

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**Identificación del vector del fitoplasma causante de la escoba de bruja en
murta (*Ugni molinae* Turcz.)**

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Agronomía.

Jaime Alberto Miño González

VALDIVIA-CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE:

Sra. Nancy Andrade S.
Ing. Agr., M. Sc.

PROFESORES INFORMANTES:

Sra. Ilona Concha G.
M. Sc., Dr. Cs.

Sr. Roberto Carrillo LI.
Ing. Agr., M. Sc., Ph.D.

AGRADECIMIENTOS

A la hora de escribir esta parte, resulta más difícil incluso que el haber redactado todo este trabajo, al pensar en todas las personas que de una u otra forma participaron, el titular soy yo pero detrás de mi existen un sin número de personas que fueron parte importante e influyente en los resultados obtenidos de esta investigación, por lo que resulta justo y necesario acordarme de todos ellos ahora que todo a concluido exitosamente, muchos de ellos participaron con sus conocimientos, paciencia, apoyo y algunos con cosas tan simples pero tan significativas como un palabra de estímulo y ánimo en los momentos difíciles, a todos ellos de verdad muchas gracias.

Parte de estas personas a las cuales les agradezco profunda y sinceramente son: La Dra. Ilona Concha, la profesora Mónica Brito, la profesora Cecilia Rauch y en realidad a todo el Laboratorio de Señalización Celular del Instituto de Bioquímica donde desarrolle la mayor parte de este trabajo y donde me enseñaron y apoyaron con paciencia durante mi permanencia allí. Además de la Ana Siegmund del Instituto de Histología y Patología. A La Dra. Kety Zanol de la Universidad Federal do Paraná de Brasil. Y a mi querida amiga la Dra. Phyllis Weintraub del Instituto Volcani de Israel quien también tuvo un participación importante. Por supuesto agradecer a la Dirección de Investigación y Desarrollo de esta Universidad que financio gran parte de esta tesis como parte del proyecto DID-UACH/S-98-23.

A Dr. Roberto Carrillo por su gran apoyo, consejo y ayuda brindada, a todo el laboratorio de Entomología, al laboratorio de Fitopatología, mejor dicho a todas la personas que componen estos laboratorios quienes también me dieron su ayuda y apoyo, gracias a todos!!!.

La parte final pero no menos importante a quien me soporto más y quien lidio conmigo y con mi carácter. Quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo que involucraba dos de mis áreas favoritas: la entomología y la fitopatología, la Profesora Nancy Andrade, gracias profe sincera y especialmente por todo.

A mis madrinas particulares Giovito e Ingrid por todos los deseos que me cumplieron, a mis amigos íntimos Claudia, Cristian, Sole, Toto, Carolina, Vivi y Marlis. Con ellos enfrente esta parte tan difícil pero a la vez importante de mi vida, niños de verdad muchas gracias!!!!!!.

Sin embargo a quienes más les debo mis agradecimientos por haberme apoyado, soportado, brindado su estímulo y sobretodo por haberme dado la oportunidad de desarrollarme y cumplir con mi deseo de ser un profesional son mis padres y hermanos, muchas pero muchas gracias, y ahora puedo decirles con orgullo ¡lo logramos!. Pero por sobretodo *gracias Jehová!!!*.

Quizás a muchos no nombre porque en este momento son tantas las emociones que se tienen al haber alcanzado este logro que la memoria falla un poco, pero a todos esos anónimos que de una u otra forma participaron también gracias!!!!.

*A Jehová,
A mi Padre, Madre, Ratita,
Nene y a Pipe por el cariño brindado.*

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Murta (<i>Ugni moënae</i> Turcz.)	3
2.1.1	Descripción morfológica	3
2.1.2	Habitad natural	3
2.1.3	Crecimiento y desarrollo	4
2.1.4	Fenología	4
2.1.5	Usos	5
2.1.6	Patógenos asociados a la murta	6
2.1.7 2.2	Característica de la escoba de bruja	7
2.2.1	Fitoplasmas	8
2.2.2 2.3	Fitoplasmas como agentes patógenos	9
2.3.1	Métodos de identificación de fitoplasmas y sus	10
2.3.2	vectores	14
2.4	Vectores de fitoplasmas	15
2.4.1	Fitoplasma-Vector	18
2.4.1.1	Homoptera: El grupo más importante de vectores	22
2.4.1.2	Modelos de transmisión	22
2.4.1.3	Modelos de transmisión asociados a fitoplasmas	23
2.4.1.4 3	Transmisión persistente-circulativa	23
3.1 3.1.1	Transmisión persistente-propagativa	24
	Transmisión transovarial	25
	Transmisión mixta	28
	MATERIAL Y MÉTODOS	28
	Materiales	28
	Material vegetal	

Capítulo		Página
3.1.2	Insectos	28
3.1.3	Material de laboratorio	28
3.2	Métodos	29
3.2.1	Selección y descripción del área de estudio	29
3.2.2	Colecta del material	31
3.2.2.1	Trampas de intercepción	31
3.2.2.2	Conservación del material colectado	32
3.3	Clasificación e identificación taxonómica	32
3.4	Detección de los fitoplasmas en los Auchenorrhyncha seleccionados	32
3.4.1	Extracción de ADN de insectos	33
3.4.2	Extracción de ADN vegetal	34
3.4.2.1	Calidad y cuantificación del ADN extraído	35
3.4.3	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	35
3.4.4	Hibridación <i>in situ</i>	36
3.5	Análisis de datos	38
3.5.1	Análisis de los ensayos relacionados con el muestreo de los Auchenorrhyncha	38
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
4.1	Muestreo de los Auchenorrhyncha	40
4.2	Clasificación taxonómica	40
4.3	Extracción de ADN para PCR	49
4.4	Análisis de la polimerasa en cadena (PCR)	52
4.5	Hibridación <i>in situ</i>	58
5	CONCLUSIONES	62
6	RESUMEN	63
	SUMMARY	65

Capitulo

Página

7 BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS

66

76

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Vectores de fitoplasmas asociados con varias enfermedades	20
2	Características de transmisión asociadas con fitoplasmas fitopatógenos	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estados fenoiógicos de murta en la X Región de Chile	5
2	Modelo de la evolución de los fitoplasmas en el que se describe una tolerancia ecológica a nuevas ecoespecies emergentes	21
3	Diagrama de representación de transmisión transovarial	26
4	Diagrama representativo de transmisión mixta	27
5	Familia Cicadellidae Subfamilia Deltocephalinae <i>Carelmapu aureonitens</i> Linnovuori & DeLong	41
6	Familia Cicadellidae Subfamilia Deltocephalinae <i>Carelmapu ramosi</i> Linnovuori	41
7	Familia Cicadellidae Subfamilia Deltocephalinae <i>Paratanus rotundiceps</i> Linnovuori	42
8	Familia Cicadellidae Subfamilia Deliocephalinae <i>Amplicephalus glaucus</i> Blanchard	42
9	Especie perteneciente a la Familia Psyllidae	43
10	Especie 1 perteneciente a la Familia Cicadellidae, Subfamilia Cicadellinae	44
11	Especie 2 perteneciente a la Familia Cicadellidae, Subfamilia Typhiocybinae	45
12	Especie perteneciente a la Familia Cicadellidae, Subfamilia Typhiocybinae	45
13	Especie perteneciente a la Familia Psyllidae	46
14	Distribución temporal de las distintas especies colectadas durante la época de colecta	49

Figura		Página
15	Electroforesis de geles de agarosa (1%), correspondiente a los ADN extraídos y teñidos con bromuro de etidio	51
16	Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de un Nested-PCR teñidos con bromuro de etidio	53
17	Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) de los productos de PCR utilizando los ADN extraídos teñidos con bromuro de etidio	54
18	Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR utilizando los ADN extraídos teñidos con bromuro de etidio 55	
19	Hibridación <i>in situ</i> en <i>C. aureonitens</i> y <i>C. ramos/</i> . (A y C) tejido infectado y (B) control negativo	60
20	Hibridación <i>in situ</i> en Typhlocybinæ. (A y C) tejido sin presencia de fitoplasmas y (B) control negativo	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Fotografías de (A) hojas y (B) frutos de plantas de murta	77
2	Sintomatología de escoba de bruja en murta	78
3	Soluciones y reactivos para extraer ADN de insectos y vegetales	79
4	Concentraciones del ADN extraído de insectos y plantas.	80
5	Reactivos y soluciones para análisis de PCR	81
6	Protocolo de preparación de porta objetos, inclusión y fijación de cortes histológicos de insectos	82
7	Reactivos y soluciones de hibridación <i>in situ</i>	83
8	Fotografías de los (A) bordes y de los (B) sectores colindantes al área de estudio	86
9	Trampas de intercepción ubicadas en el (A) borde y en el (B) interior del área de estudio	88
10	Fotografías de las trampas usadas con los dos colores bases utilizados, (A) amarillo fluorescente y (B) amarillo normal	89
11	Registro de la cantidad de insectos colectados utilizando trampas amarillas durante la época de colecta	90
12	Registro de la cantidad de insectos colectados utilizando trampas amarillas fluorescentes durante la época de colecta	91
13	Registro individual de las especies colectadas a lo largo de la etapa de supervisión.	92
14	Análisis de varianza	93

Anexo		Página
15	Comparación entre las distintas épocas de colecta por medio de un análisis de Andeva factorial	94
16	Comparación entre los distintos colores usados en las trampas durante la época de colecta por medio de Andeva factorial	94
17	Comparación entre las diferentes ubicaciones de las trampas dentro del sector de colecta, mediante Andeva factorial	95
18	Fotografía Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR teñidos con bromuro de etidio. Usando los partidores GLUT1 y GLUT2	96
19	Hibridaciones <i>in situ</i> realizadas en <i>Euscelidius variegatus</i> , en (B) glándulas salivales e (F) intestinos	97
20	Fotografía de análisis Southern blot efectuado en sondas fU5/rU3. (A) "sense" (fU5), (B) "antisense" (rU3) y (C y D) control	98

1 INTRODUCCION

Chile tiene ventajas comparativas con relación a los demás países con respecto a la fruticultura, ya que cuenta con un clima privilegiado y diverso, por la contraestación con respecto al hemisferio norte. Sin embargo, cada vez estas ventajas se van reduciendo con el aumento de la tecnificación y el desarrollo de variedades más productivas, afectando principalmente a los frutales tradicionales.

Por esta razón, es importante el desarrollo de frutales nativos que pueden ser una alternativa productiva, ya sea como producto fresco o como industrial. Este es el caso de la murta, arbusto nativo de la zona sur de Chile, que cuenta con grandes posibilidades de ser desarrollado como un frutal de exportación con los fines ya mencionados anteriormente.

Sin embargo, una parte del proceso inicial para alcanzar este objetivo lo constituye la realización de estudios de la especie en relación con su ciclo de vida, fructificación, plagas y enfermedades asociadas, todo lo cual dará una base sólida para el desarrollo integrado de esta especie como cultivo frutal.

La murta se ve afectada seriamente por una enfermedad conocida como escoba de bruja. El agente causal de esta enfermedad es un fitoplasma, microorganismo perteneciente a los Mollicutes, que afecta a vegetales.

En esta tesis se postula que el fitoplasma causante de la escoba de bruja en murta requeriría de un vector, específicamente un insecto, el cual se encontraría asociado a este arbusto directa o indirectamente y que estaría clasificado dentro del Orden Hemiptera, Suborden Homoptera.

Además, se postula como hipótesis secundaria la existencia de un vector único, el que correspondería a una especie nativa dentro de este grupo de insectos.

El objetivo general de esta tesis es lograr la identificación y clasificación taxonómica de dicho vector, lo que permitiría el desarrollo posterior de técnicas de control y manejo de la enfermedad y su vector.

Los objetivos específicos de esta tesis son los siguientes:

- Probar la efectividad y especificidad de los métodos de diagnóstico de tipo molecular (PCR e hibridación *in situ*).
- Determinar la distribución de este vector dentro del área y a lo largo de las épocas de estudio elegidas.
- Comparar la atracción a colores determinados, por parte de los cicadelidos, y finalmente comparar épocas de colecta, ubicación sobre el número de cicadelidos colectados.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Murta (*Ugni molinae* Turcz.)

La murta (*Ugni molinae* Turcz.) es un arbusto nativo, siempre verde, de amplia distribución en Chile y que pertenece a la familia Myrtaceae (URBAN, 1934; RAMIREZ et al., 1980).

Crece habitualmente en terrenos despejados, en bordes de bosques, formando parte del matorral. Se encuentra en el país desde Talca hasta el río Palena. En la parte norte de su área de dispersión habita principalmente en la costa; más al sur; se encuentra también hacia el interior, existe además en el archipiélago de Juan Fernández. Es una especie chilena frecuente y que forma comunidades monoespecíficas (HOFFMANN, 1995).

2.1.1 Descripción morfológica. Según ZEVALLOS y MATTHEI (1992), sus hojas son perennes, simples y sin estipulas, elíptico-lanceoladas o elíptico-oblanceoladas, con borde entero, de color verde y sus hojitas terminales son rojizas de 0.5 a 1 cm de ancho y de 1.5 a 4.5 cm de largo.

Arbusto siempre verde, muy polimorfo, pequeño en condiciones de sequía, pero puede alcanzar unos 2 metros en zonas con alta pluviosidad; sus ramas nuevas son comprimidas y cubiertas de tricomas. Presenta hojas pecioladas, opuestas, sin estipulas, aovado-oblongas, con el ápice agudo, verdes por encima, glaucas y con puntuaciones por el envés; de 2 a 2,5 cm de longitud (Anexo 1) (HOFFMANN, 1995).

2.1.2 Hábitad natural. Es un vegetal de crecimiento arbustivo abundante en forma silvestre en el sur de Chile (entre la VII y XI Región), especialmente en la Cordillera de la Costa y parte de la precordillera andina. Se le encuentra

formando murtales solos o asociados a otros vegetales arbustivos o arbóreos (ALEA y RAMIREZ, 1993).

Según LAVIN y MUÑOZ (1998), la murta crece de preferencia en lugares soleados y secos, aún cuando se encuentra también a orillas de cursos de agua. El arbusto crece formando matorrales de densidad variable, constituido por la brotación de yemas caulinares subterráneas, o más corrientemente, por el enraizamiento natural de las ramas que crecen pegadas al suelo.

Esta planta está naturalmente adaptada a los suelos y condiciones de clima de vastos sectores agrícolas marginales, en los cuales las alternativas de cultivo son bastante limitadas (MEDEL, 1986; LAVIN y VEGA, 1996).

2.1.3 Crecimiento y desarrollo. Normalmente el desarrollo de esta especie es rápido si se encuentra ubicada en suelos húmedos y de buena calidad. Su crecimiento en altura no es el que normalmente alcanzan las plantas que poseen un tallo único, sin embargo, a los 2 o 3 años de edad pueden alcanzar hasta un metro de altura. Alrededor de los 4 a 5 años estas plantas producen sus primeras flores, sin embargo, este proceso se adelanta considerablemente cuando son producidas por vía asexual (RODRIGUEZ, 1986).

2.1.4 Fenología. En la X Región el crecimiento vegetativo primaveral se inicia a fines de agosto y comienzos de primavera. Se puede visualizar un botón floral rosado desde fines de noviembre hasta mediados de enero. El estado de plena floración se observa desde mediados de diciembre hasta fines de enero. (MEDEL, 1981; SEGUÉL, 1986, y CARDENAS, 1998). Con flores péndulas, solitarias, axilares, largamente pedunculadas, hermafroditas de cinco sépalos unidos en la base y doblados hacia fuera, cinco pétalos lineales, agudos y redondos, de estambres numerosos, el estilo es más largo que los estambres (HOFFMANN, 1995).

La fructificación comienza en el mes de enero y se extiende hasta el mes de abril, la maduración ocurre entre marzo y abril. Su floración ocurre entre noviembre y diciembre (Figura 1), (MEDEL, 1981; SEGUÉL, 1986, y CARDENAS, 1998). El fruto; es una baya globosa que contiene gran cantidad de semillas, carnosa, dulce y aromática, con los restos de cálices pentámeros y tetrámeros en la misma planta (HOFFMANN, 1995).

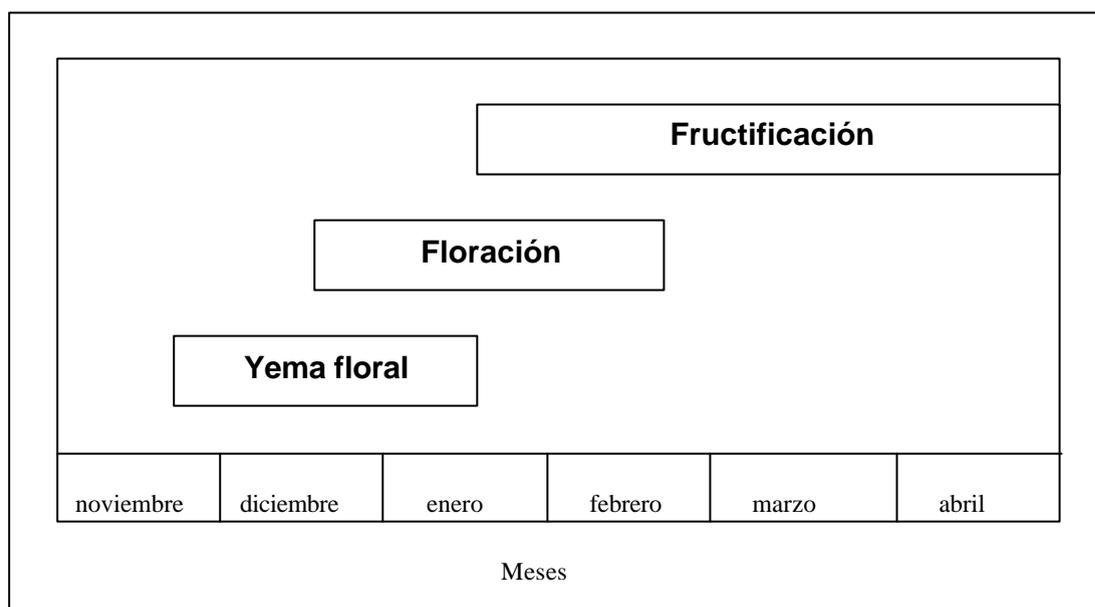


FIGURA 1. Estados fenológicos de murta en la Xª Región de Chile.

FUENTE: Adaptado de CARDENAS (1998).

2.1.5 Usos. Esta especie tiene un gran potencial como frutal arbustivo debido a la peculiaridad del sabor y aroma de su fruta (VENEGAS *et al.*, 1995). De hecho, entre marzo y abril se recolecta la fruta de plantas silvestres, la que se comercializa en la mayoría de los pueblos y ciudades del sur de Chile (LAVIN y MUÑOZ, 1998). El fruto es utilizado en la fabricación casera de mermeladas, jarabes, postres y licores; su uso en la actualidad es en pequeña escala y su consumo es local. Se ha estimado de alto interés estudiar esta especie, para buscar a futuro su posible industrialización; aprovechando su adaptación natural

a los suelos pobres del sector costero, pudiendo ser una alternativa de producción en terrenos no cultivables (ALEA y RAMIREZ, 1993).

