocephala sp.* Y *Coelidia sp.* para su traslado desde Santa Ana a San Vicente

3.5.1 Traslado de insectos Homopteros: *Graphocephala sp.* Y *Coelidia sp.* a las jaulas.

Esta fue una de las etapas más difíciles de la investigación en cuanto al manejo de los insectos; ya que la población de insectos colectados en Santa Ana rondaba en promedio

los 30 a 40 insectos por viaje por lo cual se procedió a evaluar diferentes técnicas de transporte las cuales se describen de la siguiente manera.

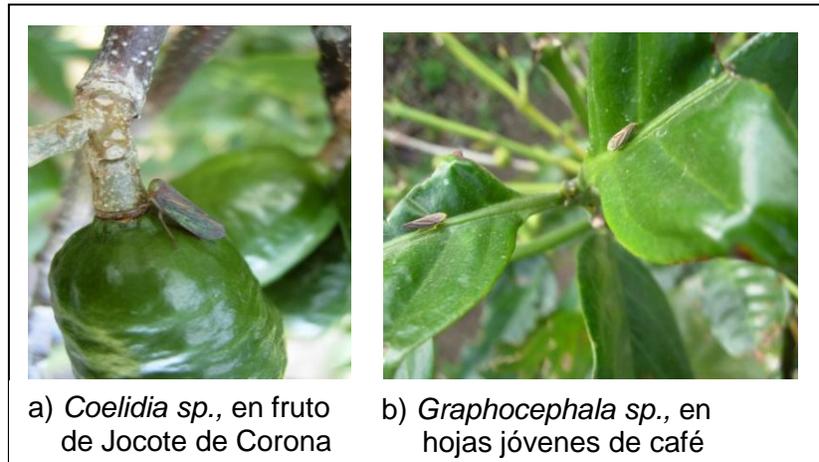


Fig. 65 Observación e identificación de insectos *Graphocephala sp.* Y *Coelidia sp.*, en Jocote de Corona y Café

3.5.1.2 Traslado de insectos en tubos de Ensayo

Esta fue la primera técnica empleada la cual consistió en introducir insectos colectados en campo dentro de un tubo de ensayo con brotes tiernos de Jocote de Corona para que se alimentaran durante el recorrido (Fig. 66), sellándolos con tela Tricot en la superior del tubo.



Fig. 66. Tubos de ensayos conteniendo insectos *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.* y brotes de Jocote de Corona

Luego los insectos colectados se manejaron de la siguiente manera; primero se colocaron dentro de cajas plásticas con respiradores hechos de tela Tricot, y un agujero de entrada en la parte inferior en donde se colocaron los insectos *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.*

A los insectos confinados dentro de las cajas plásticas se les introdujo brotes tiernos de Jocote Corona de forma pendulante, es decir que a un costado de las cajas plásticas se les hizo un orificio lateral, quedando dentro de la caja las hojas tiernas y del lado de afuera la base del brote cubierto por un algodón para mantenerlo hidratado y con vida la mayor cantidad de tiempo posible para que los insectos se alimentaran, luego cada uno de estos brotes se cambiaba tres veces al día.

3.5.1.3 Traslado de insectos en bolsas plásticas

En la segunda colecta de insectos en Santa Ana se tomo la decisión de transportar los insectos capturados en bolsas arroberas (Fig. 67), estas bolsas con respiraderos que permiten proporcionar oxígeno a los insectos, hechos con tela Tricot, pero en esta ocasión no se les introdujo material vegetativo.



Fig. 67: Bolsas plásticas de 25 lb, conteniendo insectos *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.*

3.5.1.4 Traslado del Insecto en micro jaula.

Este fue uno de los instrumentos claves para el manejo sin daños de los insectos, consistió en elaborar una jaula pequeña de forma rectangular a base de madera cuyos laterales tenían un alto de 30 cm, con una base de 25 cm de ancho y un piso de madera tipo plywood. Además en su parte alta fueron introducidos dos pedazos de alambre galvanizados No. 16, los cuales fueron arqueados con el propósito de regularlo en base a la altura de la planta (Fig.68). Luego se le creó un sostén con alambre de amarre para proporcionarle fijeza cuando se le introdujera la planta y poder soportar movimientos bruscos durante el traslado.



Fig.68: Armazón de la microjaula

3.5.2 Selección de la planta a Introducir en la Micro jaula.

Antes de seleccionar el tipo de planta que se le introduciría en la micro jaula, se observó que; cuando algunos insectos sobrevivían al traslado en los tubos de ensayo eran liberados a las jaulas que contenían las estacas de Jocote de Corona, estos morían rápidamente, puesto que se asume que durante el recorrido estos no se alimentaban ni

tenían la disponibilidad de oxígeno adecuada para poder sobrevivir, y estos al ser liberados dentro de las jaulas de Jocote de Corona no se alimentaban y morían.

Es decir que en las jaulas con las estacas de Jocote de Corona, los insectos no eran capaces de sobrevivir a más de un día, así que se pensó lo siguiente, si los insectos se encontraban de manera libre alimentándose de las plantas de Café (Fig.69), existiría la posibilidad que al usar plantas de Café estos podrían alimentarse durante todo el camino y el único factor que se le modificaría sería el cambio de temperatura al traslado de un lugar a otro.

Así que se recurrió a la búsqueda de plantines de café, pero sembradas en tubete, ya que estas ocupan menos espacio y son más fáciles de movilizar y su estructura radicular permite una gran fijeza en la tierra donde se ha desarrollado y no permite el desparramamiento de esta dentro del tubete. Así pues se procedió a buscar tres plantines de Café, los cuales fueron donados generosamente por PROCAFE específicamente por el Dr. Adan Hernández. Los cuales eran procedentes de la finca San Antonio de esa misma institución la cual está ubicada carretera a Santa Ana, por consiguiente fue una ventaja porque ya estaban adaptadas al clima.



Fig.69 Introducción de tubetes de café a la microjaula

Una vez que se obtuvieron las plantas estas fueron introducidas en el sostén de alambre de amarre y luego fueron cubiertos por una funda pequeña de tela Tricot con un zipper al frente, finalmente esta fue pegada a la base de madera con una cinta gris para ser sellada y no permitir la salida de los insectos en campo. Para lo cual se utilizaron dos estereoscopios disponibles en el laboratorio de Protección Vegetal de la facultad de ciencias agronomicas de la Universidad de El Salvador (Fig.70).

3.6 Sexado de insectos, *Graphocephala sp.*, *Coellidia sp.*

Esta actividad consistió, sexar cada uno de los insectos colectados en Santa Ana (Fig.71).



Fig. 70 Insectos, *Graphocephala sp.*, *Coellidia sp.*



Fig. 71 Identificación del sexo de los insectos *Graphocephala sp*, *Coelidia sp*

La identificación de los insectos machos se baso en la presencia o ausencia de Clasperes (Fig. 72) localizados en la parte abdominal del insecto en el cual se ubica el aparato genital del macho y en el caso de la hembra el sexado se baso en la ausencia de los Clasperes.

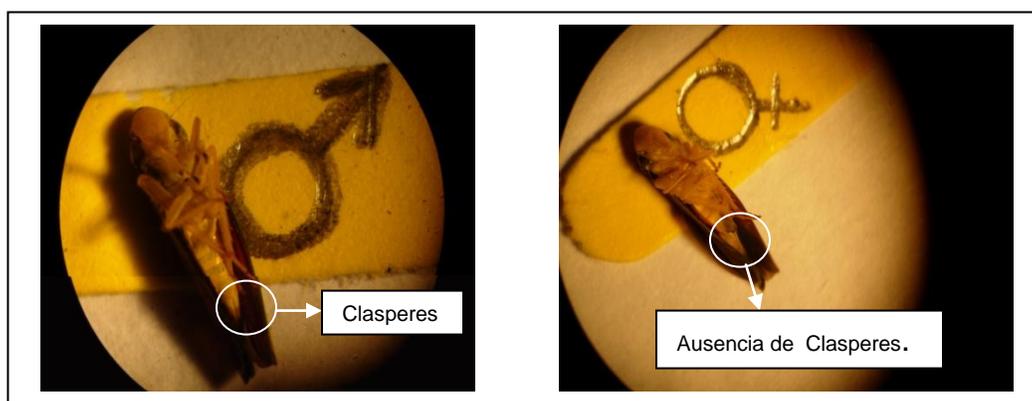


Fig. 72 Macho y Hembra *Graphocephala sp*.

3.7 Ensayo sobre la evaluación de tres concentraciones de Hipoclorito de sodio en la sobrevivencia de explantes In-vitro de Jocote de Corona (*Spondias purpurea L.*)

Para la realización de esta actividad se conto con la ayuda de la Ing. Agr. Dora Antonia Villeda Castillo, encargada del laboratorio de cultivo de tejidos del departamento de fitotecnia de la facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

El objetivo principal del ensayo fue determinar el tiempo en que el explante se mantuvo vivo para alimentar al insecto vector causante de la enfermedad en árboles de Jocote de Corona.

Las muestras de los explantes recolectadas en campo estaban identificadas como: T7, T8 y T9 para el ensayo se introdujeron 5 explantes de cada tratamiento, obteniendo los nuevos tratamientos identificados como: **T1:** Tallo joven, **T2:** Tallo más hoja joven y **T3:** Brotes tiernos, estos fueron previamente lavados con agua destilada y se aplico 2 gotas de quita grasa Tween 20, posteriormente fueron introducidos en una solución de alcohol al 70% como desinfectante durante un minuto y finalmente se colocaron en otra solución desinfectante de hipoclorito de sodio a tres concentraciones (Fig.73). Luego en cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada. El medio de cultivo utilizado fue de Murashige y Skoog (MS) se adiciono 2 mg de regulador de crecimiento al inicio de BAP (Bencil amino purina), finalmente los explantes se inocularon

en tubos de ensayo que contenían 15 ml de medio de cultivo (Fig. 73), se sellaron con plastiwrap y se rotularon manteniéndose a una temperatura de 25°C y 80% de humedad relativa con un fotoperíodo de 8 horas.

Cuadro 3: Explantes de jocote de corona (*Spondias purpurea* L.) a diferentes concentraciones de Hipoclorito de sodio como desinfectante para el crecimiento celular.

Nº DE TUBOS	TIPO DE EXPLANTE	HIPOCLORITO DE SODIO AL 5%	HIPOCLORITO DE SODIO AL 10%	HIPOCLORITO DE SODIO AL 15%	DÍAZ A CONTAMINACIÓN DESPUES DE INOCULACION
T1: 15	Tallo joven			X	4
T2: 15	Tallo + hoja joven		X		3
T3:15	Brotos tiernos	X			8



Fig. 73 Inoculación de explantes vegetativos de Jocote de Corona en tubos de ensayo con Solución nutritiva de Murashige y Skoog (MS)

La finalidad de esta actividad era poder establecer brotes capaces de desarrollar y mantener alguna cantidad de follaje fresco para la alimentación de los Cicadelidos (Fig. 74) y luego observar si estos era capaces de transmitir la enfermedad.

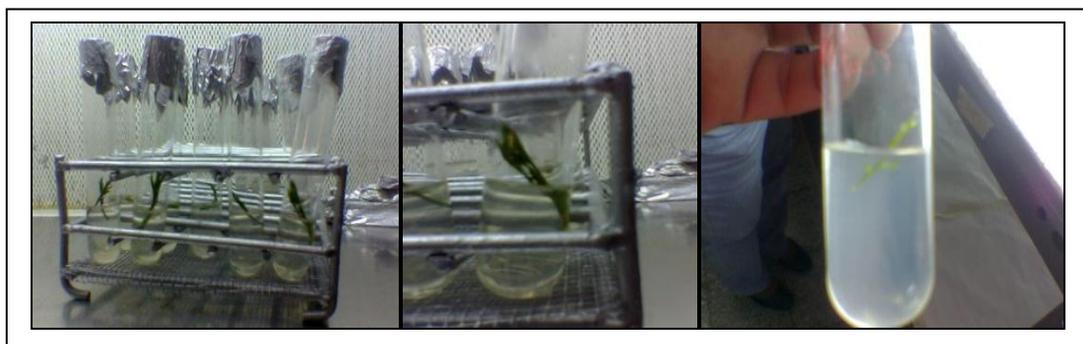


Fig. 74 Establecimiento del ensayo en el Laboratorio de Fitotecnia

3.8 Recolección de brotes vegetativos procedentes de estacas sanas para verificar el estado Fitosanitario.

Esta actividad consistió en cortar y coleccionar brotes de 5 cm de largo (Fig.75), para lo cual se tuvo que utilizar guantes de latex para agarrar los brotes y luego cortarlos con una hoja de afeitar (teniendo el cuidado de cortar solo un brote). Además fueron cortados brotes con tres pares de hojas tiernas y lavados con agua destilada contenida en una pizeta.



Fig.75 Proceso de colecta de muestras de tejido vegetal (brotes) en estacas de Jocote de Corona

Después los brotes fueron envueltos en papel de empaque y rotulados con lápiz, luego introducidas en una bolsa de dos lb. con un papel que contenía la misma información el propósito de esto fue asegurar que la información no se borrara ni extraviara, luego fueron colocadas en una nueva bolsa de 2 lb. y amarradas para ser enviadas al laboratorio.



Fig. 76 Manipulación, envoltura y rotulación de muestras de tejido vegetal (brotes) para su respectivo análisis PCR

3.9 Metodología Empleada para Liberación de Insectos dentro de la Jaula

La metodología que se empleó para la liberación de insectos dentro de la jaula se basó en dos grandes objetivos tales como; la supervivencia del insecto durante un periodo de mayor de 48 horas y el otro la velocidad de transporte del insecto desde su lugar de colección (Santa Ana) hasta el lugar de su liberación (jaulas confinadas en San Vicente), por lo cual durante el desarrollo de la investigación se utilizaron dos técnicas de liberación las cuales se describen a continuación:

3.9.1 Liberación del Insecto Mediante la Técnica de Doble Succión.

Esta técnica consistió en la liberación de insectos vectores mediante el uso de succionadores (Fig.77), los cuales fueron utilizados en dos momentos:

El primero de ellos fue cuando se succionaba el insecto directamente de la hoja o dentro de las redes para luego ser liberado dentro de la micro jaula.



Fig. 77 Liberación de los insectos *Graphocephala sp*, *Coelidia sp*, mediante la técnica de doble succión

El segundo cuando era succionado desde el interior de la micro jaula para luego ser liberados dentro de las jaulas del experimento (Fig 78 y 79).



Fig. 78 Liberación de insectos *Graphocephala sp*, *Coelidia sp*, en San Vicente

3.9.2 Liberación del Insecto Mediante la Técnica de Frascos de Vidrio.

La segunda técnica de liberación consistió en atrapar los insectos que estaban dentro de la micro jaula mediante la utilización de pequeños frascos cilíndricos de vidrio (Fig. 79), los cuales se utilizaron de la siguiente manera:

Primero se ubicó la posición del insecto dentro de la micro jaula, después el zíper de esta, era abierto cuidadosamente para no dejar escapar ninguno de los insectos dentro de la micro jaula, después se trataba de ubicar el frasco sobre el cuerpo del insecto y se acercaba lentamente hasta que el cuerpo del insecto entraba completamente en el vial.

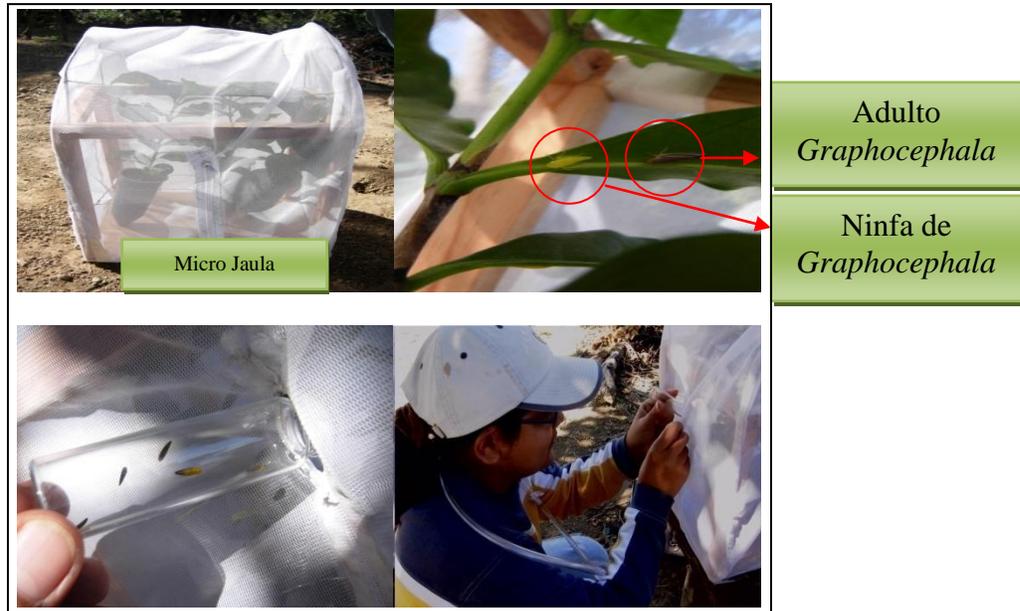


Fig. 79 Liberación del Insecto Mediante la Técnica de frascos pequeños de Vidrio

Después se levantaba el zíper de las jaulas en donde estaban confinadas las estacas y luego se introducía el vial con la mano (Fig. 80 y 81). Una de las primeras prácticas fue dejar los viales sobre las bolsas que contenían las estacas.



Fig. 80 Puesta de tubos pequeños de vidrio dentro de las jaulas

Otra de las formas que se utilizó para liberar los insectos fue golpear suavemente el vial, para permitir la bajada de los insectos que usualmente no buscan la salida del vial si no el fondo de este (Fig. 81), una vez todos los insectos eran colocados dentro de las jaulas se procedió a cerrar el zíper de estas.



Fig. 81 Liberación de insectos *Graphocephala sp*, *Coelidia sp* mediante golpeteo suave al tubo pequeño de vidrio

Posteriormente las jaulas se sellaron con tirro grueso para evitar que estos pudieran escaparse (Fig. 82) o evitar que por acción humana estos fueran abiertos.



Fig. 82 Sellado de las jaulas

Por último esta actividad se realizó tres veces en un lapso de un mes, dejando una semana para que el insecto se alimentara e interactuara con las estacas de jocote corona.

3.10 Colecta de tejidos vegetales una semana después de la interacción Insecto - Planta

Esta actividad consistió en coleccionar brotes de las estacas para su respectivo análisis de PCR (Fig. 83), para ello se tomaron partes vegetativas de las estacas, auxiliándose guantes de látex y hojas de afeitar individualmente para cada corte, además se utilizaron bolsitas de papel de empaque (tipo sobre), las cuales eran rotuladas con el número de estaca, la jaula donde procedía, el insecto con el cual interactuó, fecha, lugar de colecta.



Fig. 83 Colecta de tejido vegetal (brotes) una semana después de la interacción insecto -planta

Luego estas se introdujeron en bolsas de dos libras (Fig. 84), las cuales se sellaron y fueron enviadas al laboratorio de biología molecular del CENTA, para su análisis.



Fig. 84 Identificación por códigos de las estacas muestreadas y el día de recolección

Esta actividad se realizaba cada semana después de haber introducido los insectos en las jaulas y se repitió durante tres semanas (21-28 días después de haber introducidos los insectos a las jaulas).

3.10.1 Colecta de Raíces 1 Mes Después de la Interacción Insecto – Planta.

El final de esta fase consistió en tomar muestras vegetativas de raíces de las estacas que habían interactuado con el insecto; con el propósito de saber si el fitoplasma portado por los insectos era capaz de movilizarse o traslocarse dentro del floema de las estacas en un periodo corto (aproximadamente 1 mes).

La recolección de las raíces, se realizó de la siguiente manera: primero se levantaron cada una de las jaulas de forma cuidadosa (Fig. 85), con el propósito de evitar un posible volteo de las estacas.



Fig. 85 Levantamiento de jaulas para toma de muestras de raíces

Después cada una de las estacas era revisada e identificada de acuerdo a su respectivo código (Fig. 86) y de la misma forma los sobres de papel de empaque donde se introducirían las muestras se rotulaban con el código de las estacas muestreadas.



Fig. 86 Rotulación del código proveniente de cada estaca

Luego cada una de las bolsas de polietileno donde fueron sembradas las estacas se abrieron cuidadosamente para no dañar el pilón que contenía las raíces (Fig. 87) y poder facilitar así la colecta de raíces absorbentes las estacas.



Fig. 87 Observación del crecimiento radicular y colecta de raíces absorbentes

Cada una de las raíces fue revisada cuidadosamente con el fin de extraer una cantidad adecuada de raíces (Fig. 88), para su manipulación en el laboratorio.