2.1.6 Patógenos asociados a la murta. Con respecto al estado fitosanitario de esta especie nativa de la zona sur, esta se ve afectada por un número reducido de patógenos los cuales presentan una baja incidencia. Uno de los patógenos detectados es el hongo, *Mycosphaerella sp.*, el cual ataca el follaje, produciendo manchas necróticas en estas y desarrollando cuerpos fructíferos sobre ellas (ANDRADE et al., 1984). También se ha observado necrosis y caída de brotes con diferentes grados de severidad dependiendo del ecotipo de murta que se vea afectado, lo que corresponde a ataques de *Botrytis spp.*¹

Otra enfermedad presente siempre en la murta corresponde a la denominada escoba de bruja, por los síntomas que provoca, la que en algunos lugares de Valdivia alcanza niveles elevados. Esta enfermedad provoca una fuerte reducción de brotes; las hojas se empequeñecen y aprietan adquiriendo una coloración rojiza a amarillenta, no permitiendo el desarrollo de frutos y cuando lo hacen presentan mal sabor y generalmente son de menor tamaño (VILLAGRA, 2001)(Anexo 2). NOVOA (1982), señala que esta enfermedad corresponde a una de las más comunes en murta y la más destructiva, afectando también ramillas las que se tornan quebradizas y el vástago termina completamente dañado por la acción mecánica del viento. Este mismo autor señala en referencia al posible agente causal de esta enfermedad que podría tratarse de un virus, debido a la ausencia de insectos o de hongos patógenos en el material enfermo analizado en el Instituto de Defensa Forestal.

¹ANDRADE, N. (1999). Ing. Agr., M. Sc. Fitopatólogo. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

Sin embargo, VILLAGRA (2001), logró identificar al agente causal de esta enfermedad, mediante microscopía electrónica de transmisión, tinción DAPI y un Nested-PCR; correspondiendo este a un fitoplasma, el cual está siendo secuenciado para poder conocer a qué grupo taxonómico corresponde¹. Estudios de CAMELE *et al.* (1999), señala que la enfermedad escoba de bruja que afecta a las plantas de la familia Myrtaceae en Italia es producto de fitoplasmas. Las especies de esta familia en que se ha descrito el ataque de esta enfermedad son los eucaliptos (*Eucalyptus spp.*) y el mirto (*Myrtus comunis* L.).

2.1.7 Característica de la escoba de bruja. La enfermedad es generalmente sistémica. Al principio la escoba, compuesta por varias proliferaciones, las que aparecen en algunas ramas, cuando la enfermedad avanza va invadiendo la planta por todas partes. Las proliferaciones axilares son más pequeñas, delgadas y quebradizas, de un color verde amarillento. Las hojas que nacen de los brotes enfermos son pequeñas, delgadas, a veces deformadas y también de un color verde amarillento. Las flores, que rara vez se desarrollan, muestran diferentes grados de distorsión y virescencia las cuales en su gran mayoría muestran esterilidad (DOI y ASUYAMA, 1981). Una vez en el floema de la planta, los fitoplasmas inducen la formación de pequeñas cantidades de polisacáridos que evitan la circulación de la savia, y en consecuencia la de los nutrientes, fitohormonas y enzimas, lo que trae como consecuencia una proliferación excesiva de brotes en un sólo punto formando pequeñas escobas o ramilletes y que le da el nombre de “escoba de bruja” a la enfermedad (AMERICAN PHYTOPHATOLOGICAL SOCIETY, 1998). Las pérdidas causadas por esta enfermedad son importantes, según sea la magnitud de la infección existente (GARCIA De La ROSA, 1995).

¹ ANDRADE, N. (2000). Ing. Agr., M. Sc. Fitopatólogo. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

2.2 Fitoplasmas.

Los fitoplasmas son pequeñas bacterias fitopatógenas, morfológicamente similares a los micoplasmas y rickettsias que afectan a los animales. Incluso muchos virus causan síntomas similares a los causados por los fitoplasmas (D'ARCY y NAULT, 1982).

Los fitoplasmas son organismos procarióticos, es decir, organismos que carecen de un núcleo organizado y limitado por una membrana, además son unicelulares y no tienen pared celular (AMERICAN PHYTOPHATOLOGICAL SOCIETY, 1998). Estos pertenecen a la clase de los Mollicutes la que tiene cuatro órdenes. El orden Mycoplasmatales con una familia; Mycoplasmataceae, compuesta por dos géneros; *Micoplasmas* (afecta a humanos y animales) y *Ureaplasma* (también afecta a humanos y animales). El orden Entomoplasmatales con dos familias, Entomoplasmataceae, compuesta a su vez por dos géneros, *Entomoplasma* (afecta a plantas e insectos) y *Mesoplasma* (también afecta a plantas e insectos) y por la familia Spiroplasmataceae, compuesta por un género; *Spiroplasma* (filamentos helicoidales que afectan plantas e insectos): El orden Acholeplasmatales está representado por una familia, con el género *Acholeplasma* (afecta animales y algunas plantas e insectos). Y por último se encuentra el orden Anaeroplasmatales, compuesto por una familia, Anaeroplasmataceae, que a su vez está compuesta por dos géneros, *Anaeroplasma* (afecta el rumen de bovinos y ovinos) y *Asteroplasma* (también afecta el rumen de bovinos y ovinos) (WHITCOMB et al., 1999).

Estos son microorganismos específicos en su ubicación, encontrándose dentro de los tejidos de las plantas, también se hallan en las raíces, pero principalmente se encuentran limitados al floema. Los fitoplasmas, sólo pueden sobrevivir y reproducirse en el tejido de la planta viva y no pueden aislarse ni cultivarse usando los métodos convencionales de laboratorio. Esta

característica hace difícil determinar su presencia e identificación. La microscopía electrónica ha sido útil en este aspecto (LEE y GRAU, 1999). Se distinguen claramente tres características de los fitoplasmas que dificultan los intentos de su purificación, caracterización taxonómica y diagnóstico. Estas son; la ausencia de pared celular, su imposibilidad de ser cultivados *in vitro* y por último su baja concentración al interior de la planta (DAVIS, 1999). Existen evidencias experimentales de posibles cultivos de fitoplasmas, pero ninguno repetible a otros grupos; en forma artificial a través de cultivo no es posible cultivarlos (MARZACHI *et al.*, 1998).

Existen otras formas para mantenerlos, una de estas alternativas corresponde al cultivo de tejidos de plantas, a través de transmisiones repetitivas por parte del vector conservando estos bajo frío, pero todos estos métodos tienen sus limitaciones (LEE y GRAU, 1999). Otro métodos ya probados exitosamente de conservación, corresponden al cultivo de plantas *in vitro*, a través de transmisiones vía inyección e injertación desde plantas enfermas (MARTINEZ, 2002).

2.2.1 Fitoplasmas como agentes patógenos. Los fitoplasmas son reconocidos actualmente como agentes causales de enfermedades en más de 600 especies vegetales; algunas de ellas de gran importancia económica como por ejemplo: olmo (*Ulmus spp.*); palmera (*Coco nucifera* L.); tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.); paraíso (*Melia azedarch* L.); camote (*Ipomoea batata* L.); ajo (*Allium sativum* L.); duraznero (*Prunus persicae* (L.) Mill.); maíz (*Zea maíz* L.); cebolla (*Allium cepa* L.) y otras (LEE y GRAU, 1999). También se ha reportado escoba de bruja en lima ácida (*Citrus aurantifolia* Swingle), uno de los cultivos más importantes en India (GOSHH *et al.*, 1999)

Los síntomas de las enfermedades causadas por los fitoplasmas incluyen crecimiento achaparrado, clorosis, enrojecimiento de hojas, enrollamiento de éstas, baja en el número de tubérculos subterráneos producidos y producción de tubérculos aéreos. Algunas plantas exhiben los síntomas de escoba de brujas, es decir, la proliferación de muchos retoños pequeños y hojas (DAVIS, 1999).

En el caso de algunas enfermedades tales como la del decaimiento del peral (*Pyrus comunis* L.), se desconocía si la distinta expresión de síntomas observada era debida a la variabilidad genética del fitoplasma o a una respuesta varietal (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA, 2001).

Lo que ha llevado a los científicos a creer que un fitoplasma es el causante de una enfermedad específica es la asociación de tejidos enfermos con estos microorganismos (LEE et al., 1997). Por ejemplo, se ha propuesto que los fitoplasmas causan enfermedades como; clorosis, filodia, “aster yellows” (AYP) y “escoba de bruja”, provocando un desequilibrio en el volumen hormonal dentro de la planta. Debido a que las hormonas son muy difíciles de medir en las plantas ya que se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas esta teoría todavía no ha sido probada (COUSIN et al., 2000).

2.2.2 Métodos de identificación de fitoplasmas y de sus vectores. La identificación taxonómica de estos organismos, se desarrolla actualmente en reglas generales por relaciones serológicas, sondas de hibridación molecular, análisis de los patrones de restricción de los fragmentos amplificados por PCR y niveles de homología entre genes ribosómicos (DAVIS, 1999; BERGES et al., 2000, y BERTACCINI, 2000). La detección de estos microorganismos no cultivables se realizaba comúnmente a través de microscopía electrónica o de métodos indirectos usando distintas tinciones como por ejemplo la de Giemsa y Dienes. Recientemente se está utilizando la tinción DAPI para la detección de

estos patógenos al interior de plantas. Los fitoplasmas están asociados a muchas enfermedades y a muchas plantas, sin embargo estos métodos recién descritos no permiten la diferenciación y clasificación de estos organismos (SUNIL y BALASUNDARAN, 2002).

Métodos de identificación como la tinción DAPI, señalada por Sinclair (1989), citado por LEE (1999), corresponde a un método de identificación preliminar. Semuller (1976), citado por INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS-ESPAÑA (2000), señala que la necesidad de una técnica simple y rápida para detectar la presencia de fitoplasmas en plantas enfermas llevó a utilizar técnicas histoquímicas de tinción como el colorante Dienes y el fluorocromo DAPI (4'-6 diamidino 2-fenilindol). Este último se une al ADN, preferentemente rico en AT, formando un complejo que presenta fuerte fluorescencia en las células del floema, en forma de puntos o masa fluorescentes, generalmente pegados a la pared. Con el colorantes Dienes se tiñe las células del xilema de color azul turquesa brillante y las células de la corteza con un color azul púrpura, quedando la zona correspondiente al floema incolora de manera que se pueden observar los fitoplasmas en tono azulado, debido a una reacción de oxido-reducción (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA, 2000, y BERGES *et al.*, 2000).

Ko y Lin (1994), citado por INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (2000) indican que gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales y de sondas ADN se abrió un nuevo camino para detectar e identificar a los fitoplasmas desde las diferentes plantas huésped, usando técnicas debidamente probadas como ELISA y “dot-blot”. Una vez que se poseen estos conocimientos previos se está en condiciones de intentar desarrollar sistemas que permitan el diagnóstico específico de un determinado fitoplasma y realizar estudios epidemiológicos

para evaluar su importancia en la producción (LEE *et al.*, 1997). Hasta el momento han sido identificados 14 grupos de fitoplasmas mediante el uso de 16rDNA y RFLP (MARZACHI *et al.*, 1998; DAVIS, 1999, y BERGES *et al.*, 2000).

Los grupos y sistemas de clasificación en los fitoplasmas se basan directamente en los análisis de las secuencias de estos microorganismos o indirectamente mediante análisis de RFLP (polimorfismo de fragmentos de restricción), análisis de PCR amplificando genes ribosomales como el 16S rDNA (KAWAKITA *et al.*, 2000, y BERGES *et al.*, 2000). El gen 16S rDNA es un carácter universal el cual provee valiosa información filogenética y taxonómica de Mollicutes cultivables y de otros procariontes. Estudios de homología de ADN en codones de genes ribosomales altamente conservados y de proteínas ribosomales, han mostrado que los fitoplasmas contienen un juego distinto al de otros procariontes (SUNIL y BALASUNDARAN, 2002).

Estudios recientes sugieren y comprueban la utilidad del PCR (reacción de la polimerasa en cadena), como herramienta para el diagnóstico de fitoplasmas fitopatógenos. NAMBA *et al.* (1993), reportan que los genes 16S rDNA de los fitoplasmas son amplificados vía PCR usando partidores específicos para estos microorganismos. El interés del uso del PCR en el diagnóstico de enfermedades causadas por fitoplasmas está aún más justificada por el hecho de que mediante esta técnica, se han detectado fitoplasmas en árboles y/o plantas que no presentan síntomas, con lo que la extensión de las enfermedades puede ser mucho mayor de lo que se ha considerado tradicionalmente (HORMAZA *et al.*, 1999). Las bajas concentraciones y la desigual distribución de los fitoplasmas en plantas hospederas y en insectos vectores, han sido obstáculos para obtener diagnósticos certeros de enfermedades de plantas causadas por fitoplasmas.

Los ensayos de PCR han logrado mayor sensibilidad para la detección de fitoplasmas (LEE, 1999; BERTACCINI, 2000).

Debido a que el cultivo de fitoplasmas en células libres ha fallado, se han desarrollado recientemente para su identificación, métodos moleculares basados en anticuerpo mono y policlonales, pruebas de ADN y en casos de fitoplasmas específicos se utiliza la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), usando principalmente partidores de tipo ribosomal (LEE et al., 1998, MARZACHI et al., 1998). Por medio de anticuerpos policlonales han sido localizados fitoplasmas por hibridaciones *in situ* en plantas y principalmente en insectos. Las técnicas de ácidos nucleicos proporcionan un potencial amplio y rápido, junto con una detección específica de estos microorganismos (WEBB et al., 1999).

Recientemente WANG y HIRUKI (2001), utilizaron para la identificación y determinación de fitoplasmas el uso del análisis Heteroduplex Mobility, el cual presenta una gran sensibilidad como técnica de diagnóstico. GREEN et al. (1999) indican también que los fitoplasmas pueden ser diagnosticados por bioensayos leñosos como la remisión de síntomas con aplicaciones de bactericidas, sin embargo, todos los métodos anteriormente descritos presentan una sensibilidad limitada y no están disponibles para gran cantidad de muestras.

Los ensayos tradicionales como los bioensayos usados para la identificación del aster yellow, requieren de mucho tiempo (3-4 semanas), además de una gran cantidad de material y manejo excesivo de los insectos. La reacción de la polimerasa en cadena (PCR), es un ensayo sensible y rápido para la determinación y detección del AYP (aster yellow) en cicadelidos y plantas (ZHANG et al., 1999). La reacción de la polimerasa en cadena como

medio de detección ha sido desarrollado para aster yellows y otros fitoplasmas en insectos y plantas (MURRAL et al., 1996).

En años recientes Alma et al. (1997), citado por KAWAKITA et al. (2000), utilizaron la técnica de Nested-PCR para detectar fitoplasmas en huevos y ninfas de *Scaphoideus titanus*. Se utilizó también Microscopia electrónica (EM), debido a que los fitoplasmas son fácilmente visibles en los intestinos, hemolinfa y glándulas salivales. Sin embargo, esta prueba constituye sólo una determinación inicial.

2.3 Vectores de fitoplasmas.

Los fitoplasmas son un gran grupo de parásitos intracelulares obligados pertenecientes a la clase Mollicutes los que tienen como vectores aquellos insectos que se alimentan del floema tales como los cicadelidos, membracidos y psillidos al interior de los cuales se multiplican (WEBB et al., 1999). Los fitoplasmas dependen completamente de un agente vivo para su existencia, es decir, son parásitos obligados, que viven en el floema de las plantas. Para que el fitoplasma se pueda dispersar o “moverse” de un área a otra, es necesaria la existencia de un vector que lo traslade. Generalmente este traslado del fitoplasma coincide con la migración anual de su vector. Los fitoplasmas se reproducen al interior de las glándulas salivales del insecto vector, esto ocurre antes que la planta sea infectada, es decir, antes que el insecto vector se alimente del floema de la planta (PURCELL, 1985, y WEINTRAUB, 2000).

Los artrópodos en general y en especial los insectos son el medio más importante de transmisión de enfermedades; pero también el más complejo y extensamente distribuido alrededor del mundo, junto con ser el mecanismo menos conocido, constituyendo un campo de estudio de interés (HARRIS y MARAMOROSCH, 1980). Los insectos vectores son el medio más importante de propagación de virus, fitoplasmas y rickettsias en la naturaleza. Hongos,

ácaros y nemátodos sirven como vectores en algunos casos, pero principalmente lo constituyen insectos (NAULT, 1997).

2.3.1 Fitoplasma-Vector. Insectos y plantas, son hospederos naturales de fitoplasmas. Sin embargo, su relación es muy compleja y existen un sinnúmero de factores interrelacionados en esta relación (PURCELL, 1985, y WEINTRAUB, 2000).

Basándose en los estudios de conducta de transmisión en las décadas pasadas y las precisas identificaciones de los fitoplasmas mediante métodos moleculares, han permitido conocer que muchos vectores pueden transmitir más de un tipo de fitoplasmas y en más de una especie de planta pueden existir dos o más fitoplasmas distintos (BOSCO *et al.*, 1997, y LEE *et al.*, 1998). Por lo tanto resulta inconveniente e inconsistente dar una determinada identidad a un fitoplasma sólo por el tipo de síntomas que estos inducen en plantas susceptibles, debido a que síntomas similares pueden ser inducidos por varios tipos distintos de fitoplasmas (LEE *et al.*, 1998, y INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA, 2001).

Sin embargo, resulta importantísimo analizar la relación entre la detección del fitoplasma y la expresión de síntomas, ya que la detección del fitoplasma en plantas asintomáticas es esencial en los proceso de propagación vegetativa y de certificación del material vegetal obtenido (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL), 2001).

Dependiendo del fitoplasma será el número de vectores que posea y su especificidad. Por ejemplo el aster yellows de California (16 Sri-B), es transmitido por 24 especies de cicadelidos, mientras que la escoba de bruja del

camote (16 Srii-A), es transmitido por uno o por muy pocos vectores (Cuadro 1). Experimentalmente, cada especie de planta es potencialmente un hospedero más para un tipo de fitoplasma (LEE *et al.*, 1998).

Se ha comprobado que en la relación fitoplasma-vector, existe un grado de especificidad, ya que algunos sólo se alimentan de una especie de planta en particular. Sin embargo cabe señalar que hay insectos que tienen a menudo un rango de hospederos amplio alimentándose de plantas silvestres infectadas con fitoplasmas y de otras plantas cultivadas, transmitiendo así el patógeno y la enfermedad a plantas sanas (BOSCO *et al.*, 1997, y LEE y GRAU, 1999).

Los insectos como vectores desempeñan una función importante. Dos de los factores más importantes y que determinan si una especie de planta puede ser infectada por uno o varios fitoplasmas son: la distribución geográfica de los vectores, y la distribución geográfica de los hospederos potenciales de cada vector (Figura 2) (LEE *et al.*, 1998).