Fig. 88 Extracción de la mejor muestra

Ya que en algunos casos las raíces están muy desarrolladas o grandes y era difícil ubicar las raíces absorbentes (Fig. 89), por lo cual se utilizó una lupa, luego estas eran cortadas con una pequeña tijera y después introducidas a los sobres de papel.



Fig. 89 Corte de raíces para su respectivo análisis

Luego las raíces colectadas se introdujeron dentro de la bolsa de papel de empaque con su respectiva identificación (Fig. 90).



Fig. 90 Empaquetado y rotulación de muestra radicular

Por último las bolsas y las estacas a las cuales se les había extraído las raíces fueron agrupadas y confinadas nuevamente (Fig. 91).



Fig. 91 Agrupamiento y confinamiento de estacas de Jocote de Corona

3.11 Colecta y Recopilación de información con CENTA

Esta actividad fue coordinada con el CENTA; ya que parte de la información colectada en la Zona Occidental correspondiente a Santa Ana fue proporcionada por el Ing. Adamid Beltrán, Técnico del Programa Frutales del CENTA, quien proporciono una base de datos de georeferencia de las zonas sobre las cuales el ha observado y analizado la presencia de fitoplasma (Cuadro 3), específicamente en El Cerro Verde y El Volcán de Santa Ana (Fig. 92)

Cuadro 4: Georeferenciación de las fincas productoras de Santa Ana

Finca	Propietario	Coordenadas					Altura (msnm)	
		Latitud			Longitud			
	Alex Montenegro	13	52.385	N	89	35.388	W	1520
Argelia	Adán Arévalo	13	52.543	N	89	34.985	W	1528
	Aquilina Aguilar	13	52.56	N	89	34.946	W	1380
Las Brisas	Ricardo Ortiz	13	52.827	N	89	34.884	W	1356
El Borbollón	Salvador Molina	13	53.194	N	89	04.672	W	1198
Divina Providencia	Fernando Chamul	13	53.261	N	89	04.675	W	1204
Caserío Menéndez	Luis Menéndez	13	52.876	N	89	34.664	W	1298
El Recuerdo	Juana A. Lucero	13	52.877	N	89	34.619	W	1282
Cantón Potrerillo	Ricardo Ortiz	13	53.084	N	89	33.863	W	957
	Ernesto Javier	13	50.56	N	89	35.10	W	990

Fuente: Beltran A.

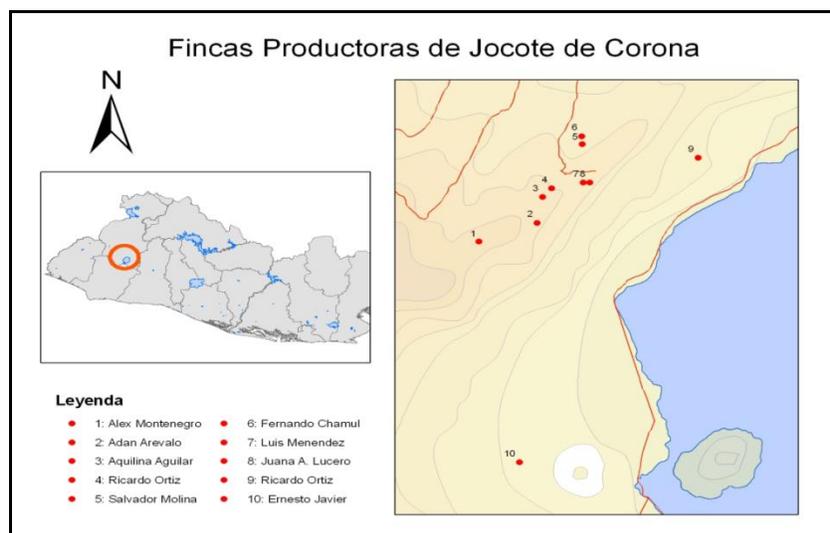


Fig.92: Georeferenciación de fincas con presencia de fitoplasma en la zona Occidental del país.

3.11.1 Colecta y Recopilación de información con Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA)

Así mismo se coordinó un viaje con la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA.) la cual tuvo como objetivo en un primer momento coleccionar material vegetativo de la Zona Oriental del país (Fig. 93 y 94), específicamente en La Laguna de Alegría en

Santiago de María, Usulután; siguiendo la misma metodología utilizada en las colectas anteriores.

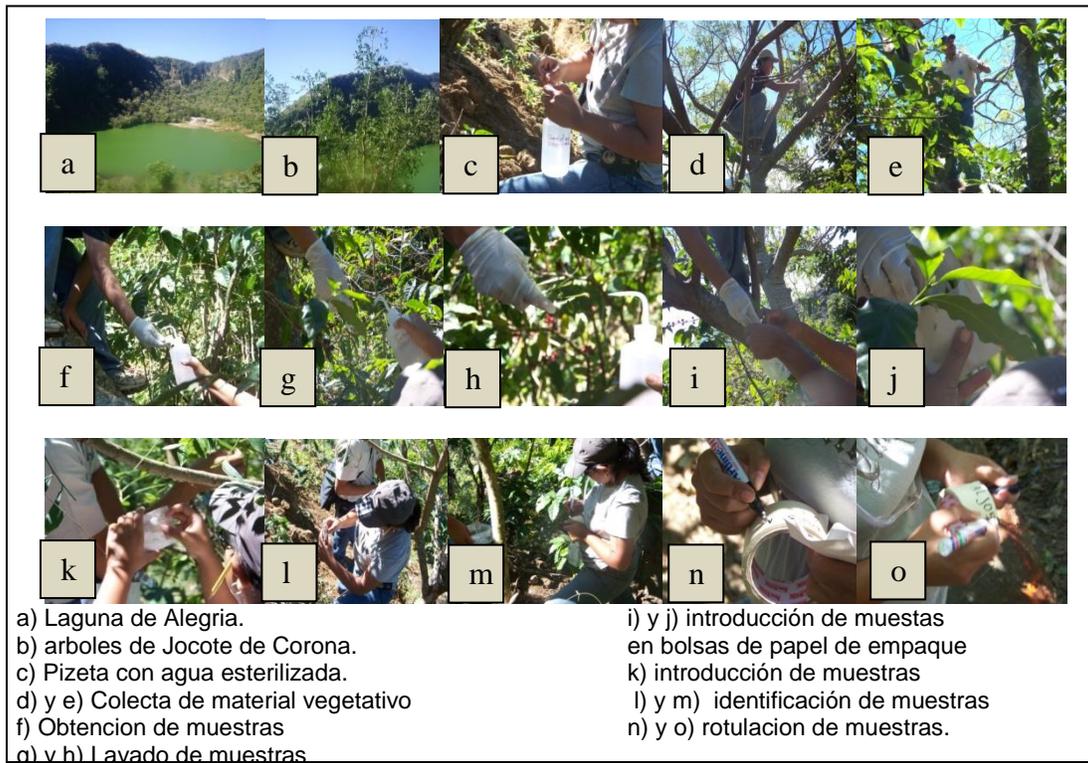


Figura 93: Colecta de muestras en Santiago de María, Usulután



Figura 94: Rotulación de arboles muestreados en Santiago de María, Usulután

Posteriormente se coordinó un nuevo viaje para la toma de muestras vegetativas pero de la zona Occidental del país, después estas muestras fueron enviadas al laboratorio Biología Molecular del CENTA, para conocer su estado fitosanitario.

Por último se agregaron los puntos muestreados y georeferenciados de la zona Occidental y Oriental del país, esto se hizo con el propósito de incrementar en número de lugares muestreados en el país (Figura 95).



Figura 95: Toma de puntos geospaciales mediante GPS de los arboles muestreados

3.4 FASE DE GABINETE:

3.4.1 Elaboración de mapa y ubicación de las zonas con presencia de fitoplasma en Jocote de Corona en El Salvador

3.12.1.1 Colecta de Información Geográfica mediante el Uso de GPS.

Para la elaboración de mapas primero se procedió primero a la georeferenciación de los datos en campo para lo cual se utilizó un GPS tipo E-trex (Fig. 96), se utilizó en cada uno de los cantones visitados donde se colectaban los tejidos vegetales para su análisis en PCR. Así como también en cada uno de los sitios donde eran colectados los insectos

La metodología utilizada en esta fase consistió en situarse con el GPS cerca de los árboles de Jocote de Corona muestreados, después datos como Longitud (Coordenadas planas en "x"), Latitud (Coordenadas planas en "y") y altura (Elevación "z"), nombre de la finca, cantón, municipio y departamento, eran anotados en una libreta de campo para su posterior procesamiento



Figura 96: Toma de puntos geospaciales mediante GPS de los árboles muestreados en las Zonas Occidental, Paracentral y Oriental

3.4.2 Procesamiento de la Información de Campo Utilizando el Formato Excel

Toda la información que fue colectada en campo se introdujo en una base de datos creada en formato Excel (Fig.97), la cual contenía cada uno de los campos antes mencionados.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Pto. GPS	X	Y	Altura (msnm)	Finca	Cantón	Municipio	Departamento
9	8	221608.00	1538370.00	995	La Union	Cantón Flor Amarilla Arriba	Santa Ana	Santa Ana
10	9	221494.00	1538342.00	994	Las Brisas	Cantón Flor Amarilla Arriba	Santa Ana	Santa Ana
11	10	220997.00	1535821.00	1337	San Luis	Potreros de La Laguna	Santa Ana	Santa Ana

Fig.97: Base de Excel elaborados a partir de las zonas georeferenciadas de Jocote de Corona

Después esta información fue guardada como documento de Excel 97_2003 para luego ser utilizada como base para la elaboración de mapas mediante el programa ArcGIS versión 9.2.

3.4.3 Utilización del Software Arc GIS para la Elaboración de Mapas.

Para la elaboración y creación de los mapas fue necesario el uso del Software Arc GIS (Fig. 98), puesto que es una herramienta que está íntimamente relacionada con el procesamiento de la información obtenida a través del GPS, ya que este programa tiene la capacidad de pasar de coordenadas geográficas (dadas por el GPS), a coordenadas planas como lo es; la referencia espacial “Cónica Conformal de Lamber”. La cual es muy utilizada en el levantamiento de información topográfica de nuestro país. (Anexo 1)

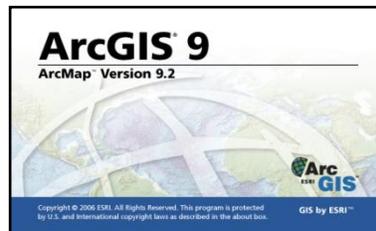


Fig. 98: Logo del Software utilizado para la elaboración de los mapas.

3.4.3.1 Transformación de Coordenadas Geográficas a Coordenadas Planas.

La transformación de las coordenadas geográficas consistió en utilizar la aplicación de Arc Catalog contenida dentro del programa Arc GIS. Las coordenadas fueron transformadas de la siguiente manera:

Primero la tabla de Excel se guarda en el disco “C” en donde está ubicada la base de datos para Arc GIS (Fig. 99 y 100).

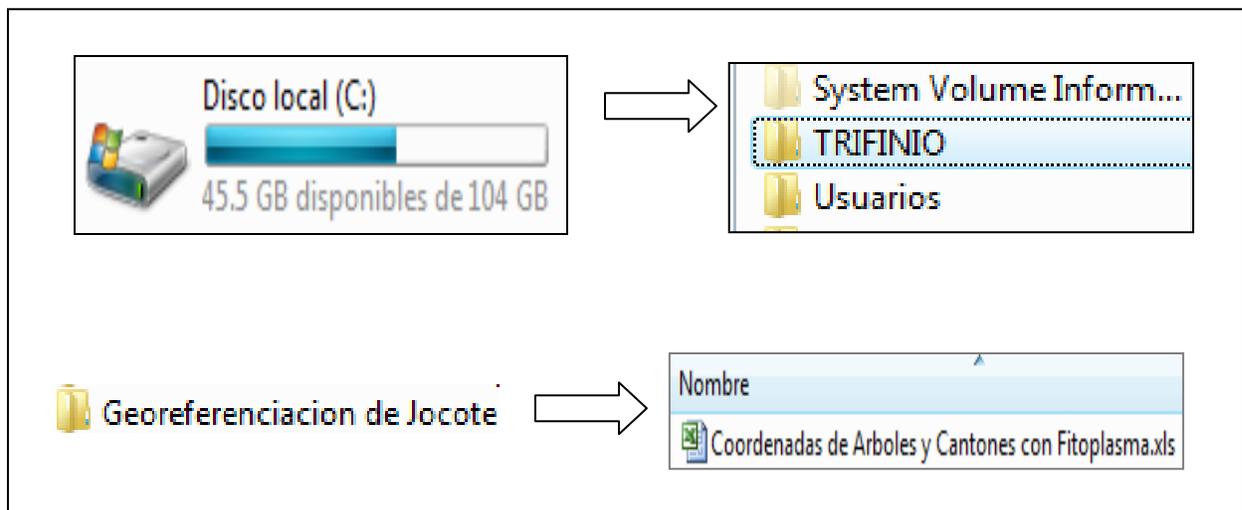


Fig.99: Ruta de acceso a las bases de datos elaboradas en Excel.

Luego se abrió el programa Arc GIS y la aplicación de Arc Catologo (Fig.100).



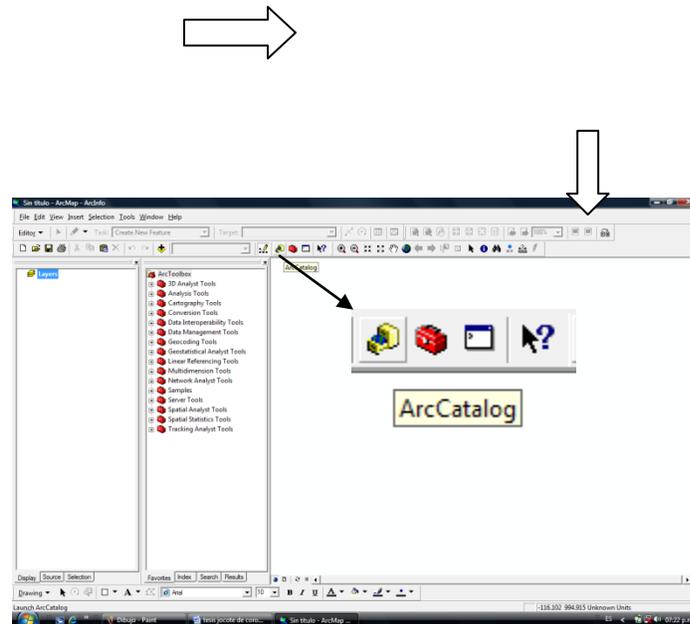
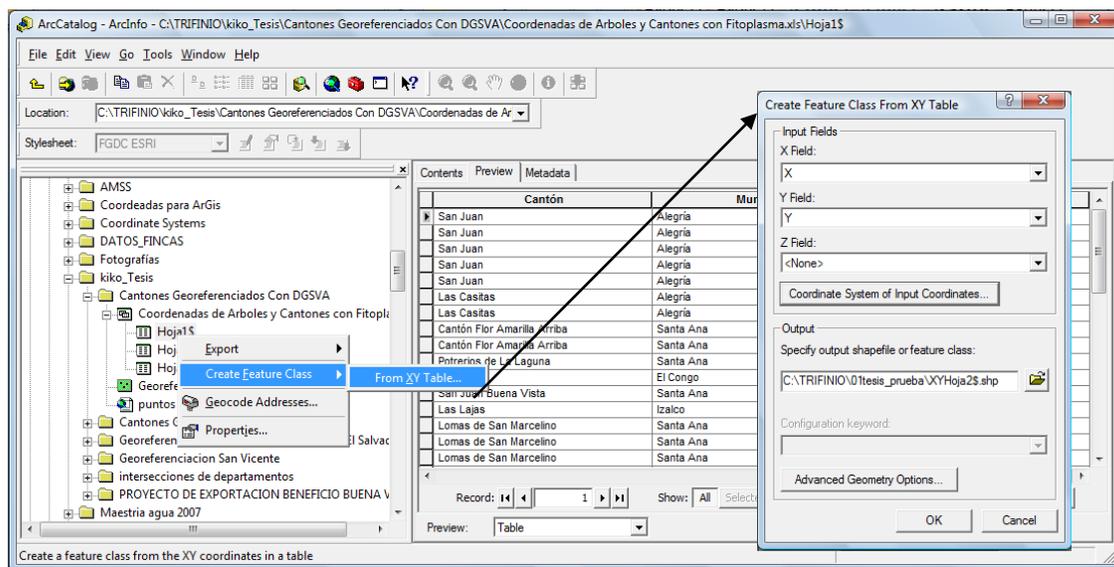


Fig.100: Procedimientos para la realización de mapas dentro del sistema.

Después se procedió a observar si los campos que habían sido introducidos en Excel estaban correctos y luego se procedió a crear un shape (Par de Coordenadas X: Y) en el sistema (Fig.101).

Fig.101: Proceso de conversión de coordenadas espaciales a coordenadas planimétricas



- En esta paso el programa requería el sistema de coordenada entrante (Input) que era **UTM** por lo cual se selecciono el sistema de proyección de coordenada **NAD 1927** (Fig.102), con referencia a la Zona 16.

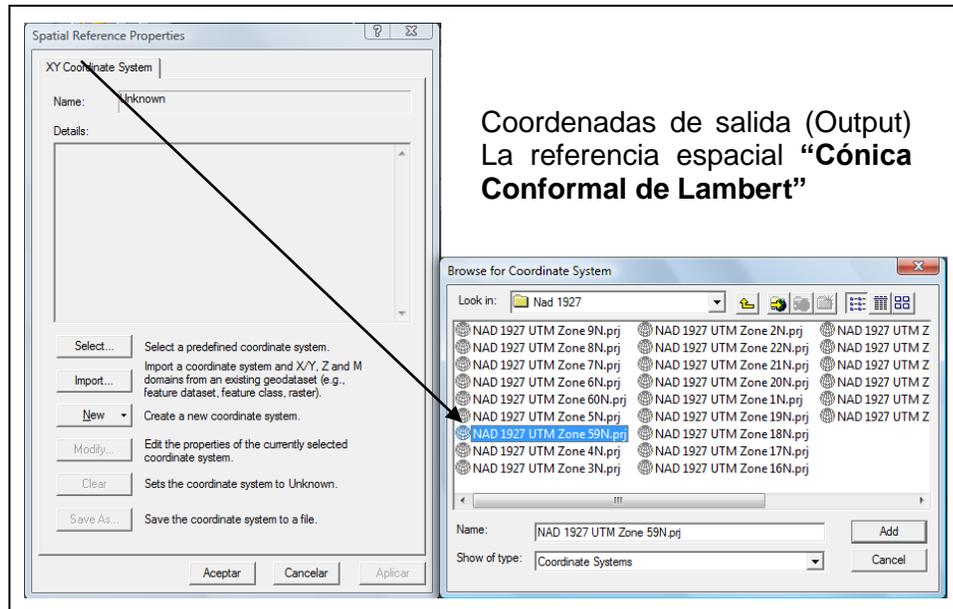


Fig.102: Referencia espacial de los mapas y datos de campo colectados

Una vez transformadas las coordenadas geográficas a coordenadas planas se procedió a agregarlas en la hoja de trabajo de Acr GIS (Fig.103).