Ahora, al responder la pregunta ¿Por qué es particularmente abundante la enfermedad en una región, rara en otras y no existe en otras?. Podemos explicarlo por motivos como la distribución geográfica de los vectores, influencias climáticas sobre la sobrevivencia del patógeno y del desarrollo de la enfermedad, la disponibilidad y fuentes del patógeno como inóculo para plantas, etc. (PURCELL, 1985). En viñedos de Australia, se ha observado una disipación en los últimos años del fitoplasma conocido como *Phytoplasma australiense*, disminución que se explica según la THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES (2002), por los cambios ambientales los que han sido drásticos y por ello se ha visto afectada la dispersión de este patógeno.

En el caso del decaimiento del peral y su posible vector(es), sólo dos especies del género *Cacopsylla* habían sido identificadas como vectores de la

enfermedad *C. pyricola* y *C. pyrisuga*. Sin embargo, los estudios epidemiológicos y análisis moleculares indicaron que el vector más importante en España y en Italia es *C. pyri.*, que además es la especie más abundante dentro de todo el mediterráneo, existiendo muy pocos individuos de las dos especies anteriormente señaladas (BOSCO *et al.*, 1997, y INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL), 2001).

Dentro de la interacción fitoplasma-vector, también entra a jugar un rol importante la planta huésped, existiendo por lo tanto una relación triangular entre el fitoplasma, el vector y la planta huésped. Las preferencias del vector influirán sobre el promedio de vectores que existan en una planta, sin embargo, también se podría explicar por una menor atracción del cultivar al vector lo que reduciría la propagación de la enfermedad, debido a que existiría una tasa de alimentación menor por parte del vector y como consecuencia una menor propagación del inoculo (PURCELL, 1985; BOSCO *et al.*, 1997, y INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL), 2000). Sin embargo, muchas enfermedades hacen más atractivo un cultivar para los insectos vectores como en el caso del aster yellows (PURCELL, 1985).

Otro factor que influye en esta relación triangular fitoplasma-vector-planta, es la resistencia a la infección y la tolerancia a la enfermedad, y finalmente está la edad de la planta, pues es un rasgo de la susceptibilidad a la infección. Generalmente plantas jóvenes con tejidos jóvenes y nuevos son más susceptibles. El cambio de susceptibilidad con la edad sugiere una resistencia inherente a la infección del patógeno, sin embargo, las tasas y efectos en la preferencia alimenticia del vector son básicamente los responsables (PURCELL, 1985).

Las relaciones entre fitoplasmas e insectos son complejas. Los fitoplasmas habitan al interior de los insectos y son parásitos intracelulares, los que son transmitidos a las plantas una vez que se han acumulado al interior en las células de las glándulas salivales. Los fitoplasmas se pueden hallar también al interior de células especializadas del intestino, hemolinfa y tubos de Malphigi (WEBB *et al.*, 1999).

El ciclo de vida del fitoplasma al interior de los insectos vectores es el siguiente; los fitoplasmas residen en los tubos del floema y de allí son ingeridos por los insectos, estos se multiplican primero en las células intestinales, de allí pasan a la hemolinfa e infectan varios órganos internos tales como glándulas salivales, ganglios torácicos y grasa corporal. Muchos tipos de fitoplasmas no infectan los órganos genitales, por lo tanto estos no tendrían una transmisión vertical a la próxima generación del insecto vector (KAWAKITA *et al.*, 2000). Según WEBB *et al.* (1999), el fitoplasma luego de infectar el insecto y sus órganos internos, este se localiza en las células de las glándulas salivales donde prosigue su multiplicación. Esta relación fitoplasma-vector es específica, debido a que los fitoplasmas deben colonizar las células de tipo acinar de las glándulas salivales de los cicadelidos. Muchos fitoplasmas quizás sean capaces de pasar al interior de la hemolinfa del insecto, pero no puedan penetrar en las células salivales específicas (de tipo acinar), debido a la alta especificidad de esta relación fitoplasma-vector y como consecuencia el fitoplasma no se podrá multiplicar y su hospedero terminara muriendo.

2.3.2 Homoptera: El grupo más importante de vectores. Estos insectos son los vectores más importantes de diversos patógenos que afectan a las plantas, incluso fitoplasmas. Su ciclo de vida se caracteriza por su metamorfosis paurometabola, la que presenta ninfas y adultos que se alimentan de la misma planta (WEINTRAUB, 2000). El comportamiento de alimentación similar entre los estados ninfales y etapas adultas en los homópteros, explican en gran parte

su éxito como vectores; a diferencia de los insectos holometabolos (D'ARCY y NAULT, 1982). Su aparato bucal picador-chupador que penetra los tejidos de la planta, le permite alcanzar tejidos específicos (normalmente floema), y a su vez causan un daño mínimo en las plantas (COUSIN et al., 2000).

Se han identificado más de 100 especies de insectos que transmiten fitoplasmas, entre ellos tenemos al orden Homoptera el cual presenta el mayor número de insectos vectores (WEINTRAUB, 2000). Los homópteros son considerados los vectores más importantes dentro del grupo de los insectos fitófagos (NAULT, 1997). De todo el conjunto de especies descritas como vectores potenciales de agentes patógenos que afectan a las plantas, la mayor parte de estas se caracterizan por ser especies de hábito fitófagos. Cabe señalar que existen insectos con aparato bucal de tipo masticador que son fitófagos, pero que no son tan selectivos como los Homoptera y Hemiptera, quienes tienen gran selectividad al alimentarse del mesófilo, xilema y floema, haciendo de estos, los vectores ideales de patógenos que residen en los tejidos de las plantas (D'ARCY y NAULT, 1982).

Datos de la literatura indican que en el grupo de los homópteros los vectores no están distribuidos uniformemente entre las familias. De acuerdo a estos antecedentes dentro del suborden Auchenorrhyncha; los cicadelidos y membracidos emergen como los vectores dominantes (D'ARCY, y NAULT, 1982). Los cicadelidos, comprenden el segundo gran grupo de vectores de virus y fitoplasmas en plantas incluso sobrepasando a los áfidos en el número de especies transmisoras de patógenos (HARRIS y MARAMOROSCH, 1980). Datos de la literatura indican que los fitoplasmas son transmitidos por más de 100 especies de insectos, incluyendo a cicadelidos, membracidos y psyllidos, siendo estos los vectores más comunes de fitoplasmas (WEINTRAUB, 2000).

CUADRO 1. Vectores de fitoplasmas asociados con varias enfermedades.

Vector	Hábito alimenticio	Distribución geográfica	Fitoplasma transmitido en la naturaleza
<i>Macrosteles fascifrons</i>	Polífago	América del norte, Europa	Aster yellows, filodia , enanismo, y otros.
<i>Macrosteles striifrons</i>	Polífago	Japón	Amarillamiento en tomates, amarillamiento en margarita y otros
<i>Hishimonoides sellatiformis</i>	Oligofago ?	Japón	Enanismo de la mora
<i>Scaphoideus luteolus</i>	Monófago ?	América del Norte	Amarillamiento del olmo americano
<i>Cacopsylla pyri, C. pyricola</i>	Monófago ?	Europa	Decaimiento del peral

FUENTE: Adaptado de LEE et al. (1998).

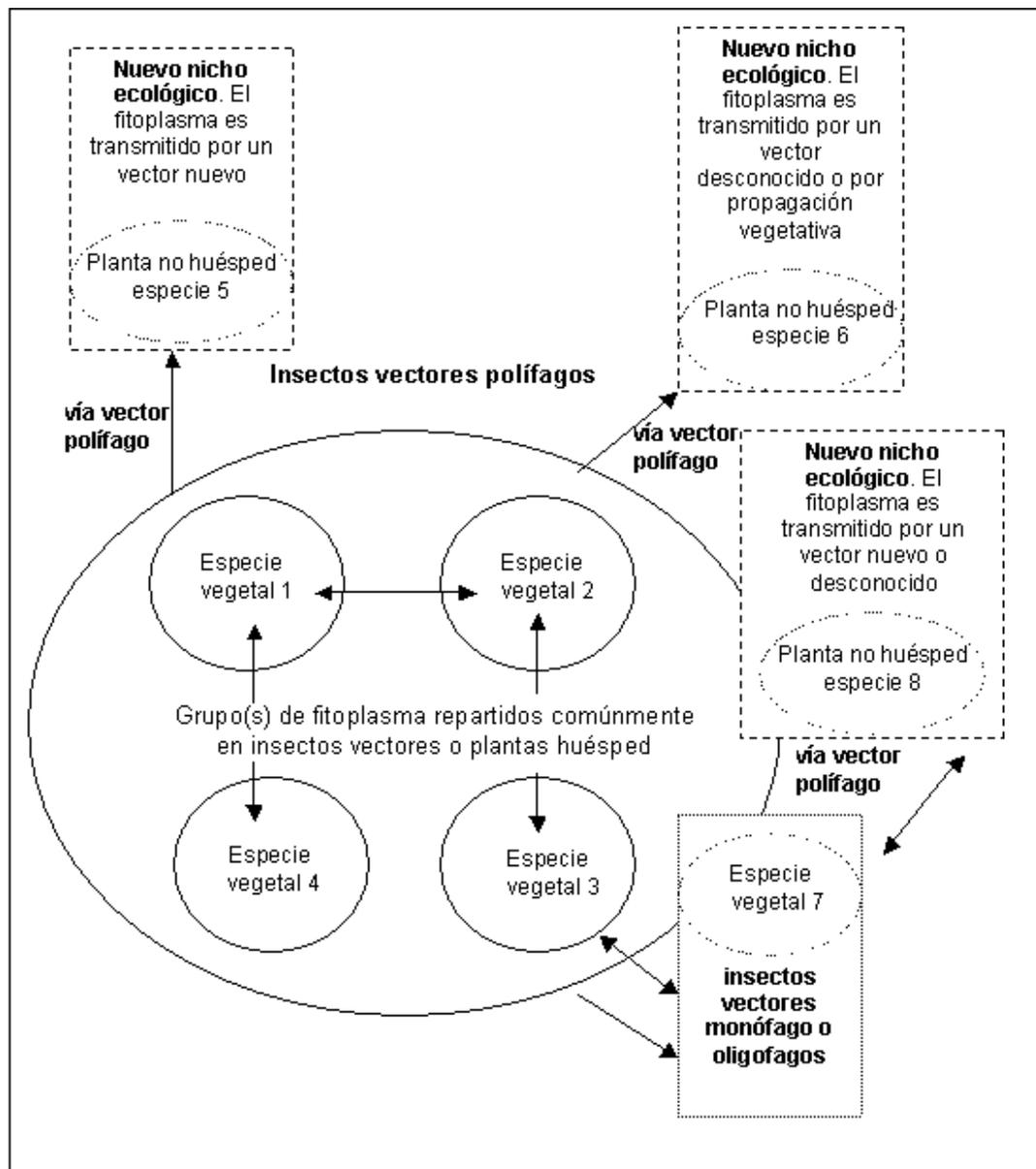


FIGURA 2. Modelo de la evolución de los fitoplasmas en el que se describe una tolerancia ecológica a nuevas ecoespecies emergentes.

FUENTE: LEE *et al.* (1998).

2.4 Modelos de transmisión.

La transmisión de parásitos ocurre a través de un número variado de rutas las cuales se agrupan en dos categorías: Transmisión horizontal y transmisión vertical. La transmisión horizontal puede ocurrir y estar o no relacionada con el hospedero o con sus diferentes generaciones, con parásitos transmitidos *per os*, venereamente y por invasión directa a través del epitelio del hospedero. La transmisión vertical pasa de una generación a otra del hospedero, y tiene lugar entre la descendencia del hospedero. Esta transmisión ha sido reportada en diversos parásitos incluidos virus, bacterias, protistas y helmintos. La transmisión transovarial es la ruta más importante de la transmisión vertical de parásitos de invertebrados (BERTACCINI, 2000, y DUNN et al., 2001).

Dentro de los modelos de transmisión existentes, se distinguen claramente cuatro tipos; no persistente; semipersistente; persistente-circulativo y persistente-propagativo. Cada uno de estos modelos se diferencia en el tiempo de adquisición, inoculación (transmisión) y período de latencia en el vector (MADDEN et al., 2000).

2.4.1 Modelos de transmisión asociados a fitoplasmas. El tipo de transmisión que caracterice a un determinado fitopatógeno obligado, está íntimamente ligado a sus características propias de reproducción, multiplicación y sobrevivencia. Sumado a esto están las características propias de su vector, como por ejemplo, su hábito alimenticio, tipo de reproducción, migración, etc. Todo esto, permite que se genere una interrelación fuerte entre el fitopatógeno obligado y su vector, la que dará como origen el tipo de transmisión característica a este patógeno obligado (CARRARO et al. 1994; NAULT, 1997, WEBB et al., 1999, y MADDEN et al., 2000).

2.4.1.1 Transmisión persistente-circulativa. Mosquitas blancas y algunos cicadelidos son los principales grupos de vectores que transmiten fitoplasmas en forma persistente-circulativa. Estos adquieren el fitoplasma al alimentarse del floema, correspondiendo estos insectos principalmente a especies que colonizan plantas hospederas de fitoplasmas (NAULT, 1997).

El tiempo de retención va desde días a semanas y su período de latencia es de un par de horas, días o semanas, al igual que los fitoplasmas persistentes-propagativos (Cuadro 2), (MADDEN *et al.*, 2000). Los fitoplasmas son adquiridos desde el floema de la planta, pasan al interior del canal alimenticio del estilete, cuando ocurre succión, pasan al esófago y finalmente son vaciados al intestino; del intestino a través de sus paredes delgadas pasan al hemocele y de allí a la hemolinfa de donde regresa a la glándula salivar y es incorporado a la saliva (NAULT, 1997).

2.4.1.2 Transmisión persistente-propagativa. La forma persistente-propagativa es característica de los homópteros pertenecientes al suborden Auchenorrhyncha, que son principalmente vectores de fitoplasmas (NAULT, 1997).

En el caso de los fitoplasmas que presentan este tipo de transmisión, el período latente es similar al modelo persistente-circulativos, pero difieren en el período de retención (latencia más período de infección), ya que este va para el caso de los fitoplasmas desde semanas a meses (MADDEN *et al.*, 2000). La literatura señala que la principal diferencia entre la transmisión circulativa y propagativa se refiere a la presencia o ausencia de multiplicación del patógeno dentro del vector, la que ocurre sólo para el modelo propagativo. Además se habla de diferencias de tipo evolutivas entre ambos modelos. Otra diferencia guarda relación con el origen del fitoplasma, en el caso de los patógenos circulativos, éstos tienen su origen en plantas originadas de semilla infectada y

subsecuentemente son adquiridas por el vector. Los fitopatógenos, de tipo propagativo, tales como la mayoría de los fitoplasmas tienen su origen en los insectos y secundariamente se adaptan a las plantas. Ahora estos fitopatógenos son transmitidos de forma más eficiente por sus vectores cuando son adquiridos desde la planta como ninfas que como adultos (NAULT, 1997).

2.4.1.3 Transmisión transovarial. Los mecanismos involucrados en este tipo de transmisión y que envuelven el movimiento de los parásitos al interior del hospedero son limitados. Por ejemplo en el caso de *Hischinomoides sellatiformis* vector del MD fitoplasma, se puede distinguir la presencia del fitoplasma en sus órganos genitales y huevos, por lo que estos resultados según Mckeney et al. (1981), citado por KAWAKITA et al. (2000), permitirían concluir que es frecuente y fácil la obtención de Md fitoplasma desde los ovarios y receptáculos seminales, utilizando para ello EM y PCR. Recientemente Marcone et al. (1999), citado por KAWAKITA et al. (2000), estimó el largo de los cromosomas de 71 razas de fitoplasmas y encontró una variación considerable en el tamaño del genoma desde 660 a 1.130 kb, los que se observaron en el grupo AYP. Esta variación en el tamaño del genoma en este grupo indica que existen cantidades de material genómico que tienen que haberse perdido en su evolución.

Estos resultados sugieren que en este grupo de fitoplasma hay distintos fenotipos, incluidos aquellos que sobreviven en los órganos genitales y sucesivamente poseen transmisión transovarial en cicadelidos. Esta hipótesis es sólo para algunos fitoplasmas (con un material genómico específico) y también es limitado a algunas especies de cicadelidos, como los que maduran en su hospedero parasitado. La transmisión transovarial de fitopatógenos a la prole de insectos ocurre sólo en hembras infectadas de cicadelidos y fulgoridos, los machos no transmiten estos patógenos a su descendencia (Figura 3), (DUNN et al., 2000, y BERTACCINI, 2000).

CUADRO 2. Características de transmisión asociadas con fitoplasmas fitopatógenos.

Característica del tipo de transmisión	Persistente-Circulativa	Persistente-Propagativa
Tiempo de adquisición	Horas, días	Horas, días
Tiempo de retención	Días, semanas	Semanas, meses
Traslado al interior	Sí	Sí
Patógeno en la hemolinfa del vector	Sí	Sí
Período de latencia	Horas, días	Semanas
Multiplicación del patógeno en el vector	No	Sí
Transmisión vertical	No	A veces

FUENTE: Adaptado de NAULT (1997).

2.4.1.4 Transmisión mixta. Algunos microorganismos tales como *Microsporidia* exhiben ambos tipos de transmisión horizontal y vertical; estas estrategias son empleadas por estos parásitos que dependen de la ecología de su hospedero y de la oportunidad de transmisión y dispersión. La transmisión transovarial puede ocurrir a través de generaciones sucesivas de hospederos o ellos pueden ser obligados a alternar entre la transmisión transovarial y ciclos de transmisión horizontal. La transmisión transovarial les permite mantenerse cuando la densidad del hospedero es baja y las condiciones del medio son

desfavorables, también esta les permite aumentar su rango de dispersión a nuevos hábitat (Figura 4), (DUNN *et al.*, 2000).

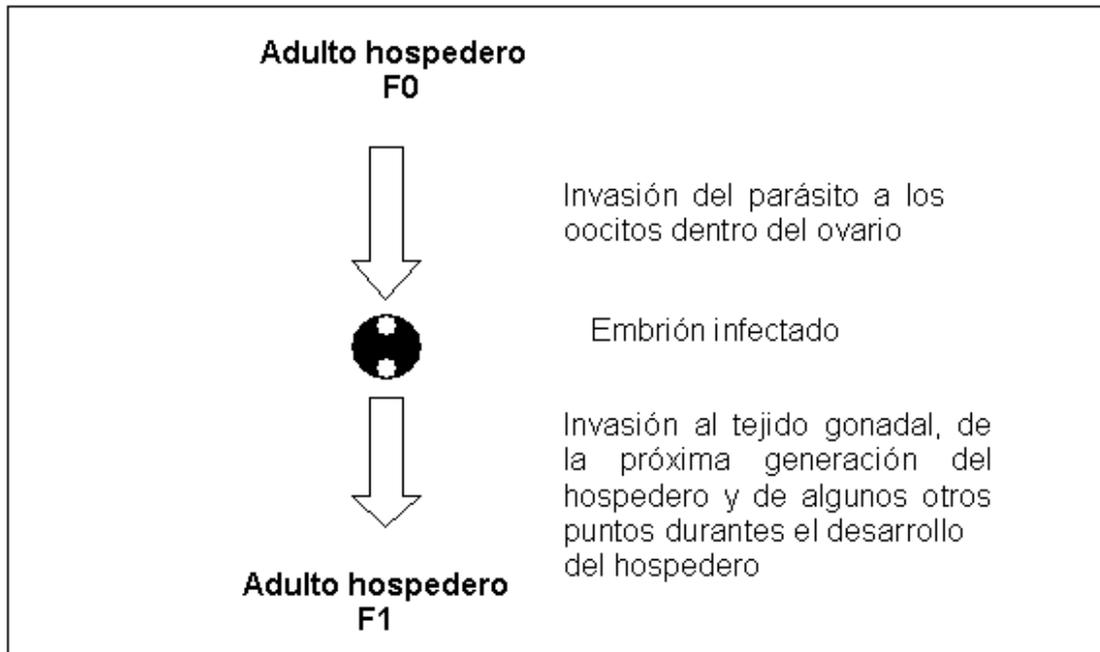


FIGURA 3. Diagrama de representación de transmisión transovarial.