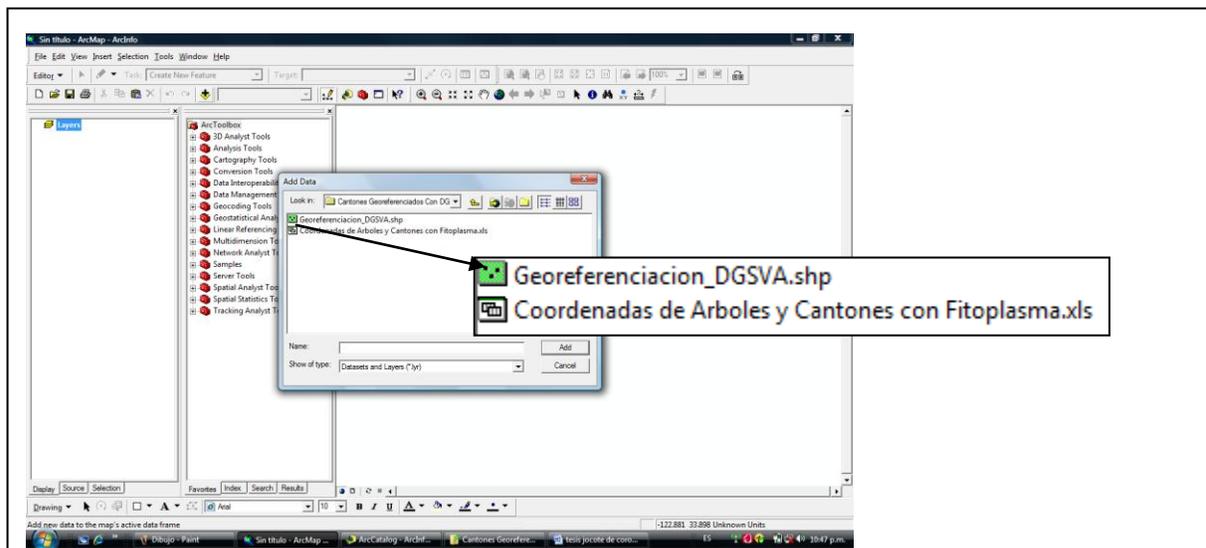
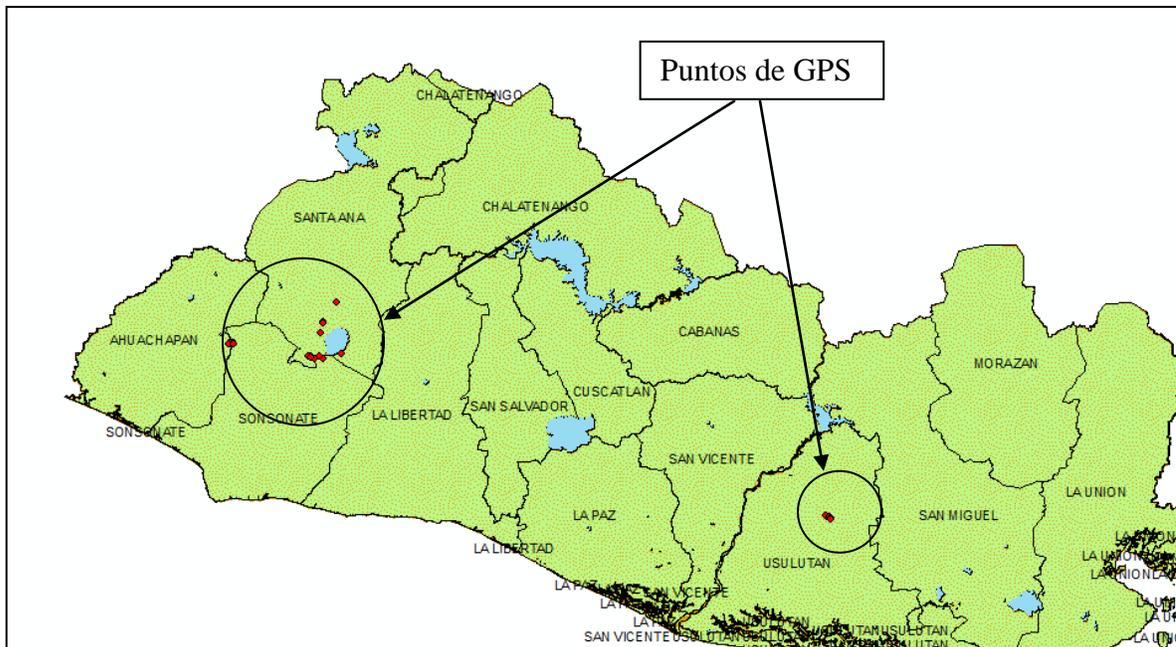


Fig.103: Ubicación de los Shape file dentro del programa.

Luego se procedió a darle click al Shape file (P.ej. Georeferenciación_DGSVA.shp) obteniéndose así los puntos en GPS (puntos de color rojo) en la hoja de trabajo de Arc map.

Fig.104: Ubicación espaciales de los puntos georeferenciados



3.4.4 Finalización de mapas de las zonas con presencia de fitoplasma en Jocote de Corona en El Salvador.

Esta fue la última etapa en la elaboración de mapas la cual consistió en darle los últimos detalles de referencia de información como:

- ✓ Tema del mapa
- ✓ Norte Geográfico
- ✓ Escala Geográfica
- ✓ Ubicación de Carretera
- ✓ Escala del Mapa
- ✓ Leyenda (Simbología de los puntos Georeferenciados)

3.4.5 Identificación árboles de Jocote de Corona sanos y enfermos en las zonas altamente productoras de El Salvador.

Se elaboro una base de datos con los árboles de Jocote de Corona muestreados en la zona Occidental, Paracentral y Oriental del país, los cuales fueron impreso en mapas los cuales se observan a continuación.

Fig.105: Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona libres de fitoplasma en la zona Occidental en El Salvador.

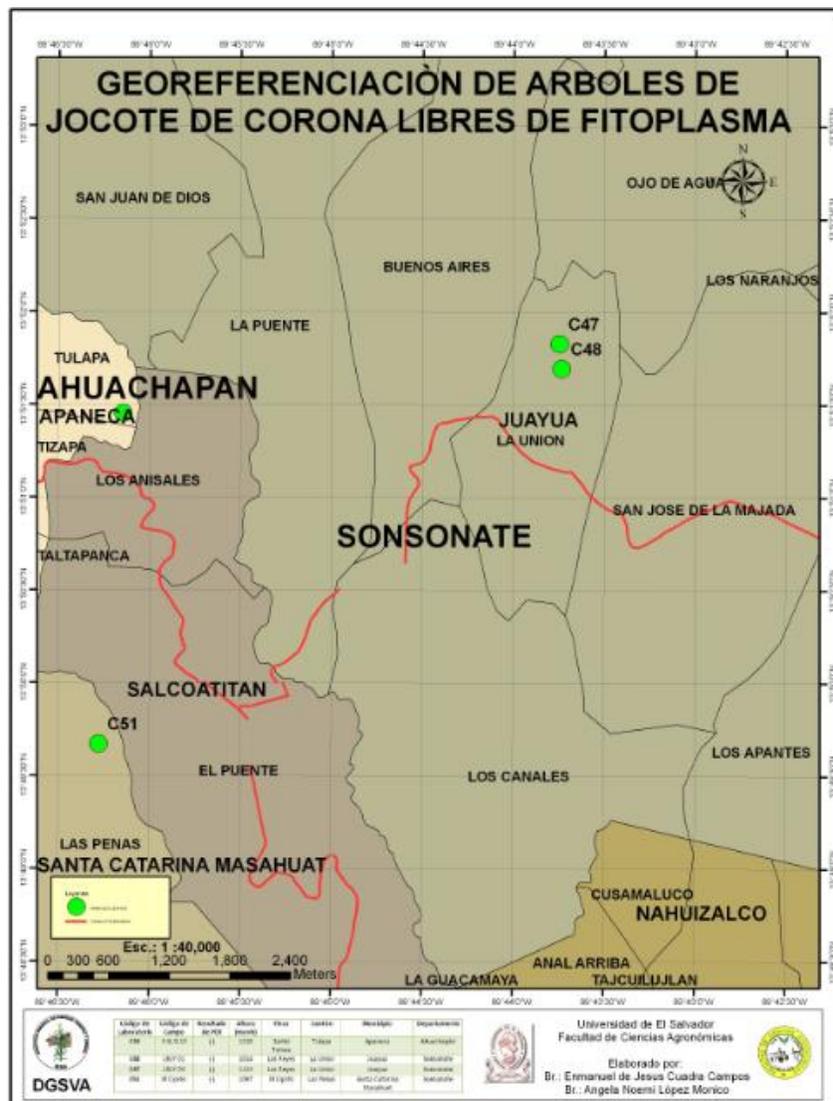


Fig.106: Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona enfermos con Fitoplasma en la zona Occidental en El Salvador.



Fig.107: Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona enfermos con fitoplasmosis en la zona Occidental en El Salvador.



Fig.108: Ubicación de árboles de Jocote de Corona sanos enfermos con fitoplasmosis en La zona Paracentral de El Salvador.

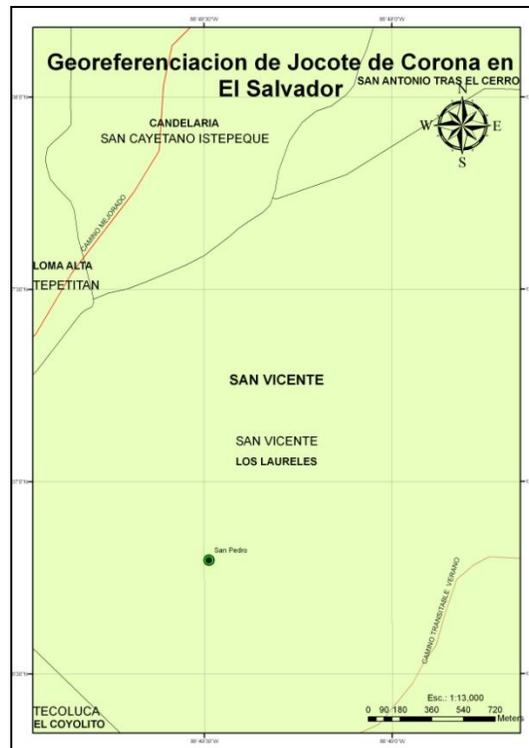


Fig109: Identificación y distribución de árboles de Jocote de Corona enfermos con fitoplasmosis en la zona Oriental de El Salvador.



Fig110: Identificación y distribución de de árboles de Jocote de Corona sanos y Enfermos con fitoplasmosis en El Salvador.



3.5 FASE DE LABORATORIO

3.5.1 Análisis de PCR en Brotes Tiernos de Jocote de Corona

Esta fase de la investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), específicamente en el Laboratorio de Biotecnología Molecular, con apoyo económico de fondos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) gestionados por la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA) y estuvo bajo la supervisión del Técnico Ing. Agr. Adamid Beltrán experto en Jocote de Corona del Programa Frutales de El Salvador.

Esta fase estuvo dividida en 2 etapas; la primera se basó en la técnica de detección de ADN para muestras vegetativas de Jocote de Corona y la segunda se basó en la técnica de detección de ADN para los insectos aparentemente vectores de la enfermedad, dichas técnicas se describen a continuación.

3.5.1.1 Extracción ADN en material vegetativo (hojas, tallos y raíces)

Para iniciar esta fase de laboratorio, el material vegetativo se colectó tratando la manera de preservarlo hasta llegar al laboratorio, por lo cual se utilizaron bolsas de papel de empaque, hojas de afeitar, una por muestra, guantes, hielera con hielo para darle temperatura fresca a la muestra.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular del CENTA, se lavaron con agua de chorro cuya función es remover impurezas que pueda traer, luego se sumergen o se enjuaga con agua destilada, posteriormente se dejan secar a t° ambiente sobre papel toalla, se envuelven en papel aluminio para almacenarla en ultra refrigerado -20°C con su respectiva identificación.

Después de que las muestras ya están guardadas en el laboratorio se procede al proceso de extracción de ADN.

- ✓ Cortar 5 milímetros de diámetro de tejido de preferencia de material joven y depositarlo en un tubo eppendorf de 2.0 ml. (fig.111)

Figura 111: Macerado de tejidos vegetales de Jocote de Corona.



- ✓ Agregar 100 μ l de solución extractora después llevar a vortex cuidadosamente asegurándose que la muestra este totalmente cubierta de solución extractora.(fig.112)

Figura 112: Aplicación de la Solución extractora y colocación en el Vortex.



- ✓ Incubar a 95°C por 10 minutos, luego dejar enfriar a temperatura ambiente.

Figura 113 Colocación de tubos eppendorf en baño de maría



- ✓ Agregar 100 μ l de dilución solución, luego mezclarlo en el vortex. (fig.114)

Figura 114 Aplicación de la disolución solución a las muestras de tejido vegetal.



- ✓ Recuperar el sobre nadante transfiriéndolo a otro tubo eppendorf de 2.0 ml (fig.115)

Figura 115: Recuperación del Sobrenadante en las muestras de tejido vegetal



- ✓ Amplificación de PCR , utilizando el kit REExtract-N-Amp ,agregando todos los reactivos; se utilizaron los primers P1/P7(Deng y Hiruki, 1991: smart et al.,1996) (fig.116)

Figura 116: Kit REExtract-N-Amp para muestras de ADN en tejido vegetal



- ✓ Centrifugar todos los componentes depositados en el tubo a 14,000 rpm durante 10 minutos para uniformizar todos los componentes.(117)

Figura 117: Centrifugación de muestras vegetales.



- ✓ Iniciar la amplificación programando el termociclador PCR.(fig.118)

Figura 118: Utilización del termociclador (PCR).



- ✓ Dejar enfriar a T° ambiente para luego cargar en la cámara de electroforesis, como el tiempo de ciclaje es largo preparar la gel con agarosa. (fig.119)

Figura 119 Preparación de geles de agarosa.



En ciertas muestras en que las bandas no fueron bien definida se procedió a realizar PCR NESTED, el cual consistió en tomar 1 μ l la muestra preparada y agregar 19 μ l de agua pura para diluirlo, y volver a realizar los pasos 9 y 10.

3.5.1.2 Extracción ADN en insectos vectores

Los insectos deben haber estado en una solución de 70% de alcohol Etanol.

- ✓ . Colocar un insecto en un tubo eppendorf de 1.5 ml.(fig.120)

Figura 120: Macerado de insectos homópteros vectores

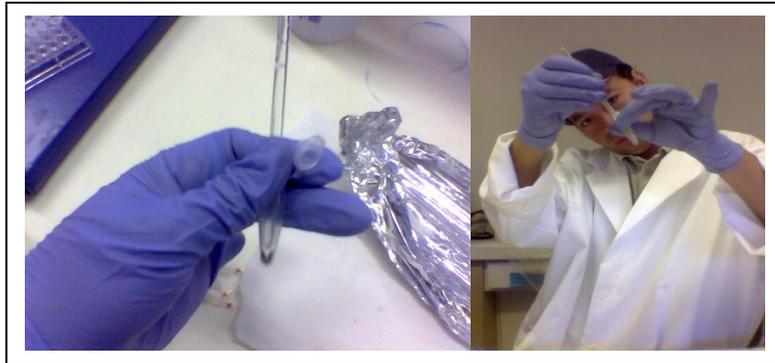


Agregar 350 μ l de set buffer con pipeta de 1000 μ l.
 Agregar 15.5 μ l de solución de SDS al 25%



- ✓ Macerar con el pistilo (varilla de vidrio) mediante movimientos circulares para lograr pequeñas partículas.(fig.121)

Figura 121: Aplicación de la solución Deodesil Sulfato de Sodio (SDS)



- ✓ Agregar 6.5 μ l de Proteinasa k de 25 mg/ml.(fig.122)

Figura 122: Aplicación de la Proteinasa K



- ✓ . Programar el baño María a 55°C, e incubar por 90 minutos, dejar enfriar el tubo a T° ambiente por 5 minutos.
- ✓ Añadir 300 μ l de CLNa 6 M y agitar en el vortex para lograr que se homogenice la muestra.(fig.123)

Figura 123: Aplicación de la solución de Cloruro de Sodio (ClNa) a una concentración 6 molar (M)



- ✓ Programar la micro centrifuga (Micro 22 R) a 14,000rpm/21°C por un periodo de 13 minutos y centrifugar los tubos.(fig.124)

Figura 124: Primera centrifugación de muestras de insectos



- ✓ Recuperar el sobre nadante (550 μ l como mínimo) transfiriéndolo a otro tubo eppendor de 1.5 ml.(fig.125)
- ✓

Figura 125: Recuperación del sobre nadante de insectos



- ✓ Agregar 150 μ l de Tris al 0.01M (HCl; pH 8) y 700 μ l de Etanol absoluto 100%.(fig.126)

Figura 126: Aplicación de la solución Tris y Etanol en muestras de insectos



- ✓ Introducir al congelador por 1.5 hr o preferentemente. durante 24 horas .
- ✓ Centrifugar a 14000 rpm/15 minutos.(fig.127)

Figura 127: Segunda centrifugación de muestras de insectos



- ✓ Descartar el sobrenadante, cuidando no tirar la pastilla (botón) de ADN.

Figura 128: Decantado de muestras de insectos



- ✓ A la pastilla adicionar 1 ml de etanol al 70% (si la pastilla sale sucia, agregar 100 μ l de alcohol absoluto y centrifugar por 5 minutos.
- ✓ una vez concluido el paso centrifugar a 14,000 rpm por un periodo de 10 minutos
- ✓ Descartar el sobrenadante y dejar secar la pastilla por completo (no lavar mas de 3 veces con etanol por que se podria dañar el ADN) (fig.129)

Figura 129: Aplicación de etanol y Descarte de sobrenadante



- ✓ Agregar 20 μ l de buffer TE y agitar en el vortex por 2-3 seg. Para re suspender el ADN, agregar 2 μ l de RNAsa en cada tubo e incubar en el baño de María durante 2 horas a 37°C.(fig.130)

Figura 130: Aplicación de la solución buffer TE y RNAsa a las muestras de insecto



- ✓ Preparar agarosa al 1.00%, colocar 1 μ l de Bromuro Ethidium al fondo del depósito y vaciar la agarosa fundida fría, remover con el peine para evitar grumos y colocar los cada dos pulgadas; dejar que solidifique la gel.(fig.131)

Figura 131: Pesado y Preparación de la solución líquida de agarosa para insectos



- ✓ Tomar 3 μl del ADN aislado con la micro pipeta mezclar una gota de bromo fenol y depositarla en el pocillo o hendidura que dejó el peine sobre el gel (cada muestra deberá ser colocada en el mismo orden que tiene en la gradilla donde está el tubo con el ADN del insecto). (fig.132)

Figura 132 Mezclado del ADN de insectos con bromo fenol



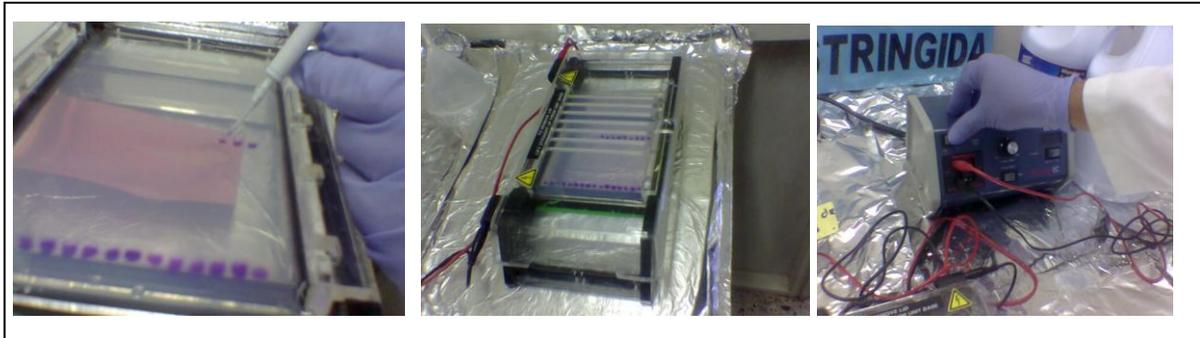
- ✓ Cargar 2 μl de marcador ladder y ponerlo en el primer pozo de los dos peines, llenar con solución TAE 1X.

Figura 133: Aplicación del ADN de insecto en las geles de agarosa



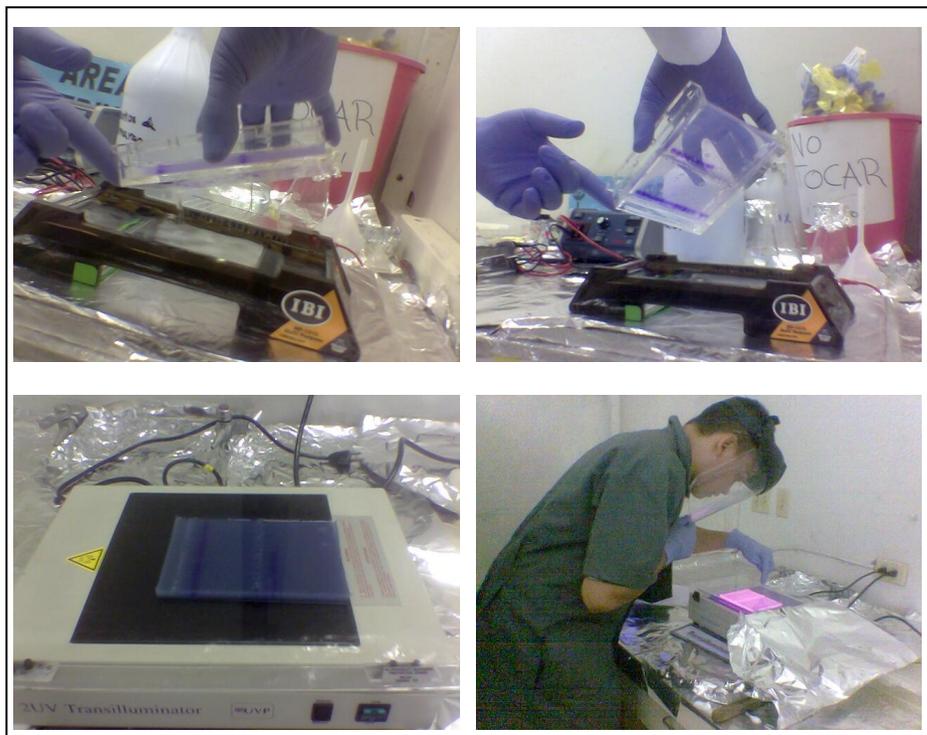
- ✓ Programar la cámara de electroforesis a 85V , 175 mA por 25 minutos.