FUENTE: DUNN *et al.* (2000).

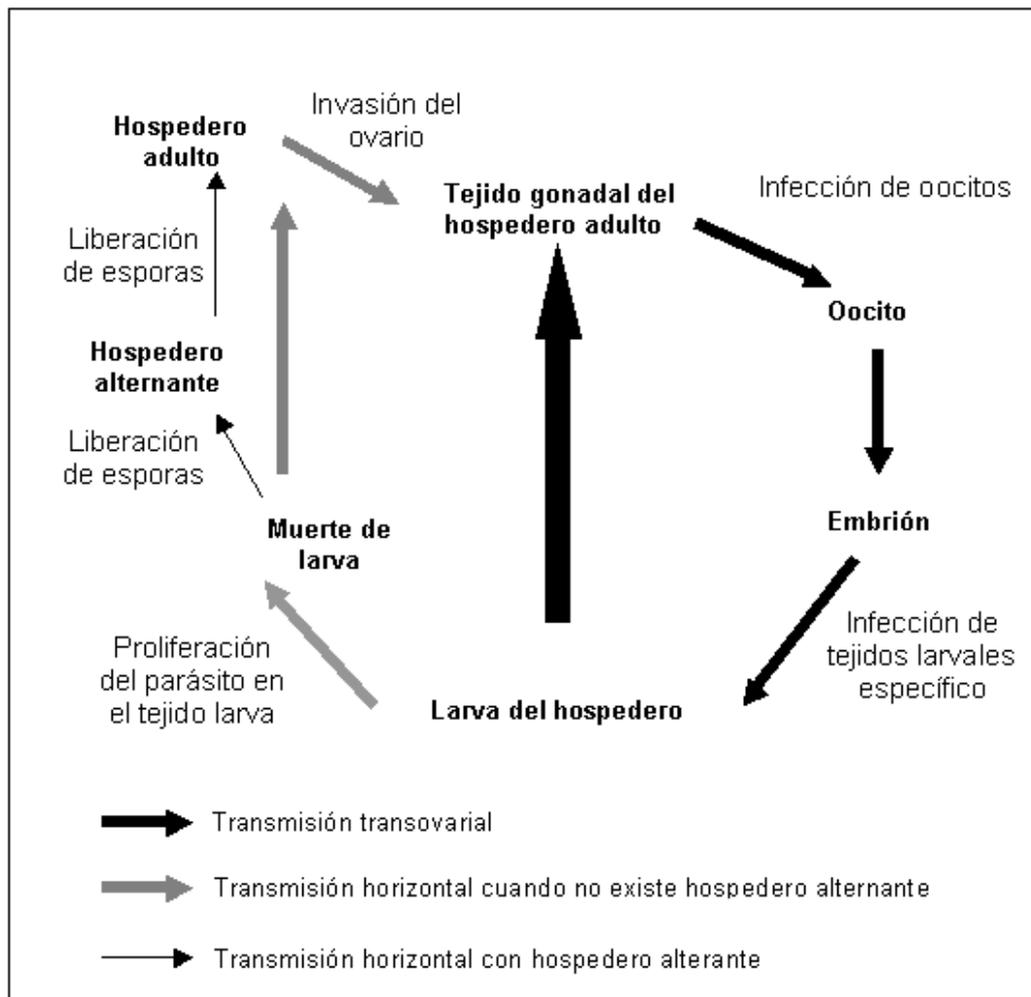


FIGURA 4. Diagrama representativo de transmisión mixta.

FUENTE: DUNN *et al.* (2000).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Materiales.

A continuación se describen los materiales usados en este estudio.

3.1.1 Material vegetal. Se utilizaron plantas de murta *in vitro* obtenidas a través de cultivo de meristemas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile en Valdivia.

3.1.2 Insectos. Se emplearon insectos adultos del suborden Auchenorrhyncha que fueron colectados durante las dos épocas de monitoreo en la zona de estudio establecida.

3.1.3 Material de laboratorio.

- Material de vidrio y de plástico, pipetas, micropipetas, espátula, morteros, pinzas, tijeras, guantes, etc.
- Ultramicrotomo automático, LKB; con cuchillo diamante
- Microscopio óptico (x1000) y lupa (x40), Zeiss
- Cámara digital modelo Hitachi
- Microcentrífuga refrigerada modelo 5417R. Eppendorf de rango -9 a 40°C
- Termociclador MiniCycler modelo PTC-150, MJ Research, Inc. De rango -9 a 105°C
- Equipo de electroforesis (cámara y fuente de energía)
- Espectrofotómetro modelo UV-120-12, Shimadzu, capaz de medir a 660nm
- Balanza analítica modelo 180 A, precisa, de sensibilidad $\pm 0.0001g$
- Medidor de pH modelo 744, Metrohm
- Vortex Super Mixer modelo 1190, Labline
- Autoclave

- Horno de secado Memmert, tipo U 25 N° 831-574, de rango 1 a 220°C y precisión 1°C
- Máquina de hielo molido modelo AF-30, Scotsman
- Refrigerador (4°C), Fensa
- Freezer (-20°C), Cónsul
- Microondas, Samsung
- Cámara de luz ultravioleta (UV) (transiluminador y cámara digital modelo Science DC 120, Kodak)
- Baño termostático refrigerado por circulación de agua modelo D1-G, Haacke con rango de temperatura 0-85°C y precisión $\pm 0,2^\circ\text{C}$
- Reactivos y soluciones para la extracción de ADN vegetal y de insectos (Anexo 3)
- Reactivos y soluciones para realizar PCR (Anexo 5)
- Reactivos y soluciones para realizar inclusión y fijación de cortes histológicos (Anexo 6)
- Reactivos y soluciones para realizar hibridación *in situ* (Anexo 7)

3.2 Métodos.

A continuación se señala la metodología utilizada para desarrollar este estudio.

3.2.1 Selección y descripción del área de estudio. Considerando que en la literatura no existe información ni estudios experimentales de la ocurrencia de esta enfermedad, la época de mayor incidencia y si esta característica responde a algún tipo de evento cíclico, se ha debido considerar como hipótesis de trabajo que existe un nivel constante de la enfermedad cada año, para poder comenzar el análisis.

El sector camino a Curiñanco, ubicado en la Cordillera de la Costa de la provincia de Valdivia a unos 5,5 km del centro de la ciudad de Valdivia, donde se encuentran murtales con un alto nivel de infección con esta enfermedad. Este sector corresponde a un lugar no intervenido de tipo silvestre, el que cuenta con dos características que lo hicieron un buen lugar para el desarrollo del estudio; primero la presencia de pastizales ricos en gramíneas y poaceas (debido a la conocida asociación de cicadelidos y fulgoridos a estas especies vegetales), tanto en el lugar mismo como en las inmediaciones cercanas, presentando distintas especies de gramíneas, como chepica; *Agrostis capilaris* L., pasto dulce; *Holcus lanatus* L., pasto ovillo; *Dactylis glomerata* L., entre otras (Anexo 8). En segundo término la presencia de un bosque no intervenido en el sitio mismo con especies variadas de árboles, arbustos pequeños y matorrales (tales como coigüe; *Nothofagus dombeyi* Mirbel Blume, arrayán; *Luma apiculata* (DC.) Burret, luma; *Amomyrtus luma* Mbl., notro; *Embotrium coccineum* J.R. et Forster, canelo; *Drimys winteri* J.R. et G. Forster, rosa mosquito; *Rosa rubiginosa* L. y mora; *Rubus ulmifolius* Schott), y de un bosque en plena intervención cercano al lugar del estudio el que contaba como principal especie al pino insigne (*Pinus radiata* D.Don.) (Anexo 8). En el área de estudio existían sectores soleados y sombríos, con una pendiente moderada. Las plantas de murta que allí se encontraban presentaban un tamaño variable desde pequeñas a medianas (0,6 a 1,9 m de altura), las que se distribuían en un área aproximada de unos 250m² de superficie total (Anexo 9). Por todas las características antes mencionadas se eligió este, como el sector más apropiado para desarrollar la investigación destinada a la búsqueda y monitoreo de los posibles insectos vectores de esta enfermedad que afectan a la murta.

Por otra parte, no se conoce información acerca de las relaciones del posible vector con alguna especie de planta y con la misma murta. Estos pueden vivir dentro de este sector, en los bordes o fuera de este. Por lo tanto

los métodos de búsqueda y monitoreo se desarrollaron en todas las especies de murta presentes dentro del sector elegido para este trabajo.

3.2.2 Colecta del material. El período de trabajo correspondió a dos épocas, la primera se extendió desde el 19 de marzo del 2001 al 29 de abril del mismo año, y la segunda época correspondió al período comprendido desde el 26 de diciembre del 2001 al 28 de febrero del 2002. Para llevar a cabo esta etapa se realizó una prospección de los arbustos infectados usando trampas de intercepción.

3.2.2.1 Trampas de intercepción. Se utilizaron trampas adhesivas de intercepción, las cuales tenían una dimensión aproximada de 14 cm por 9 cm de ancho. Tal como lo describe LABONNE *et al.* (1998), estas fueron colocadas dentro del sector destinado para el desarrollo de la investigación a una distancia de 75 a 100 cm de separación. Las trampas se colgaron de cada planta de murta, las que fueron marcadas con el número correspondiente al de la trampa. Se colocaron a una de altura que varió de los 40 a los 100 cm de altura desde el nivel del suelo. A cada trampa se le colocó sticken (MR.) (pegamento colocado en la superficie de las trampas). Es importante señalar que las trampas de intercepción con sticken, contaron con dos colores bases como posibles atrayentes amarillo normal (Anexo 10), identificado como N00A99M20 en el atlas de los colores de KÜPPERS (1979), y amarillo fluorescente (Anexo 10), identificado en la misma obra como el color N00C20A80. Esta modificación tenía como objetivo medir la efectividad de cada color en la captura de los insectos. Finalmente las trampas se distribuyeron aleatoriamente y en números iguales dentro del sector de colecta (26 trampas de cada color) y en dos ubicaciones preferentemente en los bordes y en el interior del área de estudio (Anexo 9).

3.2.2.2 Conservación del material colectado. Los insectos del suborden Auchenorrhyncha fueron removidos desde las trampas adhesivas mediante un lavado con hexano (grado técnico) por unos minutos, luego fueron enjuagados en etanol 80%, para su posterior conservación en etanol al 70%, siguiendo el método facilitado por WEINTRAUB¹ (2001). Posteriormente ellos fueron separados de acuerdo a sus características morfológicas y de color, rotulados y almacenados a una temperatura de -20°C , para su mejor conservación. Esta etapa final se desarrolló en el Laboratorio de Entomología perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile en Valdivia.

3.3 Clasificación e identificación taxonómica.

Es importante señalar que sólo fueron sometidos a esta etapa aquellos insectos que pertenecían a un grupo taxonómico de reconocido rol como transmisores de estos agentes fitopatógenos. El material de nuestro interés colectado fue enviado para su identificación taxonómica al extranjero a la Doctora Keti Zanol, entomólogo y taxónomo quien se desempeña en el Departamento de Zoología del Sector de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, que tiene un acabado conocimiento de los insectos de la superfamilia Cicadelloidea presentes en Chile.

3.4 Detección de los fitoplasmas en los Auchenorrhyncha seleccionados.

Paralelamente a la etapa anterior, se llevó a cabo la etapa de detección la que constó de cuatro etapas:

¹WEINTRAUB, P. (2000). Ing. Agr., PhD. Entomólogo. Ministerio de Agricultura Departamento de Protección Vegetal de Israel. Comunicación personal vía email.

3.4.1 Extracción de ADN de insectos. Los insectos colectados pertenecientes a los Auchenorrhyncha fueron sometidos a esta etapa, la cual consistió en realizar extracciones de ADN, utilizando como material los cuerpos de los insectos capturados, Esta técnica está documentada en la literatura, y existe un sinnúmero de protocolos. La extracción de ADN se llevó cabo de la siguiente forma siguiendo el método descrito y facilitado por WEINTRAUB¹ (2001). Los insectos fueron homogeneizados a 4°C en 500 µL de una solución de 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2%, cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% b-mercaptoetanol. El homogeneizado, se incubó durante 10 minutos a 65°C, y posteriormente los tubos se centrifugaron a 3.200 xg a una temperatura de 4°C por 10 minutos. Luego se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 3.200 xg a 4°C, recuperándose luego de esta etapa el sobrenadante, el cual se precipitó con igual volumen de isopropanol. El precipitado se incubó a una temperatura de -20°C por ± 30 minutos y luego el precipitado fue centrifugado a 14.900 xg por 20 minutos. Finalmente se lavó el sedimento con etanol absoluto y posteriormente con etanol al 70%, luego el sedimento fue secado y resuspendido en TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA).

¹WEINTRAUB, P. (2001). Ing. Agr., PhD. Entomólogo. Ministerio de Agricultura Departamento de Protección Vegetal de Israel. Comunicación personal vía email.

3.4.2 Extracción de ADN vegetal. La metodología utilizada correspondió a la que VILLAGRA (2001), describe para plantas de murta y que fue desarrollada en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Esta metodología consistió en lo siguiente; se pesó 1g de tejido vegetal fresco de las plantas de murta *in vitro*, se le agregó nitrógeno líquido en un mortero autoclavado y el tejido se pulverizó. Posteriormente se le agregaron 4 mL de solución de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 3% cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% b-mercaptoetanol). Luego la solución fue agitada fuertemente e incubada a 65°C por 60 minutos, mezclando por inversión de vez en cuando. Luego se le agregó un volumen igual de cloroformo:octanol (24:1 v/v), se mezcló por inversión y se centrifugó la solución a 7.500 xg a 4°C por 5 minutos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y a este se le agregó un 1/10 volumen de CTAB/NaCl precalentado a 65°C, se mezcló bien por inversión, de allí se le agregó igual volumen de cloroformo:octanol (24:1 v/v), se mezcló todo y se centrifugó a 7.500 xg a 4°C durante 5 minutos. Como paso siguiente se procedió a separar el sobrenadante al cual se le agregó un volumen igual de tampón CTAB de precipitación, se mezcló por inversión y el precipitado obtenido fue centrifugado a 500 xg a 4°C por 4 minutos (si no se observaba precipitado, se le agregaba un 1/10 de volumen de tampón CTAB de precipitación y se incubaba a 37°C toda la noche). Luego de la centrifugación el sobrenadante fue removido y el sedimento se resuspendió en 0,5 mL de tampón TE alta concentración de sales (si el sedimento era difícil de resuspender se incubaba nuevamente a 65°C por 30 minutos). Posteriormente el sedimento resuspendido se precipitó, en un volumen igual de isopropanol se mezcló por inversión y se centrifugó a 7.500 xg a 4°C por 15 minutos. El sedimento obtenido se lavó primero en etanol absoluto y posteriormente en etanol 70%, se secó y resuspendió finalmente en un volumen mínimo de 100µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA).

3.4.2.1 Calidad y cuantificación del ADN extraído. Para comprobar la calidad del ADN extraído de insectos y de las plantas de murta *in vitro*, se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), conteniendo aproximadamente 5 μ L/20 mL de bromuro de etidio. A cada muestra de ADN (7 en total; 6 de ADN de insectos y 1 de ADN vegetal) de 5 μ L se le adicionaron 5 μ L de tampón de carga de ADN 1x. La corrida electroforética se realizó a 50 mA en tampón TAE 1x por un período aproximado de unos 45 minutos. Estos fueron visualizados a través de un transiluminador ultravioleta. (254 nm) y se le tomaron fotografías.

Para su cuantificación se tomó 1 μ L de muestra de cada ADN extraído (vegetal y de insectos) y se diluyeron en 1.000 μ L de agua destilada, luego se les midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Anexo 4).

3.4.3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR). La reacción de amplificación se realizó usando el ADN obtenido de las etapas de extracción ya descritas, y la metodología que se utilizó fue desarrollada en el Laboratorio de Señalización Celular del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia. Como control de la reacción se utilizaron los partidores GLUT1 y GLUT2 (Anexo 5). Posteriormente se utilizaron los partidores universales para este grupo de microorganismos fU5/rU3 (Anexo 5).

La metodología usada fue la siguiente; Se usó un mix PCR (Anexo 5) el que contenía tampón 10x, MgCl₂, mix de desoxinucleótidos y agua destilada. De este mix se tomaron 21,75 μ L y se le agregaron los partidores en una cantidad de 1 μ L cada uno (con una concentración de 50 pm/ μ L), 1 μ L del ADN templado (una cantidad de \pm 150 ng), y 0,25 μ L de la enzima Taq Polimerasa. A cada tubo se le agregó un volumen igual de vaselina para mantener una

transmisión térmica pareja. Se realizaron 35 ciclos que consistieron en: desnaturación a 94°C, 60 seg; alineamiento 50°C, 50 seg y extensión a 72°C, 75 seg, finalizando así la amplificación. El producto fue observado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1x cargando 5 µL de cada reacción de amplificación, más 5 µL de tampón de carga ADN 1x. Los resultados fueron visualizados a través de un transiluminador ultravioleta. (254 nm) y se le tomaron fotografías.

3.4.4 Hibridación *in situ*. Para esta etapa se utilizaron cortes histológicos de cada especie de insecto colectada, los cuales fueron fijados e incluidos en el Laboratorio del Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, cuya metodología se describe en el Anexo 6.

Las sondas (fU5/rU3) fueron marcadas según el procedimiento utilizado en el Laboratorio de Señalización Celular del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, y que se describe en el Anexo 7. Además a una muestra de cada especie de insecto se le realizó una tinción eosina-hematoxilina para poder determinar a que tejido u órgano correspondía cada corte realizado. Cada una de las tinciones fue observada bajo microscopio en el Laboratorio de Entomología perteneciente a la Escuela de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile y allí se determinó que partes de la anatomía interna del insecto estaban presentes, debido a que nuestro interés era efectuar la hibridación *in situ* en cortes de intestino y glándula salival principalmente.

Una vez fijados, incluidos y montados los cortes, se procedió a realizar la hibridación, a la cual fueron sometidos sólo aquellos insectos que resultaron positivos al análisis de PCR, la hibridación se realizó según la

metodología utilizada en el Laboratorio de Señalización Celular del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile. Como control de la reacción se usó la sonda "sense" (fU5) marcada en cada muestra de los tejidos utilizados.