Figura 134: Corrido de muestras de ADN de insecto en geles de agarosa



- ✓ Una vez concluya la corrida del gel, retirarlo de la cámara con una espátula y depositarlo en el transiluminador.
- ✓ Encender el transiluminador, colocar el cono de la cámara sobre el gel y tomar la fotografía.
- ✓ Escanear la película y digitar la identificación de cada banda de ADN (del insecto y posiblemente el fitoplasma).(fig.135)

Figura 135: Colocación de geles de agarosa en el transiluminador de luz ultravioleta (U.V)



4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados de Campo

4.1.1 Siembra de estacas sanas y enfermas en sustrato orgánico

Esta actividad se planificó con el fin de evaluar el tiempo de emergencia de los brotes, junto con su consecutivo crecimiento y la sintomatología de la planta, esto como parámetro comparativo para la toma de decisiones en campo.

En la primera visita a la finca del productor, se cortaron 6 estacas sanas y 3 enfermas aparentemente (según productor), tomando nota de las actividades previas a la siembra de las estacas como la forma artesanal de siembra junto con los cuidados que se debe tener para una exitosa producción.

4.1.2 Evaluación de sustratos en bolsas de polietileno

Antes de la siembra de las estacas dentro de las bolsas de polietileno de 9" x 12" se procedió a preparar dos sustratos de la siguiente manera:

El primer sustrato se preparó con 50% de tierra negra más 50% de abono orgánico comercial; luego las estacas fueron sembradas a unos 25 cm de profundidad dentro de la bolsa, sin tomar en cuenta que estas procedieran de un árbol sano o enfermo.

Así mismo se preparó el segundo sustrato con el 100% de abono orgánico comercial y luego se sembraron las estacas.

Resultados obtenidos después de 28 días de haber sido sembradas las estacas en los sustratos:

Se encontró desarrollo de brotes en las estacas aparentemente sanas, mientras que en las estacas sanas no se observaba el desarrollo de brotes

Resultados obtenidos después de 32 días de haber sido sembradas las estacas en los sustratos:

Las estacas enfermas siguieron un desarrollando normal de brotes en toda la longitud aérea de las estacas.

Pero las que presentaron un nuevo comportamiento fueron las estacas sanas ya que después de haber transcurrido 4 días desde la primera medición estas empezaron a desarrollar brotes en toda la longitud de la estaca.

Resultados obtenidos después de 53 días de haber sido sembradas las estacas en los sustratos:

Las estacas aparentemente enfermas presentaron un crecimiento de brotes de 3.5 cm de largo, pero con la característica de que cada brote presentaba tres laterales en el mismo punto de crecimiento, mientras que en las estacas sanas los brotes laterales midieron 6.5 cm de largo.

Resultados obtenidos después de 60 días de haber sido sembradas las estacas en los sustratos:

Una de las estacas enfermas presento un máximo de crecimiento de 9 brotes por estacas, mientras que para las estacas sanas el número máximo de brotes desarrollado en una estaca fue de 5 brotes por estaca, en este momento se asumió que la presencia de fitoplasma en las estacas había acelerado el proceso fisiología de la estaca haciendo que esta desarrollara un mayor número de brotes en comparación con las sanas.

Así mismo después de transcurridos 60 días los promedios de crecimiento en las estacas enfermas fueron de 8 brotes por estaca, mientras que el promedio de crecimiento medido en las estacas sanas fueron de 3 brotes por estaca.

A los 256 días después de sembradas las estacas se hizo un último conteo tomando en cuenta el desarrollo de los brotes, obteniendo los siguientes resultados:

Las estacas comprobadas mediante análisis de PCR a los 245 dds y resultando sanas tenían brotes de 80 cm, con un promedio de 7 brotes por estaca de 50 cm. Mientras que las estacas enfermas se quedaron pequeñas con los brotes de no más de 25 cm de largo.

4.2 Evaluación Previa de Emergencia y Crecimiento de Brotes en las Estaca de Jocote de Corona

Esta práctica consistió en observar y anotar cuantos días tardaron las estacas en emerger el primer meristemo o primordio vegetativo, para lo cual se llevo un registro a diario en una libreta de campo, al mismo tiempo se midió la longitud y desarrollo en centímetros del meristemo o brote lateral. Esta actividad se realizo hasta los 53 días de sembradas las estacas. La finalidad de esta práctica fue comparar el patrón de crecimiento de los brotes en cada una de las estacas.

4.3 Resultados de PCR en Foliolos Jóvenes de Jocote de Corona por El Centro de Diagnóstico de Patógenos de la Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano) en Honduras.

Los resultados de laboratorio obtenidos a partir del muestreo de foliolos en los árboles de Jocote de Corona se detallan a continuación. Del total de muestras enviadas al laboratorio se obtuvo que; de los diez árboles muestreados (de los cuales cada uno fue analizado bajo tres estratos de follaje). El árbol número siete resulto positivo en su parte alta del follaje, presentando una amplificación de ADN de fitoplasma por medio de la técnica de PCR, cuando se utilizaron los Primer P1/P7 y de igual forma cuando se analizo por segunda vez con los Primer RU3/FU5.

De igual forma el árbol número ocho reacciono positivamente a la amplificación de ADN de fitoplasma en sus tres estratos cuando se utilizaron los Primer P1/P7 por PCR y su resultado fue reconfirmado cuando analizo con los Primer RU3/FU5.

Por último, el árbol que dio positivo mediante el análisis de PCR fue el número nueve, que de igual forma con el anterior se encontró a nivel de los tres estratos del follaje, cuando se analizado con los primer antes mencionados. .

4.3.1 Análisis de los Resultados de PCR en Arboles de Jocote de Corona para la Obtención de Estacas.

Con base en los análisis moleculares anteriores se determino que tres de los diez árboles muestreados no debían de tomarse en cuenta para la obtención de estacas sanas, incluyendo al árbol número siete puesto que como se ha expresado anteriormente el

fitoplasma puede traslocarse desde los folíolos hasta las raíces dependiendo de la estación del año (época seca o época lluviosa), ya que cuando los árboles pierden sus hojas después de su ciclo de producción, existe una mayor actividad por parte del floema de las raíces, por lo que los fitoplasma puede descender hasta estas distribuyéndose en todas las ramas del árbol.

Por lo cual la obtención de estacas sanas para montar el experimento solo serian de los arboles número: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10. Convirtiéndose en el punto de partida para el montaje del experimento a nivel de campo.

4.4 Recuento de brotes desarrollados en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente

De acuerdo con los resultados obtenidos en campo y con base a los registros se determino que el comportamiento de las estacas y sus brotes desarrollados a los: 51, 59, 70 y 102 días después de montado el experimento fue el siguiente:

4.4.1 Observaciones de Campo encontradas durante el recuento de las Estacas a los 51, 59, 70 y 102 días.

Dentro de las observaciones generales de campo encontradas durante el recuento de los brotes en las estacas de Jocote de Corona están:

Abundancia de Insectos de la familia *Syrphidae* (Mesographta), en los alrededores del experimento, dentro de las jaulas se encontraron insectos como Hemiptera de la familia Pentatomidae, Acridos en abundancia extrema (saltamontes) y Cicadellidae.

La mayor parte de malezas encontradas fueron; *Baltimora erecta* (Flor amarilla), además se encontraron malezas, como mozote, escobilla, zarcillo, pasto ilusión, albahaca de gallina (dentro de las jaulas).

4.5 Evaluación, Comportamiento y Desarrollo de Estaca Leñosas de Jocote de Corona procedente de Arboles Sanos y Enfermos.

El estado fitosanitario de las estacas fue conocido tres meses después de haber sido sembradas las estacas en campo, este retraso se debió a problemas de pago desde El Salvador hacia Zamorano entre otros inconvenientes, pero durante todo este tiempo las estacas estuvieron siendo evaluadas constantemente en su patrón de crecimiento y comportamiento mediante la toma de registros semanales en campo, los cuales tenían el propósito de medir el patrón de comportamiento en cada una de las repeticiones dentro de cada terraza (representada en las figuras con la letra B).

Pero luego de conocer los resultados de PCR por El Centro de Diagnóstico de Patógenos de la Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano) en Honduras, se encontró que cuatro de las repeticiones montadas en campo estaban contaminadas con fitoplasma. (fig.136)

Cabe recalcar que las estacas fueron sembradas en campo sin conocer su estado fitosanitario ya que durante el desarrollo de la investigación se tomo la decisión que las estacas debían de permanecer solamente 2 semanas en el proceso de exudación (llorado de estacas), para luego ser sembradas en las bolsas y confinadas dentro de las jaulas, por lo cual se tomo la decisión de sembrarlas sin conocer previamente su estado.

Lo permitió de cierta manera evaluar el comportamiento en campo de las estacas sanas y enfermas, tomando con base los registros de campo. Los cuales permitieron evaluar de

esta forma la existencia de un patrón de diferencias de comportamiento y desarrollo entre las estacas.

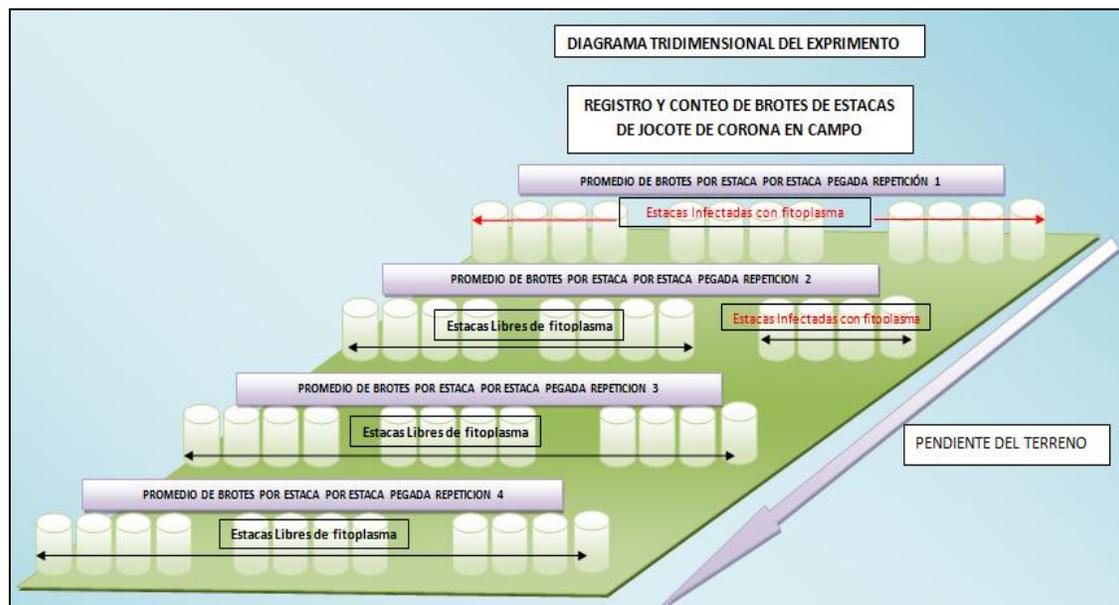


Fig.136: Distribución y Ubicación de las jaulas dentro de las terrazas.

De acuerdo con los resultados de PCR en Zamorano; claramente se observa que la primera terraza contiene las jaulas con presencia de fitoplasma, mientras que en la terraza número 2 solo la repetición número tres resultó positiva mediante el análisis de PCR. Es de recordar que las estacas que resultaron positivas dentro del experimento proceden únicamente de 3 árboles que resultaron positivos de 10 evaluados.

4.5.1 Patrón de comportamiento de brotación de estacas de Jocote de Corona sanas y enfermas por fitoplasmosis

Estos resultados son en base a cada uno de los registros tomados en campo durante tres meses y dos semanas (112 días), los cuales no se pudieron seguir llevando a cabo debido al volteo de las jaulas, ya que después de este acontecimiento se perdió la homogeneidad dentro del experimento, es decir la pérdida de igualdad de condiciones entre: bloque, repeticiones y estacas.

Por lo cual a continuación presentamos el patrón de comportamiento de las estacas sanas y enfermas hasta donde fue posible la captura de los datos.

Cuadro 5: Resumen de brotes desarrollados por las estacas de Jocote de Corona Con presencia de fitoplasmosis en las jaulas

Estacas con Presencia de Fitoplasma						
Terraza (B) / Núm. Repetición	Brotes Desarrollados					TOTAL
		51 dds	59 dds	70 dds	102 dds	

B1-R1	30	32	51	26	28	139
B1-R2	69	69	70	63	56	271
B1-R3	54	48	28	54	54	184
B2-R3	62	65	63	62	52	272
TOTAL	215	214	212	205	190	

Nota: (B=Terrazas y R=Repetición)

Interpretación: De acuerdo con los resultados obtenidos en campo se demuestran que las estacas diagnosticadas con presencia de fitoplasma mediante la técnica de PCR, presentaron una tendencia relativamente normal ya durante su etapa de crecimiento y desarrollo, estas no presentaron sintomatología alguna de la enfermedad (clorosis, enrollamiento de la hoja o proliferación de yemas en un mismo brote), lo cual nos indica que en un periodo relativamente corto (112 días), en relación a la vida de un árbol estas no pueden demostrar una sintomatología clara de la enfermedad. Lo cual puede quedar constatado en el siguiente gráfico.(fig.137)

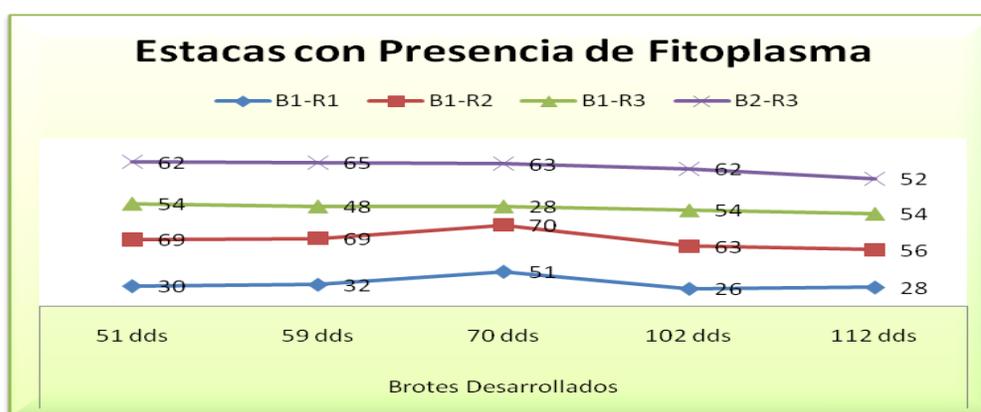


Fig.137: Desarrollo y Comportamiento de las estacas de Jocote de Corona con fitoplasmas en las jaulas (B=Terrazas y R=Repetición).

Debe tomarse en cuenta que el decaimiento en la formación de brotes por parte de la estaca enferma puede estar relacionada con la disminución de reservas en las estacas ya que los diámetros de cada una de ellas era variables, por lo cual no debe asociarse directamente a la presencia de fitoplasma en las estacas.

Cuadro 6: Resumen de brotes desarrollados por las estacas de Jocote de Corona Libres de Fitoplasma en las jaulas.

Bloques/Núm. Repetición	Estacas Libres de Fitoplasma					TOTAL
	Brotos Desarrollados					
	51 dds	59 dds	70 dds	102 dds	112 dds	
B2-R1	34	27	28	29	29	118
B2-R2	34	34	31	34	25	133
B3-R1	76	83	75	74	70	308

B3-R2	28	30	20	18	16	96
B3-R3	83	76	69	54	54	282
B4-R1	30	32	51	26	28	139
B4-R2	69	69	70	63	56	271
B4-R3	54	48	28	54	54	184
TOTAL						

Nota: (B=Terrazas y R=Repetición).

Interpretación: Con base a los resultados obtenidos y colectados en campo puede concluirse que; el comportamiento de las estacas libres de fitoplasma fue muy variable entre repeticiones, como producto de los diferentes diámetros de las estacas colectadas a partir de los arboles muestreados en campo.(fig.138)

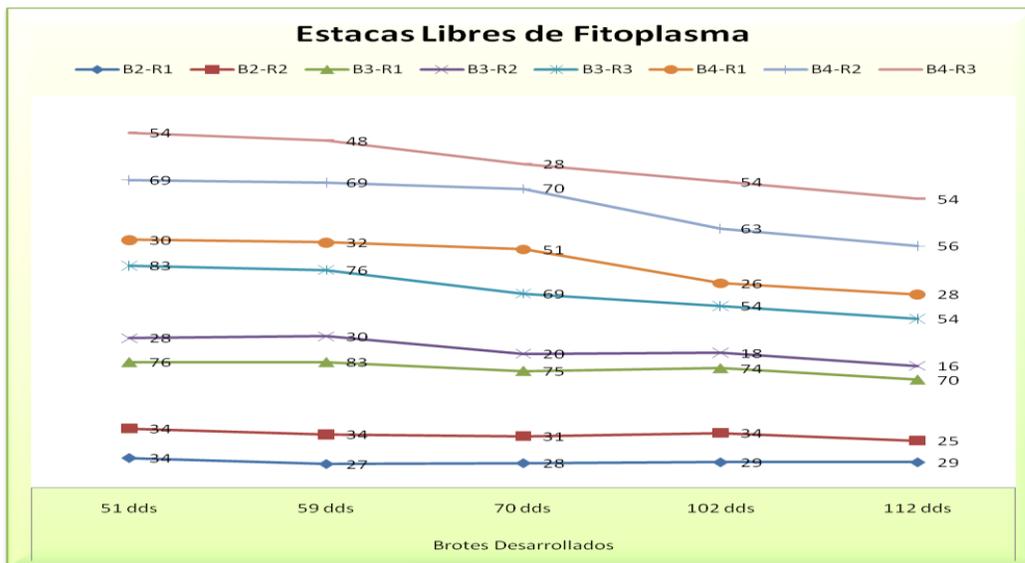


Fig.138: Desarrollo y Comportamiento de las estacas de Jocote de Corona libres de fitoplasma dentro de las jaulas (B=Terrazas y R=Repetición).

4.5.2 Conclusiones sobre El Patrón de Comportamiento de brotación las Estacas de Jocote de Corona Sanas y Estacas Enfermas.

Se concluye que con base a las 5 tomas de datos en campo el patrón de comportamiento de las estacas sanas y enfermas no varió demasiado por lo cual este resultado no se observó reflejado en las diferentes mediciones de campo. Hubieron repeticiones en las estacas enfermas como la del **B1-R1** (Fig.115) que fluctuaron en el rango total de brotes formados de 28 brotes a los 112 días de sembradas las estacas, lo cual si se compara con la **B2-R1**(Fig.116) las estacas sanas que fluctuaron en un rango de total de 29 brotes después de sembradas las estacas, por lo cual es muy difícil concluir o aseverar que existe una diferencia significativa o bien marcada sobre el comportamiento de los brotes desarrollados en las estacas enfermas con respecto a las sanas.

Además la **B1-R3** (Fig.115) con estacas enfermas, desarrollo un total de 54 brotes a los 112 días de sembradas, versus la **B4-R3** (Fig.116) con estacas sanas las cuales de igual forma desarrollaron un total de 54 brotes, lo cual corrobora que por medio de

observaciones de campo, es difícil medir la sintomatología de la enfermedad entre estacas de Jocote de Corona sanas y enfermas con fitoplasmosis.

4.6 Enraizamiento de las Estacas de Jocote de Corona

Después de 6 meses y medio ó 191 días de sembradas las estacas en las bolsas de polietileno, la longitud de las raíces creció considerablemente, posiblemente por la acción de la hormona Bio-Q en el follaje por lo se considera que es posible realizar un muestreo en las estacas en menor, solo debe considerarse que durante el muestreo de las raíces en campo se encontró la presencia de larvas del tipo Gallina ciega (*Phyllofaga sp.*).

4.7 Ataque del Barrenador del tallo (*Lagocheirus sp*) en las Estacas de Jocote de Corona en San Vicente.

Este fue uno de los primeros problemas que se presentaron dentro de la investigación, específicamente en la etapa de desarrollo de brotes.

La presencia de estos insectos se empezó a observar cuando se realizaban los conteos de brotes desarrollados por estacas y este se manifestaba de la siguiente manera: en primer lugar se encontró en algunas estacas la presencia de un aserrín fresco de color blanco y en algunos casos de color café cuando ya estaba seco, las larvas causaban perforaciones en toda la parte aérea de la estaca; desde el nivel del suelo hasta el bisel de esta en la parte superior, las larvas se alimentaban en primer lugar de toda la corteza de la estaca dejando por debajo de esta una presencia abundante de aserrín, la cual culminaba con el desprendimiento de la corteza.(fig.139)



Fig. 139: Daño causado por el barrenador en las estacas de Jocote de Corona en San Vicente.

Además otro síntoma que no era visible en campo era la formación de galerías hacia el centro de la estaca, que muy raras veces estaba cerca del orificio de entrada creado por la larva. (fig.140)



Fig. 140: Orificio de entrada del barrenador del tallo

Para la visualización de este daño fue necesario cortar longitudinalmente la estaca y buscar estadios inmaduros básicamente larvas o adulto alojado centro de esta. También se encontró que las larvas comúnmente podrían encontrarse a nivel del suelo de la bolsa donde estaba sembrada la estaca.(fig.141)



Fig. 141: Extracción de ninfas del barrenador del tallo dentro de las estacas de Jocote de Corona

4.7.1 Acciones y Medidas Realizadas para el Control y Manejo del Barrenador

Dentro de las acciones tomadas en campo para erradicar la presencia del barrenador están la toma de registros de forma continua (semanalmente), mediante el uso de hojas de campo, en donde se contabilizaban la presencia de barrenadores en cada una de las estacas, cuando se realizaba el conteo de brotes por estaca se aprovechaba esta actividad para revisar cada una las estacas y observar la presencia de barrenadores dentro de esta, cuando las larvas del barrenador era localizadas dentro de la estaca como agujeros visibles por encima de la corteza, estas eran eliminadas para evitar una proliferación masiva dentro de las jaulas

Después algunas de las estacas que fueron eliminadas del experimento eran llevadas al laboratorio de Protección Vegetal de la universidad de El Salvador y confinadas dentro de tubos plásticos para esperar el desarrollo del adulto correspondiente que se encontraba dentro de la jaulas, comprobando que el insecto "plaga" que estaba afectado el desarrollo de las estacas era: El Barrenador del tallo de Jocote (*Lagocheirus sp*). (fig.142)



Fig.142: Ataque de larva del barrenador del tallo en estacas de Jocote de Corona.

4.8 Evaluación de la Mejor Técnica de Traslado para Insectos Homopteros: *Graphocephala sp.* y *Coelidia sp.*

4.8.1 Traslado de insectos en tubos de Ensayo (1ra colecta). (fig.143)

Con base a los resultados obtenidos en campo a partir de esta prueba se concluye que esta no es una forma adecuada de trasladar a los insectos por que estos mueren por inanición alimenticia, en otras palabras por no estar consumiendo el floema móvil de las plantas durante su transporte.



Figura 143: Alimentación de Insectos en cajas plásticas

Además por medio de la implementación de esta técnica se observó que cuando los insectos se pasaron del tubo de ensayo a cajas plásticas con respiraderos y brotes (cortados y refrigerados) cambiados constantemente, el número de días que el insecto pudo sobrevivir sin alimentarse fue de 4 días para los insectos del género *Graphocephala sp.*, mientras que para los insectos del género *Coelidia sp.*, el resultado fue diferente; ya que estos no fueron capaces de sobrevivir ni un solo día dentro de las cajas muriendo

rápida mente por inanición de floema móvil de las plantas, llegando a concluir que a pesar que los insectos homópteros del género *Coellidia sp* son de mayor tamaño que *Graphocephala sp*, estos requieren una mayor alimentación del floema de las plantas durante su transporte.

4.8.2 Traslado de insectos en bolsas plásticas (2da colecta)

De igual forma esta técnica no dio los resultados esperados, puesto que se pensó en que si a los insectos se les proporcionaba mayor cantidad de oxígeno y un menor retardo en su transporte estos podrían sobrevivir y poder llegar a alimentarse a una jaula con estaca, ubicada en San Salvador, pero descartamos esta técnica fue descartada debido a que los insectos mueren por inanición durante el transporte.

4.8.3 Elaboración de Micro jaula para el traslado del Insecto. (3ra Colecta)

Esta técnica empleada consistió en que los insectos fueron colocados dentro de la micro-jaula en campo cuando se colectaban, primero se hizo una prueba piloto observándose que en el caso de los insecto homoptero del genero *Coellidia sp.*, eran capaces de sobrevivir durante tres días (72 horas) dentro de esta jaula, mientras que los insectos del genero *Graphocephala sp.*, fueron capaces de sobrevivir durante 4 días (96 horas) dentro de la jaula, optando así de esta manera a transportar los insectos de esta forma ya que estos debían de resistir por lo menos más de 2 días en la jaula antes de ser llevado a las jaulas donde estaba ubicado el experimento. Es decir que los insectos debían de ser capaces de resistir 2 días y dos viajes; el primer día de Santa Ana a San Salvador y el segundo de San Salvador a San Vicente. Lográndose así solventar de esta manera dos grandes problemas: escasez de insectos in situ en San Vicente y el retraso en la introducción de insectos a las jaulas.

4.9 Evaluación de la Mejor Técnica de Liberación de Insectos dentro de las jaulas

De acuerdo con los resultados obtenidos en campo la mejor técnica para la captura, traslado y liberación de los insectos desde el lugar donde fueron captura hasta el lugar donde fueron liberados fue la técnica de liberación por medio de frascos de vidrio cilíndricos junto con la micro-jula, ya que con un buen uso de los viales y utilizando un buen manejo y manipulación de insectos en campo, se reduce el estrés y el índice de mortalidad de los insectos, asegurándose así un mayor tiempo de sobrevivencia de los insectos desde su captura en campo hasta su liberación dentro de las jaulas confinadas con las estacas.

Cabe mencionar que el tiempo de sobrevivencia de los dos insectos homópteros de la familia Cicadellidae varia; puesto que de los dos insectos el que tiene un mayor tiempo de sobrevivencia dentro de la micro jaulas son los del genero *Graphocephala sp.*, con una duración de 4 a 5 días, mientras que los insectos del genero *Coellidia sp.*, tienen un tiempo de sobrevivencia menor, el cual oscila entre 2 a 3 días después de su captura en campo.

Así mismo se recomienda que la captura de los insectos sea en horas frescas comprendidas entre las 7 y 10 de la mañana, y que la forma de la micro jaula sea circular para evitar que los insectos se escondan en las esquinas o mueran en las esquinas de la jaula, también es recomendable que la búsqueda de estos insectos no debe limitarse al

follaje de los árboles de Jocote de Corona si no también a aquellas plantas hospederas como en el caso del café (*Coffea arabica*), específicamente en los meses donde el follaje de los árboles de Jocote de Corona es escaso o ausente, considerándose con base a la experiencia de campo que la captura debe realizarse en un radio no mayor de 3 m del tronco de los árboles de Jocote de Corona. Es considerable no fumar mientras realiza la colecta de insectos por medio de seccionadores entomológicos, ya que este es un factor que influye en el índice de mortalidad de los insectos vectores.

4.10 Resultados sobre la evaluación de tres concentraciones de hipoclorito de sodio en la sobrevivencia de explantes in Vitro de Jocote de Corona (*Spondias purpurea* L.)

Los resultados de laboratorio obtenidos por el Protección Vegetal de la facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, después de la inoculación de los explantes en tubos de ensayo con solución de Murashige y Skoog (MS) se presentan a continuación:

El tratamiento T1: (Con tallos provenientes de material joven desinfectados con hipoclorito de sodio “lejía” a una concentración de 15%)

Presento una contaminación por hongos al cuarto día de inoculación, por lo que se recomienda llevar a una concentración de 30% para evitar el apareamiento de microorganismos no deseables y que permita el crecimiento.

El tratamiento T2: (Con tallos jóvenes mas un par de hojas en una concentración del 10% de lejía), demostró también contaminación por hongos la cual se dio a los tres días después de sumergidos en lejía, además de quemaduras en las hojas por la alta concentración de la solución.

En tratamiento T3: (Con brotes tiernos sumergidos a una concentración de 5% de lejía)

Fue el mejor tolero el proceso de desinfección, además el tiempo de sobrevivencia fue de 8 días dentro de la solución demostrando una mayor capacidad de sobrevivencia por parte de los brotes, aunque después se dio también la contaminación por hongos.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Análisis de Resultados de PCR para brotes tiernos de Jocote de Corona como Reconfirmación Fitosanitaria de Estacas.

Cuadro 7: Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR para en brotes tiernos de Jocote de Corona previo a la introducción de insectos dentro de las jaulas.

Numero de Jaula	Código de Estaca	Resultado de PCR
JAULA 1	J1ESn3	+
	J1E4.1	-
	J1Esn1	-
	J1Esn2	+
	J1E4.2	+
JAULA 2	J1Esn4	+
	J2E10.2	+
	J2E10.1	-
	J2E10.4	+
JAULA 3	J2E10.3	-
	J2E4.3	+
	J3E10.5	+
	J3Esn6	+
	J3Esn5	-
	J3E10.6	+
	J3E4.5	+
JAULA 4	J3Esn7	+
	J3E4.4	+
	J4E10.8	+
	J4E10.7	-
	J4E10.9	+
JAULA 5	J4E6	-
	J5E10.10	+
JAULA 6	J5E6.1	+
	J6E2.1	-
JAULA 7	J6Esn8	+
	J7E2.3	-
	J7E2.5	+
JAULA 8	J7E2.2	+
	J8Esn10	+
	J8E2.6	+
	J8E6.3	-
JAULA 9	J8Esn11	+
	J9E5	+
	J9E5.2	+
	J9E5.3	+
JAULA 10	J9E5.1	-
	J10Esn14	-
	J10Esn13	+
	J10E1	+
	J10.E5.5	-
	J10E5.4	+

Los primeros resultados de laboratorio obtenidos a partir de la evaluación de la técnica de PCR en brotes tiernos de jocote de Corona se detallan en la siguiente tabla:

Resultados:

De un total de 44 muestras evaluadas por la técnica de PCR con los primer o cebadores P1/P7 se logro la amplificación de ADN en 29 muestras las cuales presentaron un patrón de banda bien definido correspondiente al fitoplasma encontrado en Jocote de Corona, las cuales al ser sometidas a luz ultravioleta mediante la técnica de electroforesis, estas reaccionaron positivamente al igual que el patrón de banda definido por el marcador.

Así mismo los resultados obtenidos a partir de las 15 muestras restantes fueron que no existió una amplificación de la cadena de ADN del fitoplasma cuando estas fueron sometidas al análisis de PCR, ni fueron visibles mediante la exposición de luz ultravioleta en la cámara de electroforesis.

5.2 Análisis de Resultados de PCR para brotes tiernos de Jocote de Corona 1 Semana después de haber Introducidos los Insectos en las Jaulas

Cuadro 8: Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en brotes tiernos de Jocote de Corona, 2 semana después de la interacción Insecto-planta.

Numero de Jaula	Código de Estaca	Resultado de PCR
JAULA 1	J 1 4.1	-
	J 1 4.2	+
	J 1 Sn 4	-
	J 1 Sn 10	+
	J 1 Sn 3	+
JAULA 2	J 1 Sn 2	-
	J 2 10.3	+
	J 2 4.3	-
	J 2 10	+
	J 2 10.2	+
JAULA 3	J 2 10.1	+
	J 3 4	+
	J3 10.6	-
	J 3 Sn 7	+
	J 3 4.5	-
JAULA 4	J 3 SN 5	+
	J 4 10.9	-
	J 4 10.8	+
JAULA 5	J 4 10	-
	J 5 10.10	+
	J 5 2	+
JAULA 6	J 5 6.1	-
	J 6 E 2.1	-
JAULA 7	J 7 2.2	-
	J7 2.4	+
	J 7sn 9	+
JAULA 9	J 7 2.3	-
	J 9 5	+
	J 9 5.3	+
	J 9 5.2	-
	J 9 5.1	-

Los segundos resultados de laboratorio obtenidos a partir de la evaluación de la técnica de PCR en brotes tiernos de jocote de Corona se detallan en la siguiente tabla:

Resultados:

De un total de 32 muestras evaluadas por la técnica de PCR con los primer o cebadores P1/P7 se logro la amplificación de ADN en 17 muestras las cuales presentaron un patrón de banda bien definido correspondiente al fitoplasma encontrado en Jocote de Corona, las cuales al ser sometidas a luz ultravioleta mediante la técnica de electroforesis, estas reaccionaron positivamente al igual que el patrón de banda definido por el marcador.

Así mismo los resultados obtenidos a partir de las 15 muestras restantes fueron negativos ya que no existió una amplificación de la cadena de ADN del fitoplasma cuando estas fueron sometidas al análisis de PCR, ni fueron visibles mediante la exposición de luz ultravioleta en la cámara de electroforesis

5.3 Análisis de Resultados de PCR para brotes tiernos de Jocote de Corona 2 Semana Después de Haber Introducidos los Insectos en las Jaulas

Cuadro 9: Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en brotes tiernos de Jocote de Corona, 3 semana después de la interacción Insecto-planta.

Numero de Jaula	Código de Estaca	Resultado de PCR
JAULA 1	J1 Sn 1	-
	J1 Sn 4	+
	J1 Sn 2	+
	J1 4.1	-
	J1 4.2	+
	J1 Sn3	+
JAULA 2	J2 10.2	+
	J2 10	-
	J2 10.1	+
	J2 4.3	+
JAULA 3	J2 10.3	-
	J3 10.6	+
	J3 10.5	+
	J3 Sn 5	-
	J3 Sn 6	+
	J3 Sn 7	-
	J3 4	+
JAULA 4	J3 4.5	-
	J4 6	-
	J4 10.7	-
	J4 10.8	+
JAULA 5	J4 10.9	+
	J5 10.10	+
	J5 2	+
JAULA 6	J5 6.1	+
	J6 2.1	+
JAULA 7	J6 Sn 8	+
	J7 2.2	+
JAULA 8	J7 2.3	+
	J7 Sn9	-
	J7 2.5	+
	J8 Sn 10	-
JAULA 9	J8 2.6	+
	J8 6.3	-
	J9 5.3	+
	J9 5.1	+
	J9 5	-
	J9 5.2	+

Los terceros resultados de laboratorio obtenidos a partir de la evaluación de la técnica de PCR en brotes tiernos de jocote de Corona se detallan en la siguiente tabla:

Resultados:

De un total de 38 muestras evaluadas por la técnica de PCR con los primer o cebadores P1/P7 se logro la amplificación de ADN en 25 muestras las cuales presentaron un patrón de banda bien definido correspondiente al fitoplasma encontrado en Jocote de Corona, las cuales al ser sometidas a luz ultravioleta mediante la técnica de electroforesis, estas reaccionaron positivamente al igual que el patrón de banda definido por el marcador.

Así mismo los resultados obtenidos a partir de las 13 muestras restantes fueron negativos ya que no existió una amplificación de la cadena de ADN del fitoplasma cuando estas fueron sometidas al análisis de PCR, ni fueron visibles mediante la exposición de luz ultravioleta en la cámara de electroforesis

5.4 Análisis de Resultados de PCR en Raíces de Jocote de Corona 3 Semana Después de Haber introducidos los Insectos en las Jaulas

Cuadro 10: Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en Raíces de Jocote de Corona 8 Semana después de Haber Introducidos los Insectos en las Jaulas.

Numero de Jaula	Código de Estaca	Resultado de PCR
JAULA 1	RJ1Esn 4	-
	RJ1 Sn 3	+
	RJ1 E 4.2	+
	RJ1 E 4.1	+
	RJ1 Sn 2	+
JAULA 2	RJ1 Sn 1	+
	RJ2 E 10.3	-
	RJ2 E 4.3	-
	RJ2 E 10.2	+
	RJ2 E 10.1	-
JAULA 3	RJ2 E 10.4	-
	RJ3 E 10.6	+
	RJ 3 Sn 7	-
	RJ3 Esn 5	-
	RJ3 E 4.4	+
	RJ3 E 4.5	-
JAULA 4	RJ3 E 10.5	+
	RJ3 Esn 6	+
	RJ 4 E 6	-
	RJ4 E 10.7	+
	RJ4 E 10.8	-
JAULA 5	RJ4 E 10.9	+
	RJ5 E 2	-
	RJ5 E 6.1	-
JAULA 6	RJ5 E 10.10	+
	RJ6 Esn 8	+
JAULA 7	RJ6 E 2.1	-
	RJ7 E 2.5	-
	RJ7 E 2.3	+
JAULA 8	RJ7 Esn 9	+
	RJ7 E 2.2	-
	RJ8 E 6.3	-
JAULA 9	RJ8 E Sn 10	-
	RJ9 E 5.1	+
	RJ9 E 2.5	-
JAULA 10	RJ9 E 5.3	-
	RJ9 E 5	-
	RJ10 E 5.5	-
	RJ10 E 5.4	-
	RJ10 Esn 14	+
	RJ 10 E 5.6	-

La última toma de resultados de laboratorio obtenidos a partir de la evaluación de la técnica de PCR en raíces de jocote de Corona se detalla en la siguiente tabla:

Resultados:

De un total de 44 muestras evaluadas por la técnica de PCR con los primer o cebadores P1/P7 se logro la amplificación de ADN en 20 muestras las cuales presentaron un patrón de banda bien definido correspondiente al fitoplasma encontrado en Jocote de Corona, las cuales al ser sometidas a luz ultravioleta mediante la técnica de electroforesis, estas reaccionaron de forma positiva al igual que el patrón de banda definido por el marcador.

Así mismo los resultados obtenidos a partir de las 24 muestras restantes fueron negativos ya que que no existió una amplificación de la cadena de ADN del fitoplasma cuando estas fueron sometidas al análisis de PCR, ni fueron visibles mediante la exposición de luz ultravioleta en la cámara de electroforesis.

5.5 Análisis de Resultados de PCR en Insectos Homopteros Vectores *Coellidia sp.* y *Graphocephala sp.*,
Ninfas(N) – Adultos (A).

Cuadro 11: Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR en Insectos Vectores *Coellidia sp.* y *Graphocephala sp.*, Ninfas (N) – Adultos (A) introducidos dentro de las Jaulas.

Insecto Vector / Estadio	Código de Laboratorio	Resultado de PCR
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	C96	-
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	C97	-
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	C98	-
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	C99	+
<i>Coellidia sp.</i> (A)	D1	-
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D2	-
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D3	+
<i>Coellidia sp.</i> (A)	D4	+
<i>Coellidia sp.</i> (A)	D5	+
<i>Coellidia sp.</i> (N)	D6	-
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D7	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D8	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D9	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D10	-
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D11	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D12	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D13	+
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D14	-
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D15	-
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D16	-
<i>Coellidia sp.</i> (A)	D17	+
<i>Coellidia sp.</i> (A)	D18	-
<i>Coellidia sp.</i> (A)	D19	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D20	+
<i>Graphocephala sp.</i> (A)	D21	+
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D22	+
<i>Graphocephala sp.</i> (N)	D23	-

La toma de resultados de laboratorio obtenidos a partir de la evaluación de la técnica de PCR en Insectos homopteros Vectores de jocote de Corona se detallan en la siguiente tabla:

Resultados:

De un total de 28 muestras evaluadas por la técnica de PCR con los primer o cebadores P1/P7 se logro la amplificación de ADN en 15 muestras las cuales presentaron un patrón de banda bien definido correspondiente al fitoplasma encontrado en Jocote de Corona, las cuales al ser sometidas a luz ultravioleta mediante la técnica de electroforesis, estas reaccionaron positivamente al igual que el patrón de banda definido por el marcador.

Así mismo los resultados obtenidos a partir de las 12 muestras restantes fueron negativos ya que no existió una amplificación de la cadena de ADN del fitoplasma cuando estas fueron sometidas al análisis de PCR, ni fueron visibles mediante la exposición de luz ultravioleta en la cámara de electroforesis.

5.6 Análisis y Discusión de Resultados de PCR para brotes tiernos en Árboles de Jocote de Corona muestreados en la Zona Occidental y Oriental del País.

Cuadro 12: Resultados de Laboratorio obtenidos a partir de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR para el muestreo realizado en la zona Occidental y Oriental del país en brotes tiernos de Jocote de Corona.