Cada portaobjeto con tejido fue sumergido en xilol I y xilol II por 5 minutos cada uno. Posteriormente se sumergieron en etanol absoluto en dos oportunidades cada una de ellas por espacio de 5 minutos, de allí los tejidos fueron sumergidos en etanol corriente por 5 minutos en 2 ocasiones, Todo esto con el objeto de desparafinar el tejido. Se procedió a lavar dos veces cada muestra con agua estéril autoclavada por 5 minutos cada una de ellas. De allí se sumergieron en tampón citrato (Anexo 7) y fueron calentadas al 100% por 1 minuto en un microondas, posteriormente se calentó nuevamente ahora al 1% por 10 minutos. Luego de esto los tejidos se dejaron reposar en citrato a temperatura ambiente por 10 minutos, de allí el citrato fue eliminado y las muestras se lavaron en agua destilada estéril por 5 minutos y en PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM fosfato de sodio y 1,8 mM fosfato de potasio) por el mismo espacio de tiempo. Luego a cada muestra se le agregó proteinasa K (Anexo 7) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos, luego las muestras fueron lavadas nuevamente en PBS 1x por 5 minutos y en 2x SSC (3 M NaCl y 0,3 M citrato de sodio, pH 7,2) por 10 minutos. Luego se preparó y agregó a cada muestra el tampón de pre-hibridación (Anexo 7), éstas fueron colocadas a una temperatura de 30°C por 30 minutos. Inmediatamente a cada tejido se le agregó el buffer de hibridación (Anexo 7) (a una sección de la muestra la sonda "sense" y a la otra la "antisense"), y fueron calentadas por 5 minutos a 90°C. Cada muestra ("sense" y "antisense"). Luego tanto los tejidos calentados se incubaron toda la noche a una temperatura de 30°C.

Al día siguiente se lavaron los tejidos a temperatura ambiente en 2x SSC por 20 minutos, luego se lavaron en 1x SSC por 20 minutos a temperatura ambiente, entonces se les dio un lavado estricto en 0,5x SSC a 40°C por 20 minutos, de allí se les dio un nuevo lavado en 0,5x SSC pero ahora a temperatura ambiente y por 5 minutos. Los tejidos luego del lavado se sumergieron en tampón #1 (Anexo 7) por 5 minutos, luego se les aplicó la solución de bloqueo (Anexo 7) por un período de 30 minutos. En seguida, se le agregó el anticuerpo (Anexo 7) a cada muestra, y se esperó un tiempo de 90 minutos, de allí se sumergieron en tampón #1 por 5 minutos y posteriormente en tampón #2 por igual período de tiempo. Luego se procedió a revelar agregando el agente revelador (Anexo 7) a cada sección de la muestra y fueron colocados en oscuridad por unos 120 minutos. Finalmente los tejidos fueron lavados en tampón #2 por 5 minutos y de allí sumergidos en tampón #3 hasta el día siguiente. En último termino se procedió a montar cada muestra en bálsamo para su observación bajo microscopio, los cuales fueron fotografiados y archivados.

3.5 Análisis de Datos.

Esta parte del estudio tiene gran importancia, debido a que los resultados obtenidos, permitirán tener una mayor claridad en varios aspectos que en este momento son totalmente desconocidos, como por ejemplo: la procedencia del vector, su distribución, su relación con su huésped, y además medir la eficiencia de los métodos de colecta y la interrelación de todos estos factores. En consideración a esto, los datos y resultados obtenidos durante la etapa de supervisión y de detección fueron sometidos a análisis estadísticos y a análisis de evaluación de los resultados, según fuera el caso.

3.5.1 Análisis de los ensayos relacionados con el muestreo de los Auchenorrhyncha. Considerando que se tienen los registros de los insectos

colectados, el color de las trampas usadas, su ubicación y fecha de colecta se procedió al análisis de estos datos. Este se realizó a través de un análisis de varianza tipo factorial para medir la eficiencia de cada color en la captura de los insectos, la relación entre sus fechas de colecta y su ubicación dentro del área de estudio. También se determinó si existen diferencias entre los distintos colores usados, entre las distintas épocas de colecta y entre las diferentes ubicaciones de las trampas. Se uso para establecer las diferencias la prueba de Tukey HSD al 95%.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Muestreo de los Auchenorrhyncha.

Luego de los cuatro meses de colecta se encontraron a lo largo de esta etapa 9 especies de insectos que pertenecen a familias de reconocido rol como vectores de fitoplasmas. Los registros de esta etapa se muestran en los Anexos 11,12 y 13. Cada registro incluye la fecha de la revisión de las trampas, la cantidad de insectos colectados, el número de la trampa en la cual fueron hallados, el color de la trampa y su ubicación dentro del área de estudio.

De estas 9 especies se llevó un registro individual el que se encuentra en el Anexo 12. Las 9 especies se sometieron a la etapa de clasificación taxonómica y de detección de fitoplasmas en ellos, debido a que estas especies fueron las que se presentaron en una mayor densidad a lo largo de la etapa de colecta, considerando lo expuesto por PURCELL (1985), BOSCO *et al.* (1997), WEINTRAUB (2000), y INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (2001), quienes indican que en general los vectores se presentan en una densidad alta sobre su planta huésped a diferencia de otro tipo de insectos que no es el vector.

4.2 Clasificación taxonómica. Las Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 corresponden a las nueve especies sometidas a esta etapa de identificación taxonómica realizada por la especialista Doctora Keti Zanol, que se presentan a continuación junto a su respectiva clasificación taxonómica.



FIGURA 5. Familia Cicadellidae, Subfamilia Deltocephalinae *Carelmapu aureonitens* Linnovuori & DeLong.

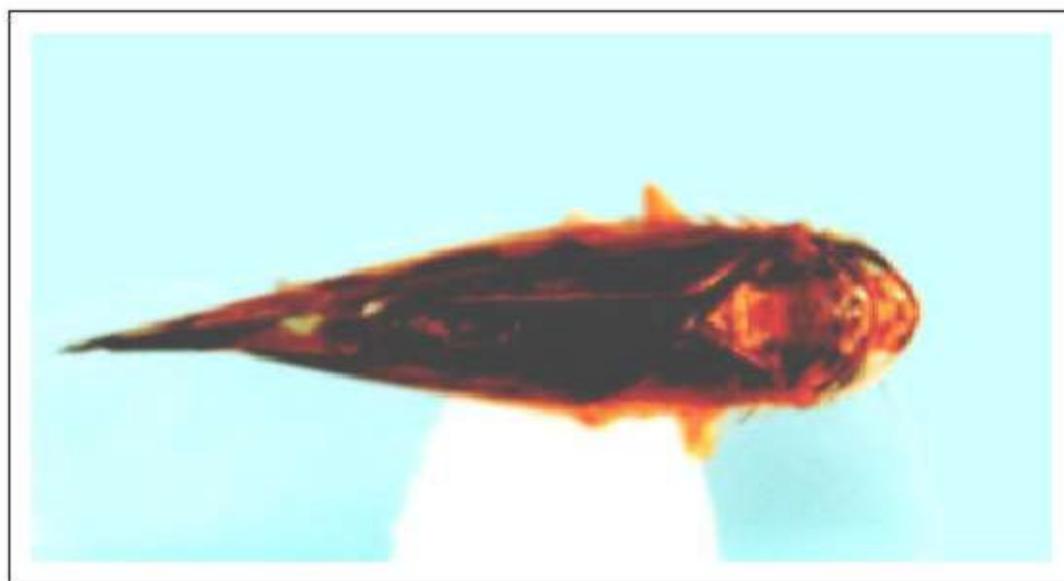


FIGURA 6. Familia Cicadellidae, Subfamilia Deltocephalinae *Carelmapu ramosi* Linnavuori.

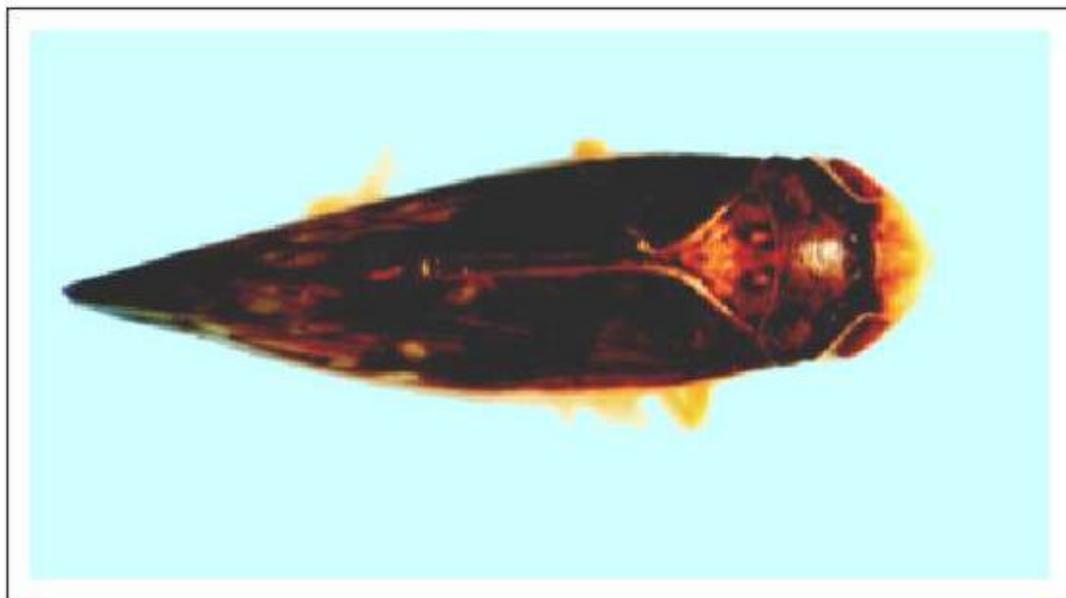


FIGURA 7. Familia Cicadellidae, Subfamilia Deltocephalinae *Paratanus rotundiceps* Linnavuori.



FIGURA 8. Familia Cicadellidae, Subfamilia Deltocephalinae *Amplicephalus glaucus* Blanchard.



FIGURA 9. Especie perteneciente a la Familia Psyllidae.



FIGURA 10. Especie perteneciente a la Familia Cicadellidae, Subfamilia Cicadellinae.



FIGURA 11. Especie 1 perteneciente a la Familia Cicadellidae, Subfamilia Typhlocybinae.



FIGURA 12. Especie 2 perteneciente a la Familia Cicadellidae, Subfamilia Typhlocybinae.



FIGURA 13. Especie perteneciente a la Familia Psyllidae.

La distribución de estas 9 especies a lo largo de la época de colecta se muestran en la Figura 14. Con relación a esta podemos decir que en general todas las especies se presentan en un mayor número durante los meses de diciembre a febrero, declinando su población al final de este mes, para encontrarse en un número menor entre los meses de marzo y abril. Esta situación es lógica, debido a que según PURCELL (1985), y MURRAL *et al.* (1996), estos insectos requieren de una temperatura óptima promedio para su desarrollo en general, de 20°C a 24°C (temperatura que por supuesto dependerá además de cada especie). Durante los meses de diciembre a febrero es probable encontrar dichas temperaturas, estas son mayores en el mes de febrero, ya en los meses de marzo y abril las temperaturas medias comienzan a disminuir. En cuanto al número total de cada una de las especies a lo largo de la época de colecta las especies de psilidos se presentaron en una mayor cantidad, seguidos por los insectos pertenecientes a la familia Typhlocybae, Cicadellinae y las especies *Carelmapu aureonitens* Lv., *Carelmapu ramosi* Lv. & DeL.. Las especies que se presentaron en menor cantidad fueron *Amplicephalus glaucus* Blch. y *Paratanus rotundiceps* Lv..

De las especies identificadas existen muy pocos registros. Por ejemplo de *Amplicephalus glaucus* Blch., se desconoce su ciclo de vida, sólo se conoce en Chile que su distribución va desde la Quinta a la Duodécima Región, característica que lo convierte en el langostino más común en Chile (LINNAVUORI y DELONG, 1977). En cuanto a sus hospederos, este es polífago, encontrándose especialmente en empastadas de gramíneas y vegetación espontánea baja y densa (ARTIGAS, 1994).

En el caso de las especies *C. aureonitens* y *C. ramosi*, ocurre algo parecido, se desconoce su ciclo de vida y sus hospederos, sólo se le ha observado a lo largo de la Novena y Décima Región, en las localidades de

Collipulli y Quellón respectivamente según lo informa LINNAVUORI y DELONG (1977), ocurriendo exactamente igual en el caso de *P. rotundiceps*.

Los datos obtenidos en la colecta de Cicadelloidea y Psylloidea fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de promedios, y los resultados se muestran en el Anexo 14. Los resultados de estos análisis mostraron que no existen diferencias significativas en el color de las trampas usadas (Anexo 16). Sin embargo sí existen diferencias significativas en las dos ubicaciones distintas de las trampas (borde e interior, respectivamente) (Anexo 17), con relación a la cantidad de insectos colectados por cada trampa, resultando muy superior la cantidad de insectos colectados en el borde del área de estudio. Esto indicaría que estos insectos viven o habitan preferentemente en el borde o fuera de estos, donde se presenta justamente una mayor cantidad de gramíneas y otras especies herbáceas a diferencia de la vegetación ubicada al interior del área de estudio, la cual era predominantemente arbórea y arbustiva.

Los resultados de estos análisis indicaron también que existen diferencias significativas entre las distintas fechas de colecta (Anexo 15), correspondiendo a febrero al mes donde se encontró la mayor cantidad de insectos, en enero el número de Auchenorrhyncha capturados fue también alta pero distinta a febrero, ambos meses mostraron un número de Cicadelloidea y Psylloidea capturados distintos a diciembre, marzo y abril, los cuales fueron similares estadísticamente entre si.

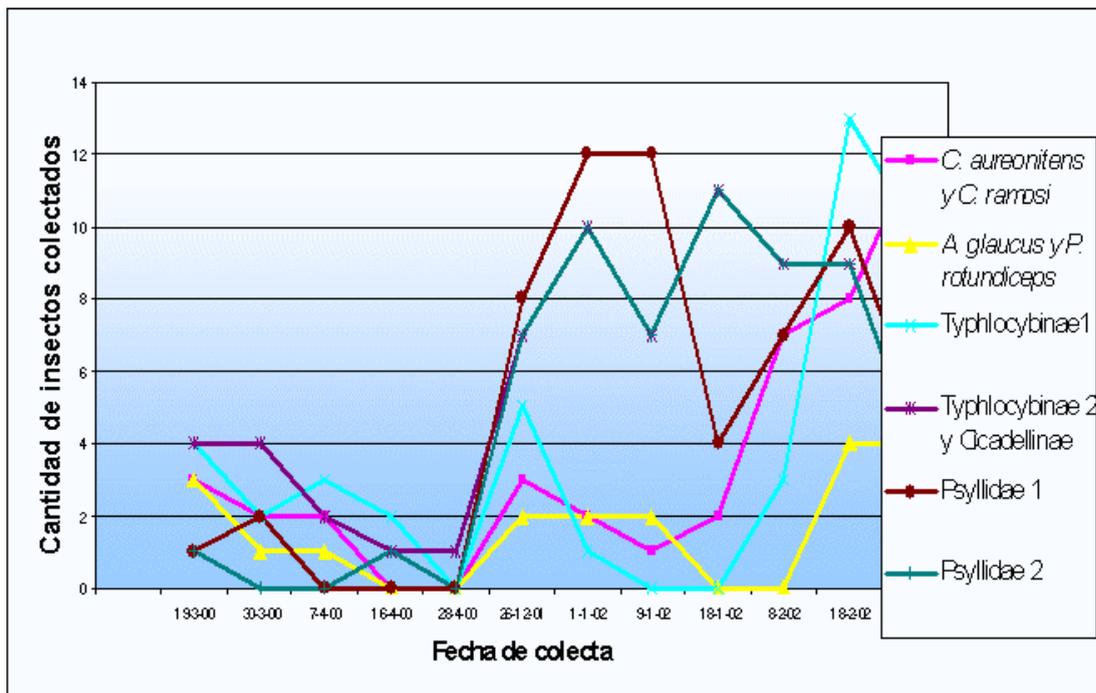


FIGURA 14. Distribución temporal de las distintas especies colectadas durante la época de colecta.

4.3 Extracción de ADN para PCR.

Luego de una serie de intentos y del afinamiento propio de la técnica, se logró extraer ADN de insectos y también ADN de plantas de murta *in vitro* las que se utilizaron como control negativo. Al igual que lo señalado por Borth *et al.* (1999), citado por VILLAGRA (2001), la calidad y cantidad de ADN extraído depende en gran parte del método de extracción usado. La mayor dificultad que se presentó en esta etapa, correspondió a la baja concentración de ADN extraída en cada una de las especies lo que por su parte traería como consecuencia subyacente una baja concentración de ADN de fitoplasma si este estaba presente en alguno de los insectos colectados, tal como mencionan LEE (1999), y BERTACCINI (2000).

En el caso de los insectos se utilizó a los individuos enteros para realizar la extracción, debido a la dificultad de extraer los intestinos y las glándulas salivales de cada especie, lugar donde se alojan preferentemente los fitoplasmas. Ahora de las plantas de murta *in vitro* sanas y de aquellas que mostraron síntomas, se utilizaron para la extracción sus hojas más nuevas.

Después de extraído el ADN de insectos y el de las plantas de murta *in vitro*, se realizó una cuantificación y calificación de la cantidad y calidad de este. Para esto se hizo correr la muestra de ADN de cada extracción en un gel de agarosa 1%, usando un marcador de peso molecular para ADN. También se compararon las intensidades de las bandas y se estimó la concentración de la muestra de ADN, que es óptimo para los próximos análisis.

En la Figura 15 se presenta una fotografía de uno de los geles de agarosa obtenidos con el ADN extraído. Los resultados fueron positivos para cada una de las especies de insectos colectadas y para las plantas de murta cultivadas *in vitro*, las concentraciones de cada uno de los ADN extraídos se presentan en el Anexo 4.

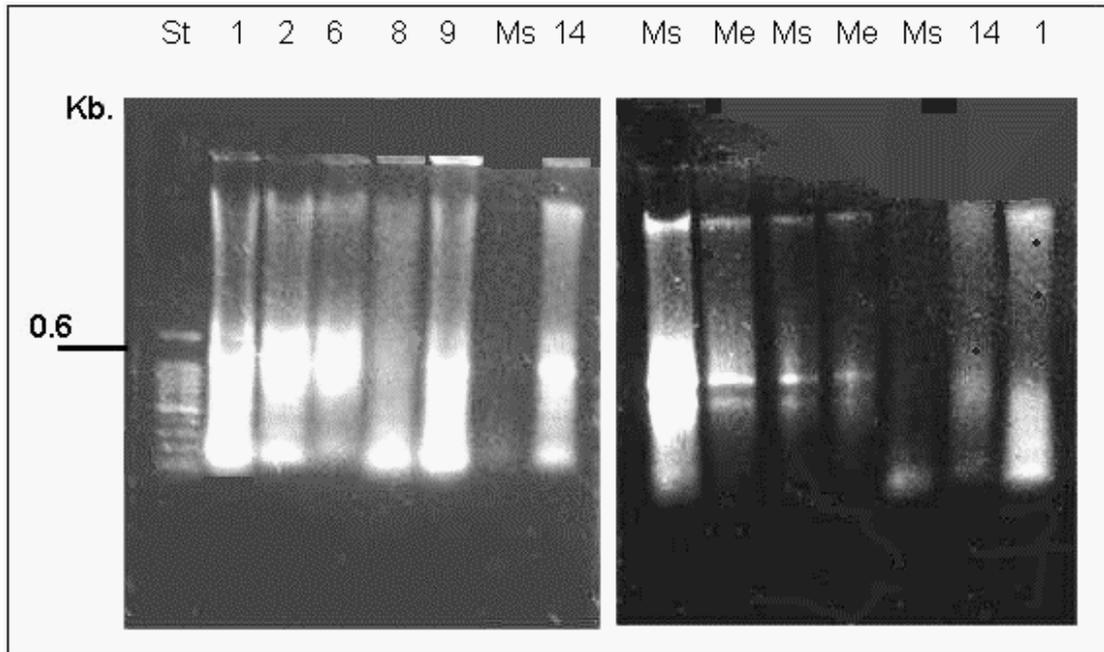


FIGURA 15. Electroforesis de geles de agarosa (1%) correspondiente a los ADN extraídos y teñidos con bromuro de etidio.

Cada carril corresponde al ADN de la especie indicada. St: Estándar de peso molecular, 1: *C. aureonitens* y *C. ramosi*, 2: *P. rotundiceps* y *A. glaucus*, 6: Psyllidae, 8: Cicadellinae, 9: Typhlocybinae, 14: Psyllidae, Ms: Murta sana *in vitro* y Me: Murta enferma.

4.4 Análisis de la polimerasa en cadena (PCR).

Antes de realizar este análisis utilizando los partidores universales para fitoplasmas (fU5/rU3), se realizó un control de reacción para probar efectivamente la calidad del ADN extraído y constatar posibles reacciones negativas del ADN obtenido. Para ello se realizó un PCR usando los partidores GLUT 1 y GLUT 2. Los resultados fueron positivos, se logró amplificar una banda con estos partidores, sin embargo, sólo respondió favorablemente el ADN de plantas de murta *in vitro*, tal como lo muestra la fotografía del gel de agarosa (1,5%) en el Anexo 18. Ahora este resultado era el esperado considerando que la secuencia de estos partidores corresponden a una secuencia específica para los transportadores facilitadores de glucosa.

Una vez terminada la reacción control para el ADN extraído, se realizó el PCR utilizando los partidores universales para fitoplasmas fU5/rU3. El programa utilizado fue el mismo que se usó para la reacción control y que fue descrito en el punto 3.4.3.

El análisis de PCR detectó la presencia de fitoplasmas en las especies *C. aureonitens* y *C. ramosi* pertenecientes al grupo 1. La principal banda amplificada de 0.9 Kb (Figura 17 y 18), y corresponde a la misma banda detectada por VILLAGRA (2001), como la banda correspondiente al fitoplasma causante de la escoba de bruja en murta (Figura 16). No hubo amplificación con el ADN de plantas de murta *in vitro* usadas como control negativo (Figura 17 y 18).

Sin embargo, es interesante señalar que se observó también una segunda banda, esta correspondió a 0.35-0.4 Kb, aproximadamente (Figura 17 y 18). Esta banda se observó en las especies ya mencionadas anteriormente y en la especie N° 9 miembro de la familia Typhlocybiniae.

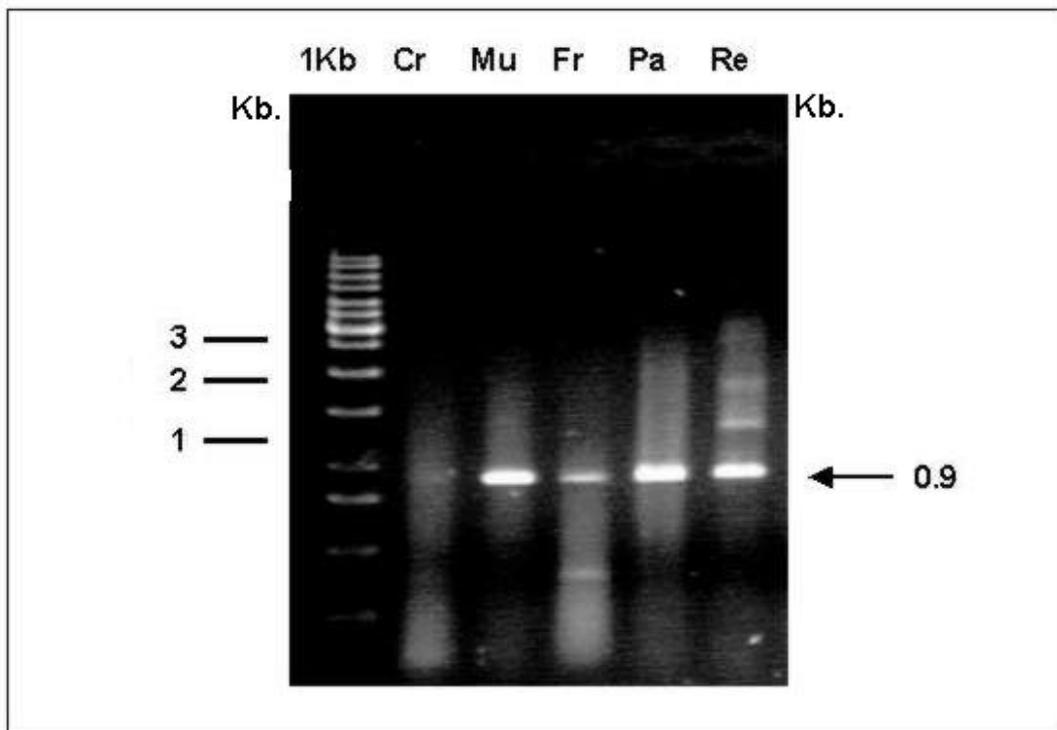


FIGURA 16. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de los productos de un Nested-PCR teñidos con bromuro de etidio. En la primera amplificación se usaron los partidores universales de fitoplasmas P1/Tint y en la reamplificación los partidores universales fU5/rU3. 1Kb: Marcador de peso molecular, Cr: Crisantemo, Mu: Murta, Fr: Frijol, Pa: Papa, Re: Remolacha, infectados con fitoplasmas.

FUENTE: VILLAGRA, (2001).

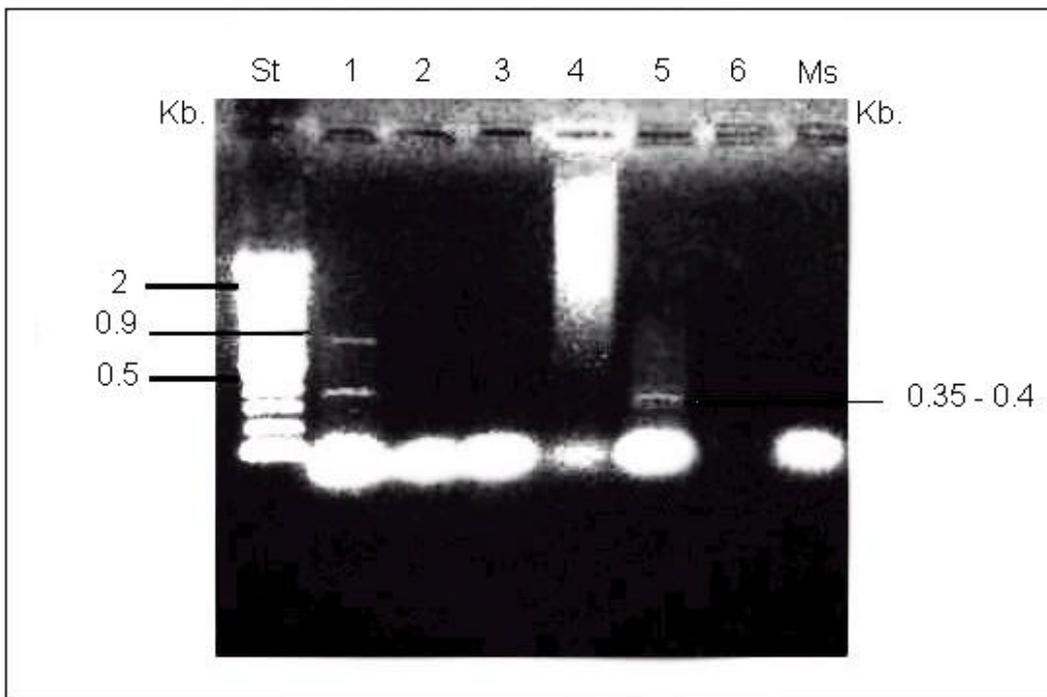


FIGURA 17. Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) de los productos de PCR utilizando los ADN extraídos teñidos con bromuro de etidio.

Se utilizaron los partidores universales de fitoplasmas fU5/rU3. St; Marcador de peso molecular, 1: *C. aureonitens* y *C. ramosi* infectados con fitoplasmas, 2: *P. rotundiceps* y *A. glaucus*, 3: Psyllidae, 4: Cicadellinae, 5: Typhlocybinae infectados con fitoplasmas, 6: Psyllidae y Ms: Murta *in vitro* sana.

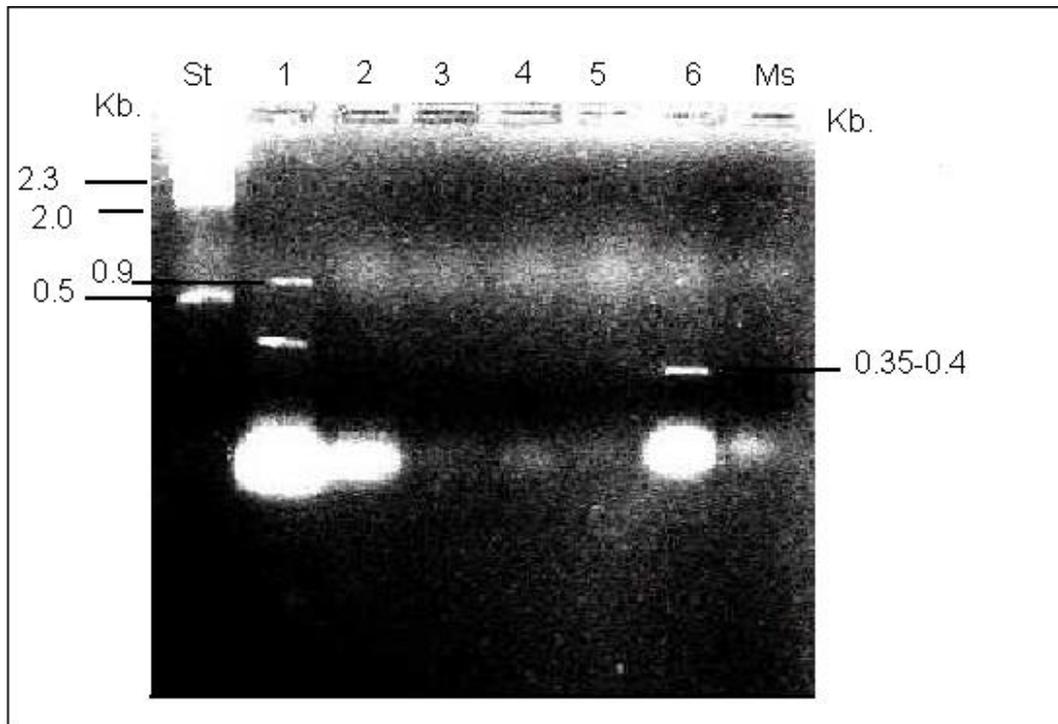


FIGURA 18. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR utilizando los ADN extraídos teñidos con bromuro de etidio.

Se utilizaron los partidores universales de fitoplasmas fU5/rU3. St: Marcador de alto peso molecular λ , 1: *C. aureonitens* y *C. ramosi* infectados con fitoplasmas, 2: *P. rotundiceps* y *A. glaucus*, 3: Psyllidae, 4: Cicadellinae, 5: Psyllidae, 6: Typhlocybiniae infectados con fitoplasmas y Ms: Murta *in vitro* sana.

Los resultados de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), permitieron amplificar una banda de 0.9 Kb, utilizando partidores universales para fitoplasmas. Esta banda es igual a la obtenida por VILLAGRA (2001), quien obtuvo esta amplificación al realizar un Nested-PCR (Figura 16), para identificar el agente causal de la escoba de bruja en murta. Ahora la presencia de una segunda banda amplificada (0.35-0.4 Kb), nos permitiría plantear la hipótesis de que probablemente, podría existir una segunda especie de fitoplasma la que en asociación a la ya identificada, provocarían la enfermedad de la escoba de bruja en murta. Esto podría ser posible, ya que LEE (1998), asegura gracias a estudios de transmisión y pruebas moleculares, que se ha comprobado que muchos vectores pueden transmitir más de un tipo de fitoplasmas, incluso fitoplasmas pertenecientes a razas muy distintas. LEE et al. (1996), estudió el caso particular de *Cacopsylla spp.*, los análisis de PCR realizados a esta especie indicaron que ésta adquiere fitoplasmas del grupo X y otro tipo de fitoplasmas todos los cuales están asociados con la infección conocida como el decaimiento del peral.

Al lograr la secuenciación del genoma del fitoplasma y posteriormente realizar pruebas de transmisión, podremos comprobar la validez de la hipótesis anteriormente planteada. Ya que la banda que no fue detectada (0.35-0.4 Kb) en el estudio de VILLAGRA (2001), podría corresponder a una bacteria endógena del insecto (y que además no fuera fitopatógena) y no a otra especie de fitoplasma. PURCELL (1985), señala que el origen de estos microorganismos no es la planta huésped sino los insectos vectores, de allí entonces que es más fácil la detección de estos patógenos al interior de sus vectores que de sus plantas. Ahora si se tratara de dos especies de fitoplasmas, para comprobar sus diferencias filogenéticas sería apropiado realizar luego de su secuenciación, un análisis de RFLP, para determinar a que grupo taxonómico dentro de los fitoplasmas existentes pertenecen, o si se trataría de un grupo totalmente nuevo.

Las infecciones mixtas son bastante comunes y así lo señala la literatura. HSU y BANTTARI (1979), quienes señalan incluso infecciones mixtas de fitoplasmas y virus por un mismo agente vector. Sin embargo, como indica LEE (1998), las infecciones mixtas son más comunes en lugares donde los cultivos son intensos y donde existe una gran rotación de cultivos. Por supuesto que estas infecciones mixtas ocurren también en los vectores quienes juegan un rol importantísimo y determinante a la hora de definir si una planta susceptible o no, sea infectada por un fitoplasma único y específico o por un grupo de ellos (LEE, 1998).

Usando como base lo indicado por ARRENS y SEEMÜLLER (1992); CHEN et al. (1993); LEE et al. (1993); NAMBA et al. (1993); CARRARO et al. (1994); LEE et al. (1994); HORMAZA et al. (1999), y SEEMÜLLER (1999), quienes señalan que al amplificar fragmentos de ADN específicos de fitoplasmas usando la técnica de PCR como método, permitirá distinguir entre insectos infectados con este patógeno y aquellos que no están infectados.

Por lo tanto basados en los resultados obtenidos, se puede decir que el análisis de PCR realizado con el ADN de las especies *C. aureonitens* y *C. ramosi* y de la especie perteneciente a la familia Typhlocybae capturadas durante la etapa de colecta constituye sin lugar a duda la confirmación de la hipótesis de este estudio. Sin embargo, Vega et al. (1993), citado por WEBB et al. (1999), señala que se ha reportado que insectos que se han alimentado recientemente de plantas infectadas tendrían fitoplasmas en su interior y por lo tanto al realizar un análisis de PCR resultaría positivo sin ser necesariamente este insecto el vector del fitoplasma. De allí entonces que es necesario en adición al análisis de PCR (el cual no distingue entre un insecto vector y uno que no lo es), realizar un análisis molecular *in situ*, como una hibridación, a aquellos insectos que resulten positivos al PCR, y de esa forma tener una base

sólida para afirmar que se ha encontrado al vector de estos fitoplasmas causantes de la escoba de bruja en murta.

4.5 Hibridación *in situ*.

Para comprobar que ambas sondas estaban marcadas se realizó el análisis de Southern blot que resultó positivo para ambas sondas (Anexo 20). Una vez confirmado el marcaje de las sondas, se procedió a realizar la hibridación *in situ* a los tejidos de las especies *C. aureonitens*, *C. ramosi* y de la especie perteneciente a la familia Typhlocybae, que resultaron positivas al análisis de PCR.

Sin embargo, esta técnica es compleja ya que existen dificultades asociadas principalmente al tamaño de los oligonucleótidos (sondas), pues se requiere que estos tengan un tamaño pequeño (20 a 24 mer) para la optimización de las condiciones de la reacción de la hibridación *in situ* (WEBB *et al.*, 1999).

Las principales dificultades encontradas en la realización de este análisis, correspondieron al desconocimiento de las características del tejido de estos insectos, ya que la dureza de su exoesqueleto no permitió obtener cortes histológicos de calidad óptima. Además dada sus características particulares al comienzo de la hibridación, específicamente la etapa de desparafinización con xilol, se perdieron algunos cortes, por lo que se sugiere reducir el tiempo de inmersión de los cortes en xilol, para no perder cortes.

Los resultados obtenidos en las especies *C. aureonitens* y *C. ramosi*, mostraron la presencia de fitoplasmas, al interior de las glándulas salivales y de sus intestinos, los que se indican en la Figura 19. Las flechas en esta figura muestran el ADN de los fitoplasmas al interior de estos tejidos teñidos con el color característico de una reacción positiva de una hibridación *in situ*

(coloración turquesa dada por el reactivo digoxigenina) Estos resultados son muy similares a los que obtuvo WEBB *et al.* (1999), al realizar una hibridación *in situ* a *Euscelidius variegatus*, un cicadelido que presentaba el fitoplasma ICPH que afecta principalmente a crisantemo (*Crysanthemum leucanthemum* L.). Estos resultados se muestran en el Anexo 19.

Sin embargo no se observó en el caso de la especie perteneciente a la familia Typhlocybae la presencia del ADN de fitoplasma al interior de sus tejidos, específicamente glándulas salivales e intestino (Figura 20). Por lo tanto esta especie se había alimentado recientemente de plantas infectadas al momento de ser colectada, lo que permitió obtener una amplificación al usar la técnica de PCR. Sin embargo, ya que no hubo una reacción positiva en el análisis de la hibridación *in situ*, ya que los tejidos donde se aplicó la sonda “antisense” (rU3) marcada resultaron igual al control negativo tal como lo muestran las flechas en la Figura 20. Esta especie no sería por lo tanto vector de este fitoplasma.