Cód./ Lab.	Resultado PCR	Cantón	Municipio	Departamento
E51	+	San Juan	Alegría	Usulután
E50	+	San Juan	Alegría	Usulután
E48	+	San Juan	Alegría	Usulután
E49	+	San Juan	Alegría	Usulután
E46	-	San Juan	Alegría	Usulután
E47	+	San Juan	Alegría	Usulután
C26	-	San Juan	Alegría	Usulután
C27	+	San Juan	Alegría	Usulután
C28	+	San Juan	Alegría	Usulután
C29	+	San Juan	Alegría	Usulután
C31	+	Las Casitas	Alegría	Usulután
C30	+	Las Casitas	Alegría	Usulután
C32	+	Las Casitas	Alegría	Usulután
C33	+	Las Casitas	Alegría	Usulután
C43	+	Montebello	El Congo	Santa Ana
C36	+	Las Lajas	Izalco	Sonsonate
C35	+	Potreros de La Laguna	Santa Ana	Santa Ana
C41	+	Lomas de San Marcelino	Santa Ana	Santa Ana
C44	+	Lomas de San Marcelino	Santa Ana	Santa Ana
C45	+	Lomas de San Marcelino	Santa Ana	Santa Ana
C42	+	Lomas de San Marcelino	Santa Ana	Santa Ana
C46	+	Lomas de San Marcelino	Santa Ana	Santa Ana
C40	+	Lomas de San Marcelino	Santa Ana	Santa Ana
C34	+	Tulapa	Apaneca	Ahuachapán
C37	+	Tulapa	Apaneca	Ahuachapán
C38	+	Tulapa	Apaneca	Ahuachapán
C39	-	Tizapa	Apaneca	Ahuachapán
C48	-	La Unión	Juayua	Sonsonate
C49	+	La Unión	Juayua	Sonsonate
C50	+	La Unión	Juayua	Sonsonate
C47	-	La Unión	Juayua	Sonsonate
C51	-	Las Penas	Juayua	Sonsonate

Los resultados de laboratorio obtenidos a partir del muestreo de brotes en árboles de jocote de Corona muestreados en las zonas altamente productoras de la zona Oriental y Occidental del país se detallan a continuación en la siguiente tabla:

Resultados de Laboratorio:

De un total de 44 muestras evaluadas por la técnica de PCR con los primer o cebadores P1/P7 se logró la amplificación de ADN en 26 muestras las cuales presentaron un patrón de banda bien definido correspondiente al fitoplasma encontrado en Jocote de Corona, las cuales al ser sometidas a luz ultravioleta mediante la técnica de electroforesis, estas reaccionaron positivamente al igual que el patrón de banda definido por el marcador.

Así mismo los resultados obtenidos a partir de las 6 muestras restantes fueron que no existió una amplificación de la cadena de ADN del fitoplasma cuando estas fueron sometidas al análisis de PCR, no fueron visibles mediante la exposición de luz ultravioleta en la cámara de electroforesis.

Resultados de Campo:

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR y PCR-nested, se logró determinar qué; de un total de 24 árboles muestreados, 20 de ellos reaccionaron positivamente a la presencia de fitoplasma dentro del follaje analizado (aunque solo 2 presentaron la presencia de fitoplasma en el estrato alto del follaje ("E46" y "E26"), así mismo solo 4 árboles reaccionaron de forma negativa a la presencia de fitoplasma en el estrato alto y bajo del follaje ("C39", "C48", "C47" y "C51").

5.7 DISCUSIÓN GENERAL

La producción de Jocote de Corona ha sostenido por muchos años la economía de los productores que antes se dedicaban al cultivo del café, El jocote de corona es sembrado en su mayoría en asocio con café (60.6%) y el resto lo utilizan como sombra (33.33%). El 40.9% de las plantaciones de la zona occidental tienen más de 20 años de establecidas. En El Salvador, existe más de 147 Ha, de tierras altas cultivadas, las cuales para el 2007 realizaron una exportación de más de 370,147 kg de jocote congelado a EEUU, haciendo un total de \$ 787,461 dólares.

Este tipo de cultivo abre muchas oportunidades comerciales para los productores ya que con la implementación del TLC, estos pueden vender sus cosechas como productos nostálgicos hacia otros países, debido a que el Jocote de corona, es muy aceptado en el mercado norte americano. Entre los problemas fitosanitarios que más afectan la producción de jocote de corona en El Salvador, esta la enfermedad llamada "Ajobamiento" o "Apitarrillamiento" causada por un fitoplasma.

Esta enfermedad merece mucha atención, ya que en algunas zonas de Santa Ana se han eliminado plantaciones completas de este cultivo, afectando negativamente la producción, ya que en este departamento se encargan de producir cerca del 60% de la cosecha nacional. El ajobamiento ha adquirido una relevante importancia económica, social y ambiental, como resultado de la patología del cultivo, para el año de 1996 las plantaciones de jocote presentaban una disminución del volumen de producción del 56.3%. Lo cual hace que se estime que no existan plantaciones sanas para extraer material vegetativo con fines de propagación.

De acuerdo con la investigación realizada sobre fitoplasma en Jocote de Corona, se logro identificar la presencia del patógeno fitoparasito por medio de las técnicas de PCR y PCR-nested dentro del material vegetativo confinado dentro de las jaulas, ya que las muestras al ser analizadas y sometidas a cámara de electroforesis presentaron una amplificación en las bandas del ADN fitoplasmático correspondiente al 16SrRNA grupo III enfermedad "X" causante del fitoplasma en árboles frutales perennes de pepita conocida como ajobamiento o apitarrillamiento en Jocote de Corona, estas amplificaciones del ADN fueron encontradas en raíces como en brotes tiernos dentro de las estacas y dentro del tejido de los arboles muestreados . Lo cual revela la presencia de fitoplasma en Jocote de Corona no solo en la zona Occidental del país (Santa Ana), sino también en la zona paracentral (San Vicente), confirmando de esta forma la diseminación o propagación de la enfermedad en nuestro país

Es de recalcar que el éxito de la extracción de ADN fitoplasmático dentro de la investigación se debió al buen manejo, colecta y transporte de los brotes y raíces, en base a lo sugerido por el Ing. Adamid Beltrán técnico de CENTA y a algunos documentos que recalcan la abundante concentración de fitoplasmas en los tejidos.

Además debe de tomarse en cuenta lo establecido en estudio realizados en ciruela (Braun, Sinclair...) que determinaron que en las plantas leñosas perennes como la manzana, pera y olmo, existe un acumulamiento de carbohidratos en las hojas tiernas en proporción a las hojas maduras. Por ello se estimo que la mayor concentración de fitoplasma en la estaca estaba ligado al transporte activo de floema hacia la formación de nuevos brotes vegetativo.

Otro ejemplo de apoyo a lo expuesto anteriormente es el caso del declinamiento de la papaya (Siddique et al., 1998), en los cuales se ha encontrado la presencia de estos microorganismos los cuales se localizan en las partes inmaduras y en activo crecimiento, caso contrario en aquellas hojas o partes maduras en donde su detección es un poco más difícil.

Por otro lado al comparar los resultados expuestos en la investigación del amarillamiento letal (AL) del cocotero indican que los patrones no son iguales en toda la planta ya que en una palma puede haber señal positiva en hoja inmadura y negativa en hoja intermedia y en otra palma puede encontrarse la situación inversa.

5.7.1 Discusión de resultados en las estacas confinadas

Con respecto a los análisis de los resultados obtenidos mediante la amplificación de PCR directo varias muestras vegetativas dieron positivo (resultados que no eran esperados dentro de la investigación), lo cual consideramos que pudo ser producto de una mala uniformización del follaje en los arboles.

Otro factor que pudo influir en el estado positivo de las muestras fue el retardamiento en la colecta de las estacas, las cuales se recolectaron una semana después de realizado el muestreo de follaje en los arboles. Por lo cual se debe considerar que pudo existir una alimentación continuada de insectos vectores en los arboles lo cual se manifestó en la amplificación de ADN en las estacas. Un último aspecto que se somete a consideración del por que las muestras resultaron positiva fue la posible introducción de insectos durante el conteo de los brotes ya que las jaulas permitían el paso de insectos pequeños en la base de estas, teoría que puede ser sustentada por que al realizar conteos se encontró diferentes clases de homóptero dentro de la jaula.

Por último es de considerar lo planteado en el amarillamiento letal del cocotero que supone que puede existir una concentración baja en las partes intermedias de las ramas las cuales pudieron estar en la longitud de la estaca cortada en los arboles y que posteriormente pudieron haber aumentado cuando las estacas empezaron la formación de brotes lo cual se sustenta que las hojas no exportan fotosintato en el floema puesto que son zonas de demanda y no de producción sería de esperarse entonces que los fitoplasmas se acumulan allí sin moverse a otras partes al menos durante algunos meses en los que haría la transición a las zonas de producción.

5.7.2 Discusión de resultados sobre las estacas confinadas después de la interacción insecto-planta

Los análisis de PCR realizados en las estacas una semana después de la interacción de los insectos demuestran la presencia de fitoplasmas en algunas estacas que en el primer análisis de reconfirmación de PCR no habían resultado positivas. Esto reconfirma la hipótesis de que el insecto tiene la capacidad de transmitir la enfermedad inmediatamente después de que se alimentan de la planta como lo exponen algunos autores y es altamente peligroso cuando se alimenta de las plantas, por lo cual es de establecer que el insecto es capaz de transmitir la enfermedad en un periodo muy corto, como se ha comprobado dentro de esta investigación.

Además es de recalcar que las estacas presentaron un patrón de potencial muy variable de la infección, ya que cuando se analizaron las muestras de cada uno de los brotes a lo largo de las tres colectas en campo, se encontró una movilidad constante de fitoplasma dentro de la estaca, lo cual concuerda varios estudios realizados que afirman la movilidad

del parasito fitopatogeno dentro de la planta, (Rosenberg & Jones, 1977), (Semüller et al., 1998)

Como en el caso de la investigación realizada en el Decaimiento del Peral la cual establece que los fitoplasmas en plantas leñosas como manzanos, melocotones y perales, la presencia de fitoplasmas en la parte aérea del árbol esta condicionada por el estado del floema (Stoddard, 1947;Hildebrand, 1953; Braun & Semüller, 1982; Semüller et al., 1984). De igual manera según el momento en el que despierte el árbol de la fase de hibernación, podría ser debida a la formacion del nuevo floema que se inicia a partir de la primera mitad de marzo (Evert,1960) y que todavía no ha sido colonizado por los fitoplasmas de las raíces, así como una dilución de los restos fitoplasmaticos en la nueva savia formada. Estudios de transmisión de fitoplasmas por injertos sugieren, que los fitoplasmas invernan en las raíces de los arboles, lo que se traduce en transmisiones durante el verano y el otoño (Griggs, 1965; Schaper, 1981),

pero no durante el invierno (Blodget et al., 1963; Shalla et al., 1964; Seidl & Komarkova, 1973). Esta ausencia de transmisión podría ser debida a la degeneración de los tubos cribosos durante la época (Evert, 1960; Evert, 1963). Sin embargo, estudios recientes realizados en *Prunus* con ESFY han demostrado la existencia de fitoplasmas en estado funcional en la parte area del árbol durante el invierno (Semüller et al., 1998), coincidiendo con lo expuesto por (Rosenberg & Jones, 1977), que parte de los fitoplasmas activos descienden hacia el floema de las raíces y que la elevada detección por pcr en muestras de la parte área del árbol, sea debido a restos de los fitoplasmas degradados, pero una pequeña proporcion podría hibernar en la parte aérea del árbol, utilizando el floema de reemplazamiento desarrollado en el árbol hacia finales de Otoño (Seemuller et al. 1998)

Lo expuesto anteriormente sustenta la variacion de resultados obtenidos en diferentes momentos de muestreo, mediante los análisis de PCR dentro de la investigación

5.7.3 Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN en geles de agarosa.

De un total de 214 muestras analizadas en tejidos de Jocote de Corona durante los cuatro muestreos, 132 resultaron positivas (+), lo cual confirma la transmisión del fitoplasma por los insectos vectores *Graphocephala coccínea* y *Coelidia* sp., lo cual pudo demostrarse cuando las geles de agarosa fueron expuestas a luz ultravioleta (UV) en la cámara de electroforesis estas reflejaron una duplicación exponencial de los fragmentos de ADN obtenidos por medio de la síntesis de *nov*o con los cebadores P1/P7, los cuales fueron capaces de cortar parte de la secuencia de oligonucleótidos del ADN fitoplasmatico alojado o contenido dentro de los brotes y raíces de las estacas confinadas de Jocote de Corona.

Estos resultados fueron comparados y corroborados con muestra de ADN positivo extraído por PCR, mediante la técnica RFLP, las cuales fueron encontradas en tejidos vegetales de jocote de corona, estas muestras fueron donadas por el In. Agr. Adamid Beltrán técnico del Programa de Frutales, las cuales fueron obtenidas a partir de un estudio realizado en las zonas productoras de jocote de corona, proyecto llevado a cado con financiamiento del SINALIT y en coordinación con la Asociación de Desarrollo Comunal Cantón Potrerrillos de La Laguna Arriba (ADESCOPA), en el Municipio de Santa Ana dichas muestras fueron confirmadas como positivas por el CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) al ser sometidas a la prueba de digestión de enzimas ALU I e Hinf I, y cuyos resultados fueron comparados con los del Amarillamiento Letal (AL) del cocotero determinándose así el mismo tipo de fitoplasma encontrado con Jocote de Corona. Por lo cual estas extracciones de ADN en tejidos vegetales e insectos fueron tomadas como controles positivos dentro de la investigación.

De acuerdo con lo anterior cuando las muestras fueron sometidas al análisis de PCR directo estas presentaron el mismo patrón de banda (pares de bases) definido por control positivo utilizado, en cada una de las muestras de PCR analizadas, además las muestras que resultaron sospechosas mediante el PCR directo fueron sometidas a un nuevo análisis mediante la técnica de PCR-nested resultaron positivas en su totalidad (ver Fig.), ya que cada una de las bandas se observó de una forma bien definida cuando se observaron en las geles de agarosa expuestas a luz UV, lo cual constituye una confirmación también la presencia de ADN fitoplasmático en los tejidos de las muestras analizadas.

Así mismo 82 muestras de un total de 214, reaccionaron de forma negativa las cuales no presentaron un patrón de banda bien definido como resultado de la inexistencia de ADN fitoplasmático en las muestras, las cuales definieron el comportamiento de variación de las colectadas realizadas en campo. Esta variación pudo estar influenciada por diversos factores durante el proceso de extracción del ADN, razón por la cual no existió una amplificación o detección del fitoplasma en las geles de agarosa (Semüller et al., 1998). Tal es el caso de lo expuesto en investigaciones como el decaimiento del peral donde se establece que la insuficiente cantidad de ADN y la presencia de inhibidores como enzimas polifenólicas, compuestos de polisacáridos y sustancias húmicas.

En este estudio, es muy posible que la baja concentración de fitoplasmas en el tejido analizado haya sido la causa por la que no se obtuvieron bandas al amplificar por PCR directo. Green et al. (1999); Gundersen and Lee, (1996) y Henson and Frenen, (1993), Al igual como lo afirma Mussetti et al., 2000; Lepka et al., (1999) en el informe sobre la biología molecular en las plantas, al reportar un significativo contenido de polifenol contenido en las plantas infectadas con fitoplasma, reduce la confiabilidad del resultado por la poca pureza de ADN.

Además es de considerar que la utilización de un solo “primer específico” dentro de esta investigación pudo haber aumentado o reducido el número de muestras detectadas con ADN, lo cual concuerda con lo expuesto por Heinrich, M. et al. 2001., el cual describe que desafortunadamente el uso de ciertos primer induce a una banda inespecífica ya que la secuencia homóloga entre la región específica 16S para con los cloroplastos y plastidos tienden a incrementar el riesgo de falsos positivos, la baja concentración y la incerteza de la distribución del patógeno obtenida en la replicación del ADN (PCR). Por lo cual sometemos a consideración estas aseveraciones realizadas en diversas investigaciones para tratar de explicar los diferentes cambios que hubo en las muestras durante las 4 colectas.

Con respecto a análisis de las bandas sospechosas obtenidas en el PCR directo, estas fueron sometidas a análisis de PCR-nested el cual si pudo detectar ADN fitoplasmático, debido a que este método presenta una mayor sensibilidad que el PCR directo, en la detección del patógeno. Cabe mencionar que autores como Gundersen and Lee, (1996), señalan que la realización del PCR-nested a menudo bloquea el efecto de los inhibidores y aumenta el ADN específico, incrementando la sensibilidad de la detección del fitoplasma con bajos títulos. Henson and Frenen, (1993) y Namba et al., (1993), afirman que el PCR-nested ofrece la ventaja de ser un método más sensible que el PCR directo para detectar ADN, ya que puede amplificar fragmentos de ADN detectables con menos ciclos de amplificación, y mejora la especificidad en el diagnóstico. Por lo tanto, con lo señalado anteriormente, es recomendable realizar dos amplificaciones sucesivas del ADN del patógeno extraído dentro del tejido para poder obtener bandas reproducibles.

Otro factor, que según Henson and French, (1993), puede afectar la amplificación del ADN, es la composición óptima de la mezcla y los ciclos de temperatura. Este último puede afectar los rendimientos del producto, el tamaño de este, y la reproducibilidad de este. También puede ser considerado lo enunciado Ahrens y Seemüller (1992), que establecen que para obtener suficiente ADN amplificado de muestras con baja concentración del patógeno, es necesario realizar 40 ciclos de amplificación en el termociclador, y así obtener bandas visibles.

Esta podría ser una explicación de la poca definición de las bandas en las geles de agarosa por lo cual estas no presentaron una menor intensidad de las bandas obtenidas al compararlas con el control positivo.

También se pudo encontrar apoyo en lo que ha sido establecido por (Marcone et al 1996) explica que el estudio de los fitoplasmas en plantas leñosas es difícil pues estos microorganismo presentan una distribución irregular dentro de la planta y están presentes en muy bajas concentraciones.

5.7.4 Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN de insecto vector en geles de agarosa.

De acuerdo a los análisis realizados de PCR en los insectos se comprobó la hipótesis que los insectos analizados en la zona de Santa Ana estaban contaminados con fitoplasma los cuales al hacer introducidos dentro de la jaula tuvieron la capacidad de infectar. Lo cual fue un paso importante en la investigación puesto que no fue necesario el establecimiento de colonias infectivas de insectos antes de introducirlo a las jaulas.

Cabe destacar que por medio de los análisis de PCR se pudo confirmar lo expuesto en trabajos de investigación que tanto ninfa como adulto tienen la capacidad de transmitir la enfermedad a la planta no importando su estadio fisiológico. (Kawakita et al. 2000)

5.7.5 Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN en raíces de jocote corona

Con base a los datos obtenidos en laboratorio podemos considerar que existió una interrelación del patógeno-planta e insecto vector, y este tuvo la capacidad de descender a las partes bajas de las estacas lo cual indica una dinámica constante de fitoplasma dentro de la estaca y una velocidad de contaminación de la misma, mediante el transporte activo del floema. Además se somete a consideración lo expuesto en las investigaciones como el decaimiento del peral y el palto (aguacate); (Semüller et al., 1998) donde se establece que los fitoplasmas en época seca descienden a las zonas bajas de las plantas, como mecanismo de hibernación, para sobrevivir cuando los árboles se dedican a acumular reservas nutritivas como producto del proceso de defoliación. Por lo cual se concluye que el muestreo no está ligado única y exclusivamente a la selección de brotes tiernos o follaje en desarrollo, para su especificidad de contenido fitoplasmático, sino, que se puede encontrar en cualquier época del año distribuido en todo el árbol, ya sea en estado latente o en transporte activo.

5.7.6 Discusión de los resultados a partir de la amplificación del ADN en zonas altamente productoras de Jocote de corona en el país.

El muestreo de las zonas productoras de Jocote corona en el salvador dio como resultado la presencia de fitoplasma tanto en la zona oriental como en la zona paracentral, además de la zona Occidental, lo cual indica que éxito la diseminación de esta enfermedad en todo el territorio nacional y desmiente la teoría de que la enfermedad se localiza en mayor

porcentaje específicamente en la parte occidental del país. Esto conlleva a completar un parámetro de muestreo en cuanto a la localización de arboles libres de fitoplasma en la región, lo cual puede servir como medida fitosanitaria para la colecta de material vegetativo libre de la enfermedad y la elaboración de planes de manejo fitosanitario en el transporte de material vegetativo de un lugar a otro. Evitando así la diseminación extensiva por medio de la siembra de estacas y promoviendo la búsqueda de mayor variabilidad genética a través de la reproducción por semilla de arboles sanos hacia otros puntos del país en donde aun no se encuentre diseminada esta enfermedad y se encuentre contemplado dentro de las zonas aptas para este cultivo.

CONCLUSIONES

1. Se determino mediante pruebas de PCR y PCR-nested, la presencia de fitoplasma en tejidos foliares y radiculares de Jocote de Corona (*Spondias purpurea*).
2. Mediante la técnica de PCR se determino la presencia de fitoplasma dentro del cuerpo de los insectos *Graphocephala* sp. y *Coelidia* sp., en estado inmaduro y Adulto.
3. Se descubrió que la interrelación Vector – patógeno – estacas de Jocote de Corona puede darse en periodos cortos de una semana.
4. El fitoplasma de Jocote de Corona está diseminado en la zona Occidental, Paracentral y Oriental de El Salvador.