Considerando lo que señalan WEBB *et al.*, (1999), HANNON *et al.*, (1993), DIJKMAN *et al.*, (1995) y MANNHEIM (1989), la hibridación *in situ* (ISH) constituye una técnica extremadamente sensible y específica para la determinación de genomas virales y bacterianos al interior de tejidos infectados, y que no requiere de concentraciones altas para lograr resultados favorables. Por lo tanto los resultados positivos de la hibridación *in situ* para las especies *C. aureonitens* y *C. ramosi*, confirman en forma sólida y definitiva la hipótesis de este estudio.

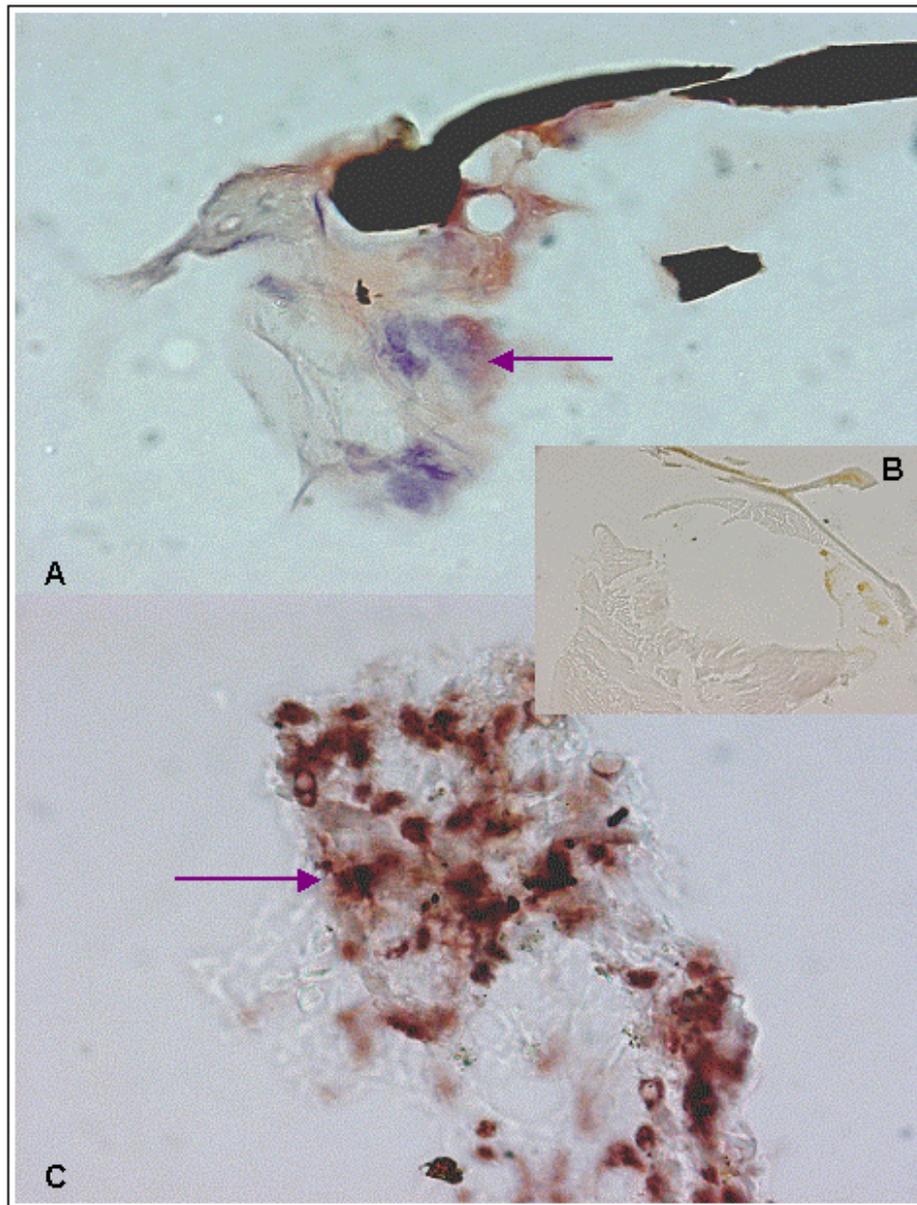


FIGURA 19. Hibridación *in situ* en *C. aureonitens* y *C. ramosi*. (A y C) tejido infectado y (B) control negativo.



FIGURA 20. Hibridación *in situ* en Typhlocybae. (A y C) tejido sin presencia de fitoplasmas y (B) control negativo.

5 CONCLUSIONES

Del presente estudio podemos concluir lo siguiente:

- Se determinó la presencia del fitoplasma de murta en muestras de ADN conjuntas de las especies *Carelmapu aureonitens* DeL., y *Carelmapu. ramosi* Lv., por ello será necesario verificar si ambas especies son vectores del fitoplasma de la murta o solo una de ellas.
- Las técnicas moleculares PCR e hibridación *in situ*, demostraron ser altamente específicas y sensibles en la determinación y localización de los vectores de fitoplasmas.
- Los dos tonos amarillos de las trampas no mostraron diferencias en la captura total de Auchenorrhyncha.
- Se capturó una mayor cantidad de Auchenorrhyncha, en las trampas colocadas en el borde del murtal que en el interior de este.
- La actividad de *C. aureonitens* y *C. ramosi* fue mayor en los meses de enero y febrero, al considerar el período diciembre-abril.
- Se determinó presencia de un ADN de menor tamaño (0.35-0.4 Kb.), asociado a los Auchenorrhyncha colectados, este ADN correspondería a un procarionte. Sin embargo se deberá comprobar exactamente a que procarionte pertenece este ADN y si este microorganismo presenta carácter fitopatógeno.

6 RESUMEN

La murta (*Ugni molinae* Turcz.), arbusto nativo de Chile es afectado por pocas enfermedades, siendo la más importante en incidencia en el área de Valdivia, la causada por un fitoplasma y que corresponde de acuerdo a la sintomatología a una escoba de bruja. Esta enfermedad necesita de un vector para su multiplicación y transmisión posterior, el cual se desconoce. Debido a que los Auchenorrhyncha (Cicadoidea y Fulgoroidea) son los principales vectores y algunos Sternorrhyncha (Psylloidea), transmiten fitoplasmas, se realizó una investigación para identificar al vector de esta enfermedad.

Para identificar y determinar este vector(es), durante 4 meses se realizó un muestreo de un murtal en el sector camino a Curiñanco, ubicado en la Cordillera de la Costa de la provincia de Valdivia a unos 5,5 km del centro de la ciudad de Valdivia. Allí se colectaron cicadellidos adultos mediante trampas de intercepción adhesivas, de dos colores: amarillo y amarillo fluorescente, las que se distribuyeron al azar y en igual número. Se capturaron 9 especies de cicadellidos de tres superfamilias conocidas como vectores del fitoplasma, las cuales fueron sometidas a análisis de PCR y de hibridación *in situ*, utilizando para ello partidores universales (fU5/rU3) para este tipo de fitopatógenos.

Estos análisis, mostraron la presencia del ADN del fitoplasma al interior del cuerpo de dos especies que fueron analizadas conjuntamente; *Carelmapu aureonitens* Lv. & DeL. y *Carelmapu ramosi* Lv. Estas especies fueron capturadas en un número relativamente alto especialmente durante el verano. Debido a que al momento de realizar las pruebas se desconocía que la muestra estaba compuesta por dos especies, será necesario en futuras investigación demostrar si ambas especies son vectores de la enfermedad o si sólo una de ellas lo es.

El o los vectores de este patógeno son especies nativas de Chile, así como la murta por lo que se reafirmaría la hipótesis de que el fitoplasma también lo sea. Se determinó además la presencia de un procarionte en el interior de las especies del genero *Carelmapu* y de una especie miembro de la familia Typhlocybinae. Sin embargo se deberá comprobar a que tipo de procarionte corresponde y si este tiene o no carácter fitopatológico.

SUMMARY

Murta (*Ugni molinae* Turcz.), a Chilean native bush is affected by few pathologies, being the most important at the Valdivia area, a disease caused by a phytoplasma, whose symptoms correspond to a witch broom disease. This disease needs a vector for its multiplication and later transmission, which has not been identified. Because Auchenorrhyncha (leafhoppers and planthoppers) are the main vectors, together with some Sternorrhyncha (psyllids), a study was carried out to identify the vector of the murta witch disease.

In order to identify the vector(s), samples were taken during 4 months in a place with murta plants showing witch broom symptoms. This place was located near the road from Valdivia to Curiñanco at 5.5 Km, from the city of Valdivia. In this place adults from Psyllidae, Fulgoridae and Cicadellidae were caught using interception sticky traps yellow and fluorescent yellow. Traps were distributed at random inside and in the border of the area with murta. Nine species of the three families were collected. They were analyzed using PCR and in situ hybridization using universal primers for this type of pathogens (fU5/rU3).

Results showed the presence of DNA phytoplasma inside two species of leafhoppers *Carelmapu aureonitens* Lv. & DeL. and *Carelmapu ramosi* Lv., which were analyzed as a species, because unfortunately at the moment of doing the test they were considered as belonging to a single species. These species were caught in high number specially during summer. Because at the moment of running the test was unknown that the sample correspond to two species, it will be necessary in future studies to determine if both species are vectors of the phytoplasma or only one of them.

Because both vectors are native species, just as murta, and knowing the close relationship between vectors, plant and phytoplasma it is possible to think that the phytoplasma is also a native species. Also it was possible to find the presence of prokaryotes inside species of *Carelmapu* and one species of Thyphlocybinae. However it is necessary to determine the type of prokaryote and its pathogenic condition on plants.

7 BIBLIOGRAFIA

- ALEA, M. y RAMIREZ J. 1993. Plantas y arbustos silvestres de Chile. Fundación Claudio Gay. (Chile) 273p.
- ARRENS, U. y SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA. *Phytopathology* (EE.UU.) 82(8):828-832.
- AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY (A.P.S). 1998. Fitoplasmas (organismos similares a micoplasmas).
<<http://www.scisoc.org/resource/Mlingual/Spanish/8Ds.rtf>> (27 abril 1999).
- ANDRADE, N.; MEDEL, F. y MONTEALEGRE, J. 1984. Prospección del estado fitopatológico de arbustos frutales en la Región de los Lagos. *Agro Sur* (Chile) 12(1):56-64 .
- ARTIGAS, J. 1994. Entomología económica, insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario. (eds.) Anibal Pinto, Concepción (Chile). Vol 1, 1126p.
- BERGES, R.; ROTT, M. y SEEMÜLLER, E. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant host as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* (EE.UU.) 90(10):1145-1152.

- BERTACCINI, A. 2000. Phytoplasmas and yellows disease.
<<http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/bert8310html>> (18 jun. 2000).
- BOSCO, D.; ALMA, A. y ARZONE, A. 1997. Studies on population dynamics and spatial distribution of leafhoppers in vineyards (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of Applied Biology* (Inglaterra) 130:1-11.
- CAMELE, I.; BERTACCINI, A.; MARTÍN, M. y GORA, G. 1999. Identificazione molecolare di fitoplasmi in piante di eucalipto e mirto con scopazzi. Dipartimento di Biología, Difesa e Biotecnologie Agro Forestali. Università de lla Bosilicata, Potenza, Italia. *Petria* (Italia) 9(3):259-268.
- CARDENAS, C. 1998. Aspectos de la morfología floral, producción de néctar y fructificación de *Berberis Darwin* Hook., *Aristotelia chilensis* Mol. y *Ugni molinae* Turcz.. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias 111p.
- CARRARO, L.; LOI, N.; KUSZALA, C.; CLAIR, D.; BOUDON-PADIEU, E. y REFATTI, E. 1994. On the ability-inability of *Scaphoideus titanus* ball to transmit different grapevine yellows agents. *Vitis* (Italia) 33:231-234.
- CHEN, K.; GUO, J.; WU, X.; LOI, N.; CARRARO, L.; GUO, Y.; CHEN, Y.; OSLER, R.; PEARSON, R. y CHEN, T. 1993. Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes and PCR for detection of grapevine yellows disease agent. *Phytopathology* (EE.UU.) 83(9):915-922.
- COUSIN, M.; ROUX, T. y MAURER, J. 2000. Escoba de bruja a phytopatology disease of Poplar, Result and Perspectives. Wood Forest Products.
<<http://www.metla.fi/conf/iufro95abs/d5pap126.htm>>. (7 jul. 2000)

- D'ARCY, C.J. y NAULT, L.R. 1982. Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsia-like organisms. *Plant Diseases* (EE.UU.) 66:99-104.
- DAVIS, R. M. 1999. Carrot diseases caused by phytoplasma-like. U.C. Pest Management. <<http://axp.ipm.ucdavis.edu/PMG/r102101111.html>>, (7 jul. 2000).
- DIJKMAN, H.; MENTZEL, S.; JONG, A. y ASSMANN, J. 1995. RNA *in situ* hybridization using dioxigenin-labeled cRNA probes. *Biochemica* (EE.UU.) 2:22-29.
- DOI, Y. y ASUYAMA, H. 1981. Paulownia witches broom diseases. In *Mycoplasma diseases of trees and shrubs*. Maramorosch, K. Y Raychaudhuri, S. (eds). Academic Press, New York. pp:185-202.
- DUNN, A.; REBECCA, S; SMITH, T. y SMITH, J. 2001. Transovarial transmission of microsporidian, Praeger New York (EE.UU.), 215p.
- GARCIA De La ROSA, J. 1995. La escoba de bruja en mango. Informe técnico Pfizer. México.4p.
- GOSH, D.; DAS, A.; SING., S.; SINGH, J. y AHLAWAT, Y. 1999. Occurrence of witches broom, a new phytoplasma disease of acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle.) in India. *Plant Disease* (EE.UU.) 83(3):302.
- GREEN, M.; THOMPSON, D. y MAC KENZIE, D. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease* (EE.UU.) 83(5):482-485.

- HANNON, K.; JOHNSTONE, E.; CRAFT, L.; LITTLE, S.; SMITH, C.; HEIMAN, M. y SANTERRE, R. 1993. Synthesis of PCR-Derived, single-stranded DNA probes suitable for *in situ* Hybridization. Analytical Biochemistry (EE.UU.) 212:421-427.
- HARRIS K.F.y MARAMOSCH K. 1980. Vector of plant pathogens. Academic Press. New York. 467 p.
- HOFFMAN, A. 1995. Flora silvestre de Chile, zona araucana. Fundación Claudio Gay. 258p
- HORMAZA, J.; ERREA.; CARRERA, M.; BALDUQUE, R.; LOZANO, C. y GELLA, R. 1999. El decaimiento del peral <http://www.aragob.es/agri/ama/surcos/62/pag31_62.htm> (10 abril 2000).
- HSU, T. y BANTTARI, E. 1979. Dual transmisión of the aster yellows mycoplasma-like organism and the oat blue dwarf virus and its effect on longevity and fecundity of the aster leafhoppers vector. Phytopathology (EE.UU.) 69(8):843-845.
- INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL). 2000. XI Curso internacional teórico práctico de detección e identificación de virus, viroides y fitoplasmas. Desarrollado en Santiago (Chile) 124p.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA-ESPAÑA (DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL). 2001. Etiología de enfermedades asociadas al decaimiento del peral. Mejora de técnicas de detección de fitoplasmas. Memoria del proyecto INIA SC97-131-C2-2.

<http://esa.confex.com/esa/2001/techprogram/paper_2498.htm> (27 abril 2002).

KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K. y SATO, M. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhoppers *Hisimonoides sellatiformis*. Phytopathology (EE.UU.) 90(8):909-913.

KÜPPERS, H. 1979. Atlas de los colores, mas de 5500 matices con su caracterización y las instrucciones para su mezcla. (eds). Blume, Barcelona (España) 161p.

LABONNE, G.; QUIOT, J. y LAURIAUT, F. 1998. Searching for leafhopper vectors of phytoplasmas. The choice of trapping methods. Acta Horticulturae (EE.UU.) 472:655-663.

LAVIN, A. y VEGA, A. 1996. Caracterización de plantas de murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) en el área de Cauquenes. Agricultura Técnica (Chile) 56(1):64-67.

LAVIN, A. y MUÑOZ, C. 1998. Propagación de murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) mediante estacas apicales semileñosas. Agricultura Técnica (Chile) 48(1):58-59.

- LEE, I.; HAMMOND, R.; DAVIS, R. y GUNDERSEN, D.. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and Identification of Mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* (EE.UU.) 83(8):834-842.
- LEE, I.; GUNDERSEN, D.; HAMMOND, R. y DAVIS, R.. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for Nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in single host plant. *Phytopathology* (EE.UU.) 84(6):559-566.
- LEE, I.; DANIELLI, A.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M. y BARTOSZYK I.. 1996. Multiple Phytoplasmas detected in two species of Homoptera feeding on pear trees with decline symptoms. Abstract of the 11th International Congress of the International organization for Mycoplasmaology (IOM), Orlando, Florida, EE.UU. (July 14-19) 199.
- LEE, I. ; ZHU, SF.; BARTOSZYK I. y TIAN Z. 1997. Molecular identification and characterization of phytoplasma-like, associated with cherry lethal yellows and some important tree and shrub diseases in China. <<http://www.nalusda.gov/ttic/tektran/data/000008/55/0000085535.html>> (12 sep. 2000).
- LEE, I.; GUNDERSEN-RINDAL, D. y BERTACCINI, A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* (EE.UU.) 88(12):1359-1364.
- LEE, I. 1999. Molecular-based method for detection and identification of phytoplasmas. First internet conference on phytopathogenic mollicutes. <<http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>> (7 jun. 1999).

- LEE, M. y GRAU, G. 1999. Welcome to the home page Phytoplasmalike. University Wisconsin-Madison, Department. of Plant Phatology. <<http://www.plantpath.wisc.edu/soyhealth/plodescr.htm>>, (12 sep. 2000).
- LINNAVUORI, R. y DELONG, D. 1977. The leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) know from Chile. Brenesia (Costa Rica) 12/13:163-267.
- MADDEN, L.V.; JEGER M.J. y VAN DEN BOSH F. 2000. A theoretical assessment of the effects of vector-virus. Transmission mechanism on plant virus disease epidemics. Phytopathology (EE.UU.) 90(6):576-589.
- MANNHEIN, B. 1989. DNA labeling and detection nonradioactive. Biochemica, Germany 61p.
- MARZACHI, C.; VERATTI, F. y BOSCO, D. 1998. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infect insects. Annal applied Biology (Inglaterra) 133:45-54.
- MARTINEZ, M. 2002. Comparación de dos métodos de transmisión *in vitro* del fitoplasma causante de la escoba de bruja en plantas de murta (*Ugni molinae* Turcz.) *in vitro*. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias 83p.
- MEDEL, F. 1981. Arbustos frutales. Fenología y adaptabilidad de los frutos en la Región de los Lagos. AgroSur (Chile) 9 (1):59-64.
- MEDEL, F. 1986. Requerimientos climáticos edáficos para las especies frutales en el sur de Chile. Agrosur (Chile) 14(1):48-56.