6. RECOMENDACIONES

1. Secuenciación del ADN de las muestras obtenidas de insectos homóptera *Graphocephala* sp. y *Coelidia* sp y tejidos vegetales de Jocote de Corona.
2. Evaluación del ciclo de vida y distribución en hospederos alternos de insectos homóptera *Graphocephala* sp. y *Coelidia* sp.
3. Establecimiento de trapeo e investigaciones sobre la elaboración de atrayentes para los insectos homópteros *Coelidia* sp. y *Graphocephala* sp.
4. Evaluación de hospederos alternos (evaluación de plantas de café como posibles hospederos alternos asintomáticos portadores de fitoplasma).
5. Control biológico de insectos homóptera *Graphocephala* sp. y *Coelidia* sp.
6. Banco de germoplasma de Jocote de Corona (*Spondias purpurea*).
7. Rescate de embriones de Jocote de Corona (*Spondias purpurea*).
8. Certificación de fincas libres de fitoplasma (control costoso, técnicas PCR).

BIBLIOGRAFIA

Agrios, G. 1997. Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and Spiroplasmas. In Plant Pathology, 4 th, pp. 457-470. G. N. Agrios (ed). New York: Academic Press.

Ángel P. E.; Salgado G. R. 1998. Cultivo y aprovechamiento de la ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) en el estado de Michoacán. Material mimeografiado. Facultad de agro biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 15 p.

ANACAFE (Asociación Nacional del Café, Guatemala). 2004. Programa de diversificación de ingresos en la Empresa Cafetalera. En línea. Consultado 6 dic 2008. Disponible en www.anacafe.com.pdf

Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., et al 1997. Identification of phytoplasma in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol. Biol.* 6: 115-21.

Albornoz, N.; Oliveira, J.; Carvalho, E.; Guglielmi- Montano, H. S.F. Detección del Fitoplasma ChWBIII en semillas de *Momordica charantia* L. en Brasil. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, Brazil.

Al-Subhi, A.; Al-Saady, N.; Al-habsi, K.; Khan, A. 2007. First Report of Group 16SrVI Phytoplasma in Radish from Oman. Department of Crop Sciences, Sultan Qaboos University, Sultanate of Oman.

Alhudaib, K.; Arocha, Y.; Lucas, L. Alfalfa (*Medicago sativa*) As a New Phytoplasma Host in Saudi Arabia. King Faisal University, Alhassa, Saudi Arabia.

Ahrens, U., and Seemüller, E. (1994). Detection of mycoplasma-like organisms in declining oaks by polymerase chain reaction. *Eur. J. For. Pathol.* 24: 55-63.

Arocha, Y.; Acosta, K.; Piñol, B.; Almeida, R.; Miranda, I.; Lucas, J. S.F. New Phytoplasma host in Cuba. National Centre for Animal and Plant Health, CENSA, Havana, Cuba.

Arocha, Y.; Acosta, K.; Wilson, M.; Hanson, J.; Proud, J.; Zerfy, T.; Abebe, G.; School, M.; Mulaa, B.; Bean, T.; Cools, H.; Fraaije, B.; Wilkinson, M.; Jones, P.; Lucas, J. Napier Grass Stunt and Smut in East Africa. Ethiopia, Kenyan Agricultural Research Institute, KARI, Kenya.

Ashburner, G. R. Cordova, I. Oropeza, C.M. Illingworth, R. and Harrison, N.A. 1996. First report of lethal yellowing in Honduras. *Plant diseases.* 80: 960.

APSNET (The American Phytopathological Society).2007. La enfermedad del fitoplasma. En línea. Consultado 30 ene 2008. Disponible en www.apsnet.org/education/Mlingual/Spanish/8Ds.rtf.

Avinent, L., Llacer, G. Almacellas, J., Tora, R.1997. Pear decline in Spain. Plant Pathol. 46, 694- 698.

Baraona, M.; Rivera, G. 1995. Desarrollo del jocote (*Spondias purpúrea* L). cas (*Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Niedz) en el bosque húmedo premontano de Costa Rica. Agronomía Mesoamericana. 6:23-31

Bartjer LP and Schneider, H. 1960. Relation of pear decline to rootstocks and sieve-tube necrosis. Proceed Am Soc Hort Sci 76: 85-97.

Bautista – Baños, S.; Hernández – López, M.; Díaz – Pérez, C.; Cano – Ochoa, C. 2000. Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rizophus stolonifer* of “ciruela” fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. Postharvest Biology and Technology 20:99-106

Belli, G.; Rui, D.; Fortusini, A.; Pizzoli, L. y To-rresin, G., 1984: Presenza dell'insetto vettore (*Scaphoideus titanus*) e ulteriore diffusione della Flavescenza dorata nei vigneti del Véneto. Vignevisini, 9: 23-27

Beers, E.H., Brunner, J.F., Willet, M.J., Warner, G.M. 1993. Orchard pest management: A resource book for the Pacific Northwest. Yakima, WA: Good fruit grower

Borja, C. et al., 2008. Identificación de plagas y enfermedades de mayor importancia Económica en Jocote de Corona (*Spondias purpúrea*). San Andres, La Libertad, S.V.

Bosco, D.; Coulibaly, A.; Marzachi, C. 2006. Cotton Virescence in Mali. Laboratoire de Biologie des Arthropodes, Katibougou. Mali.

Buduca C, Reynaud B, Lan Sun Luck D, Molinario F. 1996 Electrical penetration graphs from *Peregrinus maidis* on a susceptible maize hybrid. Entomol. Exp. Appl. 79:131-39.

Blodget, E.C., Aichele, M.d., Parsons, J.L. 1963. Evidence of a transmissible factor in pear decline Plant Dis. Repr. 47, 89-93.

Braun EJ and Sinclair WA. 1978. Translocation of phloem necrosis-diseased American elm seedlings. Phytophathol 68: 1733-1737.

Braun, E., Sinclair, W. 1976. Hystopathology of phloem necrosis in *Ulmus Americana*. Phytopathology 66, 598-607.

Cambell, C.; Sauls, J. 1994. Spondias in Florida. Florida Cooperative Extension Service. 3 p. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2003. Arboles de Centroamérica; Spondias purpurea. Pp 889 – 892. En línea. Turrialba, Costa Rica. Consultado 6 dic 2008. Disponible en http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_espcies_yanexos/spondias_purpurea.pdf

Catoni, G. 1934. Casi di deperimento di peri e di meli. Boll Agr. 47, 148- 150 p.

Catlin, PB, Olsson EA and Beutel JA. 1975. Reduced translocation of carbon and nitrogen from leaves with symptoms of pear curl. J Am Soc Hort Sci 100: 184-187.

Cavallini, LF. 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico. En línea. Universidad de Costa Rica. En línea. Consultado 30 ene. 2008. Disponible en http://books.google.com/books?id=l6jDW5HI9BAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_summary_r

Conci, L. Phytoplasma Diseases in Argentina. Current situation. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Cronquist, A. 1968. The evolution and classification of flowering plants. Houghton Mifflin Compañy, Boston. 396 p.

Cuevas, J. A. 1994. Spanish plum, red mombin (*Spondias purpurea*). In neglected Crops: 1492 from a different perspective (eds Hernando Bermejo J.E., Leon, J.) plant production and Protection Series N°. 26. FAO, Roma. Pp 111-115.

CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agrícola y Forestal, sv). 2006. Identificación del vector de fitoplasmosis en jocote de corona, fase II, San Vicente. El Salvador. 7 p.

Crawford, D.L. 1911. American Psyllidae III. (Triozinae). Pom, J. Entomol. 3: 422-453.

Davis, M., Tsai, J., McDaniel, L., Harrison, N. 1988. Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. Mol. Plant-Microbe Interact. 1, 295-302 p.

Deng, S., and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. Journal of microbiological methods 14: 53-61.

Dietrich, CH, Rakitov, RA; Holmes, JL.; Black, WC., 2001. Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. *Mol phylogenet. Evol.* 18:293 – 305.

Doi, Y., Terenaka, M., Yora, K., Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PPLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plant infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or pawlonia witches' broom. Ann. Phytopathol. Soc. jap.. J. Microbiol. Meth. 14, 53-61.

Dollet, M. 1999. Conventional and molecular approaches for detection and diagnosis of plant diseases: application to coconut. In: C. Oropeza, J.L.,Verdeil, G.R., Ashburner, R.,Cardeña and JM Santamaria (Eds.) Current Advance in coconut Biotechnology. pp 162-185. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherland (In press).

D'agostino, G., 1991. Ultrastructural features of primula yellows mycoplasma like organism (MLO) in crosssections of Catharanthus roseus leaves. Journal of structural biology 107: 56-64.

Duduk, B.; Mejia, J.; Paltrinieri, S.; Contaldo, N.; Alvarez, E.; Varon, F.; Bertaccini, A. S.F. Molecular Differentiation of Phytoplasmas Affecting Corn in Colombia and Serbia. DISTA, Plant Pathology, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Bologna, Italy; Institute os Pesticide and Environmental Protection, Belgrade-Zemun, Serbia; CIAT (International Center for Tropical Agriculture, Cali, Valle del Cauca, Colombia.

Eden-gree, S.J. and Schulling, R. 1982. Further studies on roots symptoms in coconut palms affected by lethal yellowing disease in Jamaica. Plant Pathology 31: 215-219.

Escamilla, A., Harrison, N.,Nuñez, H., Apizar, L., Cordova, I., Islas-Flores, I., and Oropeza. C. 1995. Practical use of ADN probe for detection of lethal yellowing of Cocos nucifera L. in México. In: C. Oropeza., WF, Howard. And GR. Ashburner (Eds.) Lethal yellowing: Research and Practical Aspects. Pp 93-99. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Nertherlands.

Evert, R.F. 1960. Phloem structure in Pyrus communis L. and its seasonal changes. University of California Publications in Botany 32, 127-194

Evert, R.F. 1963. The cambium and seasonal development of the phloem in Pyrus malus. Am. J. Bot. 50, 149-159.

Font. Plant Quarentine Today. Diagnostico de una nueva enfermedad en zanahoria. Consultado 21 mar. 2008 en línea disponible en (http://www.sef.es./sef/congreso/archivos/10000012Resumenes_Salamaca.pdf.)

FRUTAL-ES (Programa Nacional de frutas de El Salvador). 2005. Agricultura; Jocote de corona. En línea. Consultado 13 mar 2008. Disponible en <http://www.Jocote de Corona.asp.htm>

Florance, E.R., Cameron, H.R. 1978. Three-dimensional structure and morphology of mycoplasma like bodies associated with albino diseases of *Prunus avium*. *Phytopatology* 68: 75-80.

García, C.; Chávez, J.; Santos, M.; Méndez, J.; Leyva, N. 2006. Transmisión de Tres Grupos de Fitoplasma por *Bactericera cockerelli* a plantas de Chile, Papa y Tomate en Sinaloa, México.

Godoy, C. 2008. Insectos Asociados al Fitoplasma (en línea). Consultado 14 feb. 2008. Disponible en <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/Texto104.html>.

Gonzalez, F.; Paltrinieri, S.; Calari, A.; Bertaccini, A.; Alma, A.; Picciau, L.; Araya, J.; Fiore, N. S.F. Fitoplasma asociados a la vid en Chile: potenciales insectos vectores y plantas reservorio. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Pintana, Santiago de Chile.

Gundersen, D. and Lee, I. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopath Medit.* 35:144-151.

Griggs, W.H. 1965. Topgrafting potted trees. *Prog Rep on Pear Decline University of California, Div. Agri. Sci, Berkeley* 1965, 10-11.

Heinrich, M., Botti, S., Caprara, L., Arthofer, W., Strommer, S., Hanzer, V., Katinger, H., Bertaccini, A. and Machado, M. 2001. Improved Detection Methods for Fruit Tree Phytoplasmas. *International Society for Plant Molecular Biology. Plant Molecular Biology Reporter* 19: 169-179

Hidalgo, C; Urrestarazu, M. 2002. *Tratado de Viticultura General*, edi 3, Publicado por Mundi-Prensa Libros, ISBN 8484760685, 9788484760689. 1235 p. En línea. Consultado 19 mar 2008. Disponible en <http://books.google.com.sv/books?id=FX-LE8Fri24C&printsec=frontcover>

Hildebrand, E.M. 1953. Yellow –red or X-disease of peach. *Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Mem* 323, 54pp.

Howard, F.W. 1983. World distribution and possible geographic origin of lethal yellowing and its vector. *FAO Plant. Bull. Protect* 341: 101-103.

Howard, F.W. 1995. Lethal yellowing vector studies. I. Methods of experimental transmission. In: C. Oropeza., WF, Howard., and GR. Ashburner (Eds.) *Lethal Yellowing: Research and practical aspect.* pp 45-57. Kluwer. Academic Publisher. Dordrecht, The Netherland.

Islas-Flores, I., Santamaria, J., Cordova, I., and Oropeza, C. 1999. Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera*) affected by lethal yellowing. *J. Plant Physiol.* 155: 48-53

Jimenez, Q. 2001. *Spondias purpurea* L.; información general INBIO. En línea. Consultado 6 dic 2008. Disponible en <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/plantas/ubiespejo/ubiid=4415&-find.html>

Jones, P., Tymon, A., and Mpunami, A. 1999. detection of diagnosis of African lethal yellowing like diseases. In: C. Oropeza, J.L., Verdeil, G.R., Ashburner, R., Cardeña and J.M. Santamaria (Eds) Current advance in Coconut Biotechnology. pp 197-220. Kluwer Academic Publisher Dordrecht, The Netherland (In press).

Juliano, J.B. 1932. The cause of sterility in *Spondias purpurea* L. Philippine Agriculturist 21:15-24.

Kartte S and Seemüller E. 1991. Histopathology of apple proliferation in *Malus taxa* and hybrids of different susceptibility. J Phytopatol 131: 149-160.

Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K., et al. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasma in the genital organs and egg of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90:909-14.

Kim, Y.H., LA, Y.L. 1990 an. Ultrastructural of pholen of periwinkle infected with the mulberry dwarf mycoplasma. Korea J. Plant Pathol. 6(2): 280-284.

Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Schneider, B., Seemüller, E., 1994; Identificaton of MLO-specific PCR primers obtained from 16S/23S rRNA spacer sequences. Proceeding of the 10th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM). 261- 262.

Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J., and Purcell, A.H. (1987). Cloning and detection of AND of from non-culturable plant phatogenic mycoplasma-like organism. Science 238: 197-200.

Lee, I.M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W. and Davis, R.E. 1994. Use of mycoplasma like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559-566.

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

Lefol, C., Lherminier, J. Boudon-Padieu, Larrue, J. Louis, C., et al. 1994. Propagation of flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhoper vector *Euselidius variegates* Kbm. *J. invetebr pathol.* 63: 285-93.

Leon, J. 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales. San José, Costa Rica. IICA. 432p.

Lherminier, J., Prensier, G., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A. 1990 immunolabeling of grapevine flavescens dorée MLO insalivary glands of *Euscelidius variegates*: a light and electron microscopy study. *J.Histochem. Cytochem.* 38: 79-86.

Llauger, R.; Collazo, C.; Fabre, S.; Otero, L.; González, C.; Pérez, L.; Rodríguez, R.; Alonso, M.; Luis, M.; Cueto, J.; Dollet, M.; Gato, M. El amarillamiento Letal del Cocotero en Cuba; Estado Actual del Conocimiento de los Cicadélidos (Hemíptera: Cicadellidae) de interés económico para Cuba. (CITMA) Instituto de Ecología y Sistemática, Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente.

Lepka, P. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 59-68 p.

Macía, M.; Barfod, A. 2000. Economic botany of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) in Ecuador. *Economic botany* 54:449-458.

Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E., 1996. European stone fruit yellows phytoplasma as the cause of peach vein enlargement and other yellows and decline of stone fruits in southern Italy. *J. Phytopathol.* 144, 559-564.

Messenger, S.; Di Stefano, J.; Fournier, L. 1997. Rooting and growth of cuttings of *Bursera simarouba*, *Gliricidia sepium* and *Spondias purpurea* in upland stony, upland non-stony and lowland non-stony soils in Ciudad Colon, Costa Rica. *Journal of Sustainable Forestry* 5:139-151.

Miller, A.J.; Schaal, B.A. 2006. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceeding of the National Academic of Sciences. USA.* 102:12801-12806.

Miller, A.J.; Schaal, B.A. 2005. Domestication and the distribution of genetic variation in wild and cultivated population of the Mesoamerican fruit tree, *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology* 15:1467-1480.

Montiel, M. 2000. Introducción a la Flora de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San Jose. 344.

McLarty, H.R. 1948. Killing of pear trees. *Ann. Rep. Canad. Plant Dis. Survey* 28, 77.

McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., de Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yong, I.L., Zhu, B.M., Seemüller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. The micoplasmas, Vol V. In: Withcomb, R.F., Tully, J.G. (eds), Academic Press, New York, pp. 545-640.

Moya-Raygoza G.; Nault LR. 1998. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann Entomol. Soc. Ann.* 91: 668-76.

Murrall DJ; Nault, LR; Hoy CW; Madden LV; Miller SA. 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 1223-32.

Musetti, R. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102, 103-147 p.

Nagaich, BB, Puri BK, Sinha RC, Dhingra MK, Bhardwaj VP. 1974. Mycoplasma – like organisms in plants affected with purple top – roll, marginal flavescence and witches´broom diseases of potatoes. *Phytopathol. Z.* 81: 273-379

Nakashima, K; Hayashi, T. 1995. Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Phytopathol Soc Jpn.* 61: 451-55.

Nakasone, H.Y.; Paull, R. E.1998. Tropical fruits, CAB. International, U.K. 432p.

Namba, S., Kato, S., Iwanami, H., Oyaizu, H., Shiozawa, and T. Tsuchizaki. 1993. Detection and Differentiation of plant-pathogenic mycolasmalike organisms using Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 83: 786-791

Nault, L.K. y J.G. Rodríguez. 1985. The Leafhoppers and Planthoppers. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. 500 pp.

Németh, M. 1986. Virus. Mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff and W. Junk ed. Budapest. 841 p.

Nečas, T.; Mašková, V.; Krška, B. S.F. Varying Symptoms of Phytoplasma ESFY in Apricot and Peach Grown on Fifteen Different *Prunus* Rootstocks. University of Agriculture and Forestry in Brno; Faculty of Horticulture in Lednice – Czech Republic.

Nielson, MW. 1979 taxonomic relationships of leafhopper vector of plant pathogens. See Ref. 57a, pp. 3 – 27.

Nishigawa, H. Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., komoto, A. 2001. In planta expression of a protein encoded by extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology* 147, 507-513.

Oropeza, C., Santamaria, J., y Ashburner, G. R. 1997. A model for the prothogenicity of lethal yellowing coconut palms. (*Cocos nucifera* L). in: SJ Eden-

Green and F Ofori (Eds). Proceeding of a international workshop on lethal yellowing- Like diseases of coconut. Pp 109-118. Elmina, Ghana, November 1995

Parada, Y. et al. 2005. First report of a phytoplasma associated with *Spondias purpurea* (Jocote de Corona) in El Salvador. The Phytopathological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo 2006. *J Gen Plant Pathol* (2006) 72:40-42.

Parthasarathy, M. 1974. Mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology* 64: 667-674.

Pierik, R.; Tetteroo, F. 1987. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan in vitro from inflorescence explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 135-142 p

Pimentel, J.; Cunha-Junior, J.; Guglielmi- Montano, H. 2007. Epidemic Occurrence of Witches' Broom disease of Ipê-Rosa (*Tabebuia pentaphylla*) in the City of Rio de Janeiro, Brazil. Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.

Purcell A.H. 1982. Insect vector relationship with prokaryotic plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20:397-417.

PROMIPAC (Programa de Manejo Integrado de Plagas en America Central, sv). 2006. Identificación de atropodos asociados al cultivo de jocote corona (*Spondias purpurea*) en El Salvador, C.A. 12 p.

Rallo, L. 1973. Decaimiento del peral en plantaciones del valle del Ebro. *An. INIA/Ser protección vegetal* 3, 147- 205 p.

Rosenberg, D.A., Jones, A.I. 1977. Seasonal variation in infectivity of inoculums from X-diseased peach and choke-cherry plants. *Plant Dis. Repr.* 61, 1022-1024.

Torres, E.; Botti, S.; Paltrinieri, M.; Martin, M.P.; Bertacini, A., 2002. First report of *Spartium* witches broom disease in Spain. *New Disease Report* (<http://www.bspp.org.uk/nrd>). vol. 5

Santos, M.; Chávez, J.; Acosta, J.; Méndez, J.; Leyva, N. Ocurrencia y Distribución Geográfica de Fitoplasma Asociados con Enfermedades de Papa en México; Situación Actual sobre Enfermedades Fitoplasmáticas en Hortalizas en México. CIIDIR-IPN-Sinaloa, Guasave. México.

Sainis, P.; Dovas, C.; Maliogka, V.; Katis, N. 2005. Development of Nested PCR Using Generic and Specific Primers for the Detection of Phytoplasmas in Various host in Greece. Plant Pathology laboratory, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Greece.

Seemüller, E., Schaper, U., Zimmermann, E. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *J. Plant Dis. Protect.* 91, 371-382

Seemüller, E., Marcone, C., C, Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.

Seemüller, E., Stolz, H., Kison, H. 1998. Persistence of the European stone fruit yellows phytoplasma in aerial parts of *Prunus* taxa during dormant season. *J. Phytopathol.* 146, 407-410.

Seidl, V. Komarkova, V. 1973. On some problems of apple proliferation disease. Proceedings of the 7th Conference of Czechoslovak Plant Virologists, 1971. Slovak Academic Science. Bratislava.

Shalla, T.A., Carroll, T.W., Chiarappa, L. 1964. Transmission of pear decline by grafting. *Calif. Agric.* 18, 4-5.

Stoddard, L.M. 1947. The X-disease and its chemotherapy. *Conn Agric. Exp. Stn. Bull.* 506, 1-19.

Siddique, ABM, Gurthrie JN, Walsh KB, With DT, Scott PT. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Dis.* 82:1112-20

Schaff, D., Lee, I.M., Davis, R.E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plant by polymerase chain reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186: 1503-1509.

Schaper, U. 1981. Untersuchungen zum Nachweis und Besiedlungsverhalten sowie zur Bekämpfung der Erreger der Triebsucht des Apfels und des Birnenverfalls. University of Göttingen. Dissertation.

Scharper, U., Seemüller, E. 1982. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* 72, 736-742.

Thomas, D. 1979. Mycoplasma like bodies associated with lethal declines palms in Florida. *Phytopathology*, 69: 928-934.

Universidad de Tokio. 2001. Ciclo de vida e interacción entre fitoplasma con el insecto (en línea). Consultado 30 ene. 2008. Disponible en <http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/planpath/phyto-genome/what.htm>

The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2003 Phytoplasma taxonomy group (2003). Description of the genus 'Candidatus Phytoplasma', taxon

for the non-helical wall-less prokaryotes colonizing plant phloem and insect. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, sybmitted.

Vanegas, M. 2004. El cultivo de Jocote de Corona en El Salvador. Ministerio de Agricultura y ganadería, programa de frutales de El Salvador, IICA Frutales.

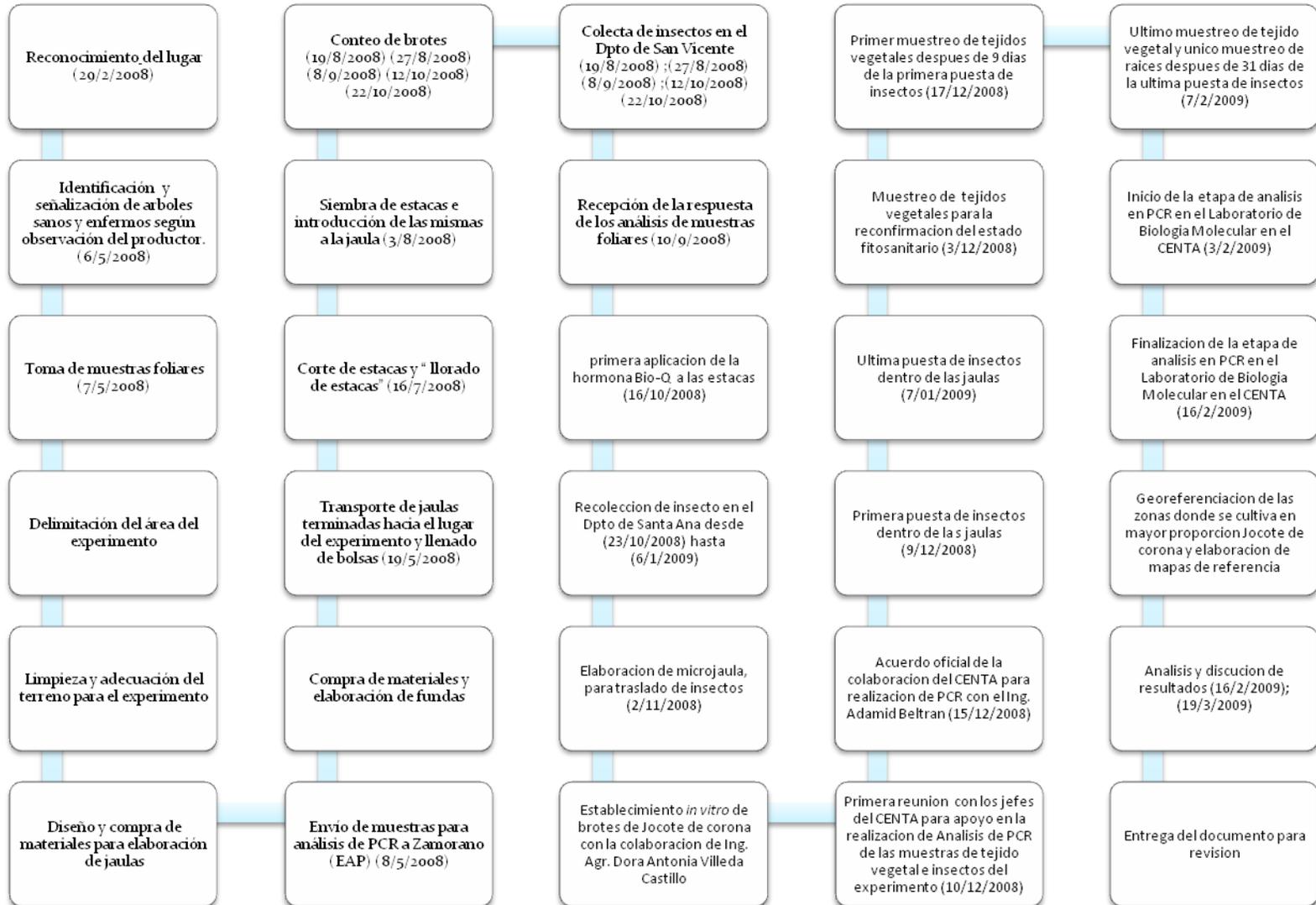
Wang, L.; Michelutti, R. 2008. Survey of "Candidatus Phytoplasma occurrence in the Canadian Clonal Genebank and commercial plantings. Agriculture and Agri-Food Canada Canadian Clonal Genebank, Ontario, Canada.

Waters, H., Hunt, P. 1980. The in vivo three-dimensional from of a plant mycoplasma-like organism by the analysis of serial ultrathin section. *J. Gen. Microbiol.* 116:111-131.

Wayadande, AC., Baker GR., Fletcher, J. 1997. Comparative ultrastructure of the salivary glands of two phytophathogen vectors, the beet leafhopper, *Cicurlifer tenellus* (Baker) and the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* Delong and Wolcott (Homoptera: Cicadellidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 26:113-20.

9. ANEXOS

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES



Laboratorio de fitopatología, Escuela Agrícola Panamericana. Encargada de laboratorio. Débora Casco.

Anexo 2. Resultados obtenidos en el primer y segundo PCR al analizar las 53 muestras de insectos

Insecto	Familia	Resultados primer PCR primers P1/P7	Resultados segundo PCR primers RU3/FU5
1 a	Chrysomelidae	-	-
1 b	Chrysomelidae	-	-
1 c	Chrysomelidae	-	-
2 a	Cryptocephalus	-	-
2 b	Cryptocephalus	-	-
2 c	Cryptocephalus	-	-
3 a	Chrysomelidae	-	-
4 a	Acanaloniidae	-	-
4 b	Acanaloniidae	-	-
4 c	Acanaloniidae	-	-
5 a	Flatidae grandes (Homoptera)	-	-
5 b	Flatidae grandes (Homoptera)	-	-
5 c	Flatidae grandes (Homoptera)	-	-
6 a	Flatidae pequeños alas manchadas (Homoptera)	-	-
6 b	Flatidae pequeños alas manchadas (Homoptera)	-	-
6 c	Flatidae pequeños alas manchadas (Homoptera)	-	-
7 a	Cicadellidae (Ninfas) Homoptera	+	+
7 b	Cicadellidae (Ninfas) Homoptera	-	-
7 c	Cicadellidae (Ninfas) Homoptera	-	-
8 a	Homoptera no determinado	-	-
8 b	Homoptera no determinado	-	-
8 c	Homoptera no determinado	-	-
9 a	Coelidinae (Cicadellidae)	-	-
9 b	Coelidinae (Cicadellidae)	-	-
9 c	Coelidinae (Cicadellidae)	-	-
10 a	Gyponinae (Cicadellidae)	-	-
10 b	Gyponinae (Cicadellidae)	-	-

10 c	Gyponinae (Cicadellidae)	-	-
11 a	Cicadellidae (Cicadellinae)	-	-
11 b	Cicadellidae (Cicadellinae)	-	-
11 c	Cicadellidae (Cicadellinae)	-	-
12 a	Cicadellinae (Cicadellidae) Color Morado	-	-
12 b	Cicadellinae (Cicadellidae) Color Morado	-	-
12 c	Cicadellinae (Cicadellidae) Color Morado	-	-
13 a	Achilidae (Homoptera)	-	-
13 b	Achilidae (Homoptera)	-	-
13 c	Achilidae (Homoptera)	-	-
14 a	Cicadellinae (SP1 y SP2)	-	-
14 b	Cicadellinae (SP1 y SP2)	-	-
14 c	Cicadellinae (SP1 y SP2)	-	-
15 a	Cicadellinae de colores	-	-
15 b	Cicadellinae de colores	-	-
15 c	Cicadellinae de colores	-	-
16 a	Cicadellinae	+	+
16 b	Cicadellinae	-	-
16 c	Cicadellinae	-	-
19 a	Cixiidae	-	-
20 a	Membracidae <i>umbonia</i> sp.	+	+
20 b	Membracidae <i>umbonia</i> sp.	-	+
CYR A	<i>Cyrtodisca major</i> Cicadellidae morado parcela 1.	-	-
CYR B	<i>Cyrtodisca major</i> Cicadellidae morado parcela 1.	-	-
CYR C	<i>Cyrtodisca major</i> Cicadellidae	-	-
CYR D	<i>Cyrtodisca major</i> Cicadellidae	-	-

Anexo 3: Colecta y registro de tejidos vegetales para PCR (x=colecta de tejido vegetal; t= testigo)

Número de Jaula	Código de Estaca	Fecha de colecta para muestrear		
		3 Diciembre de 2008	17 Diciembre de 2008	13 Enero 2009
	4.1	X	X	X
	4.2	X	X	X
	Sn1	X	X	X
	Sn2	X	X	X
	Sn3	X	X	X
	Sn4	X	X	X
	10.1	X	X	X
	10.2	X	X	X
	10.3	X	X	X
	10.4	X	X	X
	4.3	X	X	X
	10.5	X		X
	Sn5	X	X	X
	Sn6	X		X
	4.4	X	X	X
	Sn7	X	X	X
	4.5	X	X	X
	10.6	X	X	X
	6	X		X
	10.8	X	X	X
	10.9	X	X	X
	10.7	X	X	X
	6.1	X	X	X
	2	X	X	X
	10.10	X	X	X
	6.2	X		
	Sn8	X		X
	2.1	X	X	X
	2.2	X		X
	2.3	X	X	X
	Sn9	X	X	X
	2.4	X	X	
	2.5	X	X	X
	Sn10	X	T	X
	Sn11	X	T	
	2.6	X	T	X
	6.3	X	T	X
	Sn12	X	T	
	5.1	X	X	X
	5.3	X	X	X
	5.2	X	X	X
	5	X	X	X
	1	X	T	T
	Sn13	X	T	T
	5.4	X	T	T
	5.5	X	T	T
	5.6	X	T	T
	Sn14	X	T	T

Anexo 4: Registro y liberación de insectos dentro de las jaulas

Número de Jaula /Familia del Insecto	Código de estaca	Total de Insectos Liberados por Jaula	Fecha de Liberación de Insectos			
			9 Diciembre de 2008	12 Diciembre de 2008	17 Diciembre 2009	7 Enero 2009
			Numero Insectos Liberados	Numero Insectos Liberados	Numero Insectos Liberados	Numero Insectos Liberados
1 <i>Graphocephala</i> 	4.1	7 Adultos	6 Adultos		1 Adulto	
	4.2					
	Sn1					
	Sn2					
	Sn3					
2 <i>Coellidia</i> 	10.1	2 Ninfas 2 Adultos		1Ninfa 1 Adulto	1 Ninfa 1Adulto	
	10.2					
	10.3					
	10.4					
	4.3					
3 <i>Coellidia</i> 	10.5	1Ninfa 2 Adultos		1Ninfa	1 Adulto	1 Adulto
	Sn5					
	Sn6					
	4.4					
	Sn7					
	4.5					
4 <i>Graphocephala</i> 	6	5 Adultos	2 Adultos	2 Adultos		1 Adulto
	10.8					
	10.9					
	10.7					
	6.1					
5 <i>Coellidia</i> 	2	3 Ninfas 2 Adultos	1Ninfa 1Adulto	1 Adulto	2 Ninfa	
	10.10					
	6.2					
6 <i>Graphocephala</i> 	Sn8	5 Adultos	2 Adultos	2 Adultos		1 Adulto
	2.1					
7 <i>Graphocephala</i> 	2.2	13 Ninfas	8 Ninfas			5 Ninfas
	2.3					
	Sn9					
	2.4					
	2.5					
8 Testigo 	Sn10	T	T	T	T	T
	Sn11					
	2.6					
	6.3					
9 <i>Graphocephala</i> 	5.1	11 Ninfas	8 Ninfas	2 Ninfas	1 Ninfa	
	5.3					
	5.2					
	5					
10 Testigo 	1	T	T	T	T	T
	Sn13					
	5.4					
	5.5					
	5.6	Total: 37 Ninfas 16 Adultos				

Anexo 5: Presupuesto de materiales y reactivos usados en análisis de PCR

Descripción	Cantidad usada	Costos unit	Cost Tot	
Puntas autoclavables de 0.5 a 10 µl	538	0.036	19.37	según Cotización 2009 de Analítica
Puntas autoclavables de 10 a 100 µl	77	0.033	2.54	según Cotización 2009 de Analítica
Puntas autoclavables de 100 a 1000 µl	86	0.034	2.90	según Cotización 2009 de Analítica
Tubos pcr de 125 µl	276	0.070	19.26	según Cotización 2009 de Analítica
Tubos eppendorf de 1.5 ml	23	0.34572	7.95	según Cotización 2009 de Analítica
Tubos eppendorf de 2 ml	192	0.13	83.79	
Guantes de Nitrilo talla M	50	0.44	22	según Cotización 2009 de Analítica
Papel Aluminio ydas	5	8.13/200	5.5	
Cinta selladora aislante ydas	2	2	1.78	
Viales de 2.0 ml	5	0.306	1.53	
Bolsas plásticas resistentes	22.08/50 U	5	2.21	
Total Materiales			168.83	
EDTA 0.5 M	10 ml	284/500g	5.68	
TAE 1X	6 lts	1.25	7.5	
Alcohol 70 %	1	11.65	11.65	
Marcador Ladder 1 Kbp µl	192	0.12	0.72	
Agarosa gr.	4.5	4.7	21.15	
Cloruro de Sodio al 1.4 M ml	53	140.3/500g	14.96	
Cloruro de Sodio al 6M µl	9000	140.3/500g	0.9	
TE µl	220	183.1/100 ml	0.4	
ARNasa µl	11	238/250 µg	10.47	
Solución SDS al 25% µl	175	335/500g	0.12	
Proteinasa K µl	70	239	16.73	
Alcohol Absoluto µl	7000	261	1.83	
Tris al 0.5 M	2.1 ml	350/100ml	7.35	
Tris al 0.01 M µl	1500 µl	350/100ml	5.25	
Primer P1 µl	360	0.083	29.88	
Primer P7 µl	360	0.05	18	
Azul de Bromofenol gr.	0.1	114.75/25g	0.46	
Kit Extracción REExtract N- Amp PCR	360	4.396		
Agua destilada ml	500 ml		1.5	
Agua Esterilizada ml	15	80/1l	1.2	
Bromuro Ethidium gr.	0.1	15.33	0.32	
Total Reactivos			156.07	
Total Gral.			324.90	

PRESUPUESTO

Detalle	Cantidad	Precio USD	Total USD
Equipo			
GPS*	1 unidad	\$250	\$250
Laptop*	1 unidad	\$1200	\$1,200
Cinta métrica metálica (5m)*	1 unidad	\$5.75	\$6.00
Cola de zorro	1 unidad	\$4.00	\$4.00
Cuma*	4 unidad	\$4.00	\$16.00
Palas	2 unidad	\$7.00	\$14.00
Calentador de agua	1 unidad	\$4.35	\$4.35
Engrapadora	1 unidad	\$1.65	\$1.65
Azadón	1 unidad	\$5.00	\$5.00
Huizute	1 unidad	\$3.00	\$3.00
Lima	1 unidad	\$1.00	\$1.00
Zaranda armada	1 unidad	\$10.00	\$10.00
Hojas de afeitar	18 cajitas	\$18.00	\$18.00
Aspersor manual	1 unidad	\$1.75	\$1.75
Corvo	2 unidad	\$4.50	\$9.00
Tenaza*	1 unidad	\$9.00	\$9.00
Alicate*	1 unidad	\$7.00	\$7.00
Pizeta	1 unidad	donación	donación
Redes entomologías	3 unidad	\$3.00	\$9.00
Subtotal			\$1,568.75
Materiales			
Malla Tricot	106 ^{7/8} yardas	\$74.81	\$74.81
Topes de madera	9 unidad	\$1.25	\$ 11.25
Clavos 1 ^{1/2}	4 onzas	\$0.32	\$0.32
Lija	1 unidad	\$0.20	\$0.20
Cinta ducto	2 unidad	\$2.70	\$7.40
Bolsa transparente 14 x 24 “	100 unidad	\$ 5.75	\$5.75
Manguera de vinil	7 pies	\$0.48	\$3.36
Abrazadera sin fin 1”	3 unidad	\$0.13	\$0.39
Tirro grueso	2 rollos	\$1.90	\$3.80
Tubo plástico standar	2 yardas	\$0.36	\$0.72
Pilas Alcalinas 2ª	2 unidad	\$1.50	\$1.50
Retazo de playwood	2 unidad	\$1.50	\$3.00
Bolsas 6 x 10”	100 unidad	\$0.56	\$0.56
Cono de hilo 6000 yda.	1 unidad	\$2.00	\$4.00
Cono de hilo 500 yda.	1 unidad	\$0.20	\$0.20
Papel de empaque	35 pliegos	\$0.02	\$0.70
Bolsas de polietileno 9x12”	3 cientos	\$2.45/ciento	\$7.35
Plástico para forrar cuadernos	24 yardas	\$1.00	\$24.00
Plumón permanente	2 unidad	\$1.00	\$2.00
Lazos de amarre	2 unidad	\$1.50	\$3.00
Aguja capotera	4 unidad	\$0.25	\$1.00
Cajas plásticas tipo panochera	3 unidad	\$2.00	\$2.00
Tubos de ensayo 15cm	6 unidad	donación	donación
Viales de vidrio pequeños	6 unidad	donación	donación
Tela punto	2 yardas	\$0.70	\$ 1.40

Tela dacron retazo	8 yardas	\$0.60	\$4.80
Zipper 18" plástico	4 docenas	\$1.00	\$ 4.00
Plástico 0.5	2 yardas	\$1.00	\$ 2.00
Spray anaranjado	1 bote	\$ 1.75	\$ 1.75
Bolsas de polietileno	245 bolsas	\$6.79	\$6.79
Alambre galvanizado liso 9	2 libras	\$0.67	\$ 1.34
Electrodo HO dulce b3/32p	3 libras	\$1.15	\$3.45
Varilla ¼ redondo liso	58 varillas	\$1.62	\$ 94.38
Subtotal			\$277.22
Literatura, documentación, información			
Papelería e impresiones			\$100.00
Subtotal			\$100.00
Gastos de transporte			
Combustible			\$1569.55
Transporte colectivo			\$51.84
Subtotal			\$1621.39
Gastos de mano de obra			
Hechura y Soldadura de las trampa	48 jaulas	\$1.04 /jaula	\$50.00
Costura de trampa	48 jaulas	\$2.00 /jaula	\$96.00
Subtotal			\$146.00
TOTAL USD			\$3,713.36
TOTAL FINAL DE AMBAS FASES			\$8,433.26

* Recursos propios