- MURRAL, D.; NAULT, L.; HOY, C.; MADDEN, L. y MILLER, S. 1996. Effects of temperature and vector age on transmisión of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* (EE.UU.) 89(5):1223-1231.
- NAMBA, S.; KATO S.; IWANAMI S.; OYAIZU H.; SHIOZAWA H. y TSUCHIAZAKI T. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms using Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* (EE.UU.) 83(7):786-791.
- NAULT, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* (EE.UU.) 90(5):321-336.
- NOVOA, R. 1982. Antecedentes sobre establecimiento y producción de frutos de la especie *Ugni molinae* Turcz.. Tesis Ing. Forestal Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ingeniería Forestal 101p.
- PURCELL, A. 1985. The Ecology of bacterial and micoplama plant diseases spread by leafhoppers and planthoppers. *Leafhoppers and Planthoppers* (eds.) Nault, L., Rodríguez, J., Wiley, J., y Sans, F. New York (EE.UU.) 351-379.
- RAMÍREZ, C.; ROMERO, M. y HENRIQUEZ, O. 1980. Estudios de germinación en semillas de Myrtaceae chilenas. *Bosque* (Chile) 3:106-114.
- RODRÍGUEZ, G. 1986. Murta, Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). *Chile Forestal* 127:32.

- SEEMÜLLER, E. 1999. On some problems in temperate fruit phytoplasma research. First Internet conference on phytopathogenic mollicutes. <<http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>> (7 jun. 1999).
- SEGUEL, I. 1986. Biología Reproductiva de algunas especies de Myrtaceae en la X Región-Chile. Tesis Profesor de Biol. y Quím. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Filosofía y Humanidades 76p.
- SUNIL, T. y BALASUNDARAN, M. 2002. Detection of sandal spike phytoplasma by polymerase chain reaction. Division of Pathology, Kerala Forest Research Institute, Peechi, Thrissur, India. <<http://www.agdia.com/testing/index.shtml>> (27 abril 2002)
- THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. 2002. Phytoplasma devastates vineyards and papaya crops in Australia and New Zealand. <<http://www.agnic.org/pmp/2001/psp032001.html>> (27 abril 2002).
- URBAN, O. 1934. Botánica de las plantas endémicas de Chile. Sociedad Imprenta Literaria, Concepción (Chile) 291p.
- VENEGAS, A.; WILCKENS, R., HEVIA, F. y TAPIA, M. 1995. Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) IV Estados fenológicos. Agrociencia (Chile) 11(1):5-8.
- VILLAGRA, C. 2001. Identificación del agente causal de escoba de bruja en murta (*Ugni molinae* Turcz.). Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias 95p.

- WANG, K. y HIRUKI, C. 2001. Use of Heteroduplex mobility assay for identification and differentiation of phytoplasma in the aster yellows group and the clover proliferation group. *Phytopathology* (EE.UU.) 91(6):546-553.
- WEBB, R.; BONFIGLIOLI, L.; CARRARO, R.; OSLER y SYMONS, R. 1999. Oligonucleotides as Hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* (EE.UU.) 89(10):894-901.
- WEINTRAUB, P. 2000. Vector of Phytoplasma in Carrots.
< http://www.molcho.org.il/phytoplasma_english.html>, (12 sep. 2000).
- WHITCOMB , R.; WILLIAMSON, D.; GASPARICH, G.;TULLY, J. y FRENCH, F. 1999. Spiroplasma taxonomy.First Internet conference on phytopathogenic mollicutes.
<<http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>> (7 jun. 1999).
- ZHANG, J.; MILLER, S.; HOY, C.; ZHOU, X. y NAULT,L. 1999. A rapid method for detection an differentiation of aster yellows phytoplasma-infected and –inoculative leafhoppers. University Ohio State, Departments of plant pathology and entomology (EE.UU.) 2p.
- ZEVALLOS, P. y MATTHEI, O. 1992. Caracterización dendrológica de las especies leñosas del Fundo Escuadrón. Concepción (Chile). *Ciencia e Investigación Forestal* (Chile) 6(2);195-257.

ANEXOS

ANEXO 1 Fotografías de (A) hojas y (B) frutos de plantas de murta.



(A)



(B)

ANEXO 2 Sintomatología de escoba de bruja en murta.



ANEXO 3 Soluciones y reactivos para extraer ADN insectos y vegetales.

- Solución CTAB de extracción

2 y 3% p/v de CTAB

100 mM Tris-HCl pH 8.0

20 mM EDTA pH 8.0

1.4 M NaCl

Almacenar a T^o ambiente (estable por varios años)

- Solución CTAB de precipitación

1% p/v de CATB

50 mM Tris-HCl pH 8.0

10 mM EDTA pH 8.0

Almacenar a T^o ambiente (estable por varios años)

- TE alta concentración de sales

10 mM Tris-HCl pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Almacenar a T^o ambiente (estable por varios años)

- Tampón TE pH 8.0

10 mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

- CTAB/NaCl

10% p/v de CTAB

0.7 M NaCl

(Continúa)

Continuación Anexo 3

- Cloroformo-octanol (24/1 v/v)
- Cloroformo-alcohol isoamílico (24/1 v/v)
- Isopropanol (almacenado a -20°C)
- Etanol absoluto y 70% (almacenado a -20°C)

ANEXO 4 Concentraciones del ADN extraído de insectos y plantas.

Especies	Unidades de absorbancia	Concentración (ng/ml)
<i>C. ramosi</i> y <i>C. aureonitens</i>	0,181	4525
<i>P. rotundiceps</i> y <i>A. glaucus</i>	0,170	4250
Especie familia Psyllidae "1"	0,092	2300
Especie familia Cicadellinae	0,099	2475
Especie Typhlocybinae	0,094	2350
Especie familia Psyllidae "2"	0,079	1975
Murta <i>in vitro</i> (<i>Ugni molinae</i> Turcz.)	0,150	3750

* Nota: 1 unidad de absorbancia es igual a 50 $\mu\text{g/mL}$

ANEXO 5 Reactivos y soluciones para análisis de PCR.-Mix PCR

Tampón 10X	50 μ L
MgCl ₂	40 μ L
DNTPs mix	10 μ L
H ₂ O destilada	335 μ L
Volumen Mix	435 μ L

- Partidores fU5/rU3 (50pm/ μ L)
- Partidores GLUT1 y GLUT2
- Taq Polimerasa 25U/ μ L
- Vaselina

ANEXO 6 Protocolo de preparación de porta objetos, de inclusión y de fijación de los cortes histológicos de insectos. Usado en el Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

- Xilenización de porta objetos

Lavado: 15 min con detergente caliente

3 lavados con agua destilada

lavado por 10 min con agua destilada en agitación

lavado con etanol en agitación por 10 min

2 lavados con agua destilada autoclavada por 10 min cada uno

Lavado en APES (3-aminopropiltriethoxysilano)

Sumergir porta objetos por 9 min en solución 2% (v/v) acetona,

Lavar 2 veces con agua destilada autoclavada por 1 min

Secar toda la noche a 37°C

- Inclusión

1. lavar dos veces los insectos en etanol 96% por 10 min cada uno

2. lavar tres veces con etanol 100% por 10 min cada uno

3. lavar dos veces con xilol por 5 min cada uno

4. agregar parafina líquida y llevar a estufa

5. eliminar parafina

6. agregar nuevamente parafina y llevar a estufa

- Fijación

Una vez obtenidos los cortes seriado estos fueron fijados en formalina al 4%, y de allí montados en los porta objetos

ANEXO 7 Reactivos y soluciones de hibridación *in situ* Utilizadas en el Laboratorio Señalización Celular del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

- Marcaje de Sondas

Reactivos usados

1. Sondas fU5/rU3 (35 pm/ μ L)
2. Tampón 5X TdT
3. Dig Ud-UTP
4. daTP 9 mor
5. CaCl₂ 5 mor
6. Agua destilada libre de nitrógeno
7. TdT 25 U/ μ L

Procedimiento:

1. Las sondas fU5/rU3 fueron diluidas de una concentración inicial de 50 pm/ μ L a 35 pm/ μ L
2. Luego se le agregó a cada sonda (“sense” y “antisense”) los reactivos descritos en el punto anterior en la siguiente cantidad

Reactivo	Antisense	Sense
Buffer 5X TdT	2 μ L	2 μ L
Sondas 35 pm/ μ L	1 μ L	1 μ L
Dig Ud-UTP	0.5 μ L	0.5 μ L
daTP 9 mor	0.5 μ L	0.5 μ L
Cacl ₂ 5 mor	3 μ L	3 μ L
Agua destilada libre de N	2 μ L	2 μ L
TdT 25 U/ μ L	1 μ L	1 μ L

(Continúa)

Continuación Anexo 7

3. Cada sonda es incubada a 37°C por 60 min
4. Luego, son colocadas en hielo unos segundos y almacenados a -20°C

- Reactivos y soluciones empleadas en la hibridación *in situ*

1. Tampón #1: 100 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl pH 7.5
2. Tampón #2: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl y 50 mM MgCl₂
3. Tampón #3: 10 mM Tris-Hcl y 1 mM EDTA pH 8.0.
4. Tampón Citrato: 10 mM pH 6.0
5. Proteinasa K (1mg/ml), diluida en PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM fosfato de sodio y 1,8 mM fosfato de potasio)
6. Tampón Pre-hibridación:

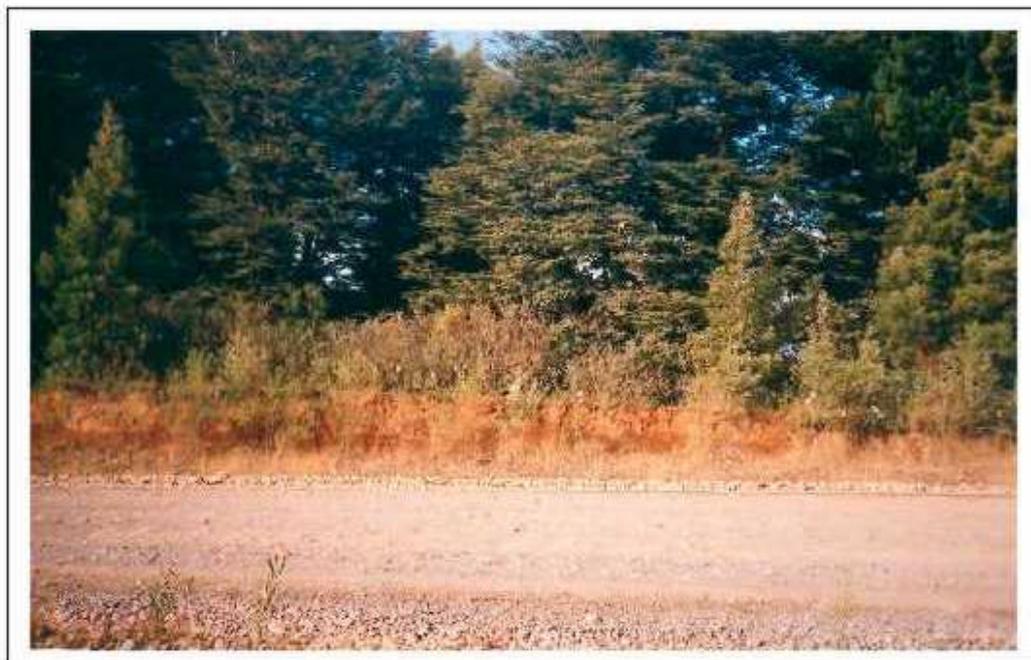
Reactivo	Cantidad
Formamida 100%	250 µL
20x SSC	100 µL
Dextran sulfato	100 µL
DNA	14.5 µL
RNA	12.5 µL
Denhardt	5 µL
EDTA	2 µL
Agua destilada estéril	66 µL

(Continúa)

Continuación Anexo 7

- Tampón de hibridación: (tampón de pre-hibridación (100 μ L) más sondas "sense" y "antisense" por separado (0.5 μ L cada una))
- 20X SSC, 2X SSc, 1X SSC y 0.5X SSC (3 M NaCl y 0,3 M citrato de sodio pH 7,2)
- Solución de bloqueo: BSA 1%, Triton X100 (0.3%) y tampón #1pH 7.0
- Anticuerpo antidioxigenina: anticuerpo 0.5 μ L más 250 μ L de solución de bloqueo
- Revelador: 1mL tampón #2, más 4.5 μ L NBT, 3.5 μ L BCIP y 1 μ L

ANEXO 8 Fotografías de los (A) bordes y de los (B) sectores colindantes al área de estudio.



(A) bordes

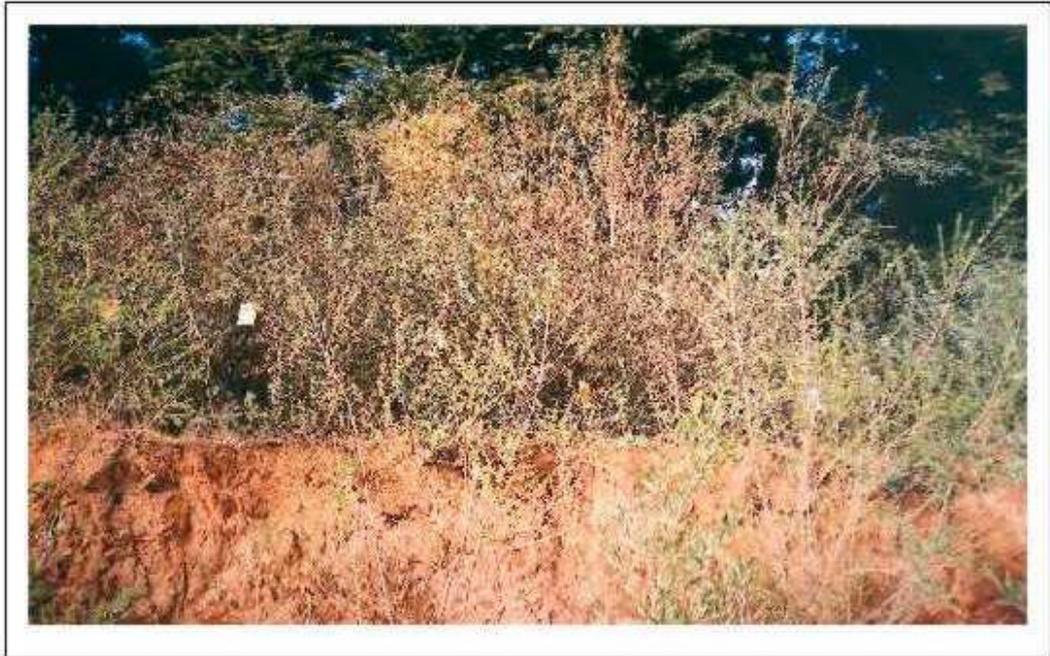
(Continúa)

Continuación Anexo 8



(B) sectores colindantes

ANEXO 9 Trampas de intercepción ubicadas en el (A) borde y en el (B) interior del área de estudio.



(A) Borde



(B) Interior

ANEXO 10 Fotografías de las trampas usadas con los dos colores bases utilizados, (A) amarillo fluorescente y (B) amarillo normal.



(A) amarillo fluorescente



(B) amarillo normal

Anexo 11 Registro de la cantidad de insectos colectados utilizando trampas amarillas durante la época de colecta.

fecha	19-03-01	30-03-01	07-04-01	16-04-01	28-04-01	26-12-01	01-01-02	09-01-02	18-01-02	08-02-02	18-02-02	28-02-02
Nº trampa												
1b	1	1	1	1	0	2	1	1	0	0	5	5
2b	0	1	1	0	1	2	1	0	0	1	5	2
3b	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	2	3
4b	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	3	0
5b	1	1	1	1	0	2	1	0	0	1	0	0
6b	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	2
7b	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
8b	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
9b	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	3	2
10b	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	4
11b	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	8	1
12b	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	3
13b	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
14c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
15c	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
16c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
17c	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0
18c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19c	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
20c	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
21c	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
22c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
23c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
24c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
25c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0

Anexo 12 Registro de la cantidad de insectos colectados utilizando trampas amarillas fluorescente durante la época de colecta.

fecha	19-03-01	30-03-01	07-04-01	16-04-01	28-04-01	26-12-01	01-01-02	09-01-02	18-01-02	08-02-02	18-02-02	28-02-02
Nº trampa												
1b	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	2	1
2b	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	2	1
3b	1	0	0	0	0	2	1	1	2	0	4	4
4b	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
5b	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	1	1
6b	2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	0
7b	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	5	1
8b	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	0
9b	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	2	0
10b	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	1	3
11b	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	1
12b	1	1	0	0	0	2	1	0	1	1	0	1
13b	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
14c	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	2
15c	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0
16c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
17c	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
18c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
19c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
20c	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
21c	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0
22c	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
23c	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
24c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0
25c	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0
26c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 13 Registro individual de las especies colectadas a lo largo de la etapa de supervisión.

Fecha	19-03-00	30-03-00	07-04-00	16-04-00	28-04-00	26-12-01
Especie						
C. aureonitens y C. ramosi	3	2	2	0	0	3
A. glaucus y P. rotundiceps	3	1	1	0	0	2
Typhlocybinae	4	2	3	2	0	5
Typhlocybinae y Cicadellinae	4	4	2	1	1	7
Psyllidae	1	2	0	0	0	8
Psyllidae	1	0	0	1	0	7

Fecha	01-01-02	09-01-02	18-01-02	08-02-02	18-02-02	28-02-02
Especie						
C. aureonitens y C. ramosi	2	1	2	7	8	12
A. glaucus y P. rotundiceps	2	2	0	0	4	4
Typhlocybinae	1	0	0	3	13	10
Typhlocybinae y Cicadellinae	10	7	11	9	9	4
Psyllidae	12	12	4	7	10	5
Psyllidae	10	7	11	9	9	4

ANEXO 14 Análisis de varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Mean Square	F-Ratio	p-Value
Color	0,00384615	1	0,00384615	0,00	0,9551
Meses	177,131	4	44,2827	36,59	0,0000
Ubicación	74,3115	1	74,3115	61,40	0,0000
Interacciones					
Color- meses	9,13077	4	2,28269	1,89	0,1135
Color-ubicación	0,0346154	1	0,0346154	0,03	0,8658
Meses-ubicación	32,1308	4	8,03269	6,64	0,0000
Color-meses-ubicación	4,1	4	1,025	0,85	0,4967
Residuos	290,462	240	1,21026		
Total (Corr.)	587,304	259			

ANEXO 15 Comparación entre las distintas épocas de colecta por medio de un análisis de Andeva factorial.

Prueba de rango múltiple para las distintas fechas de colecta: Método 95% Tukey HSD.

Meses	Nº Total de trampas	Promedios	Grupos Homogéneos
abril	52	0,326923	X c
marzo	52	0,423077	X c
diciembre	52	0,634615	Xc
enero	52	1,51923	X b
febrero	52	2,5	X a

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas

ANEXO 16 Comparación entre los distintos colores usados en las trampas durante la época de colecta por medio de Andeva factorial.

Prueba de rango múltiple para los distintos colores utilizados: Método 95% Tukey HSD

Colores	Nº trampas por meses de colecta	Promedios	Grupos Homogéneos
Amarillo fluorescente	130	1,07692	X
Amarillo normal	130	1,08462	X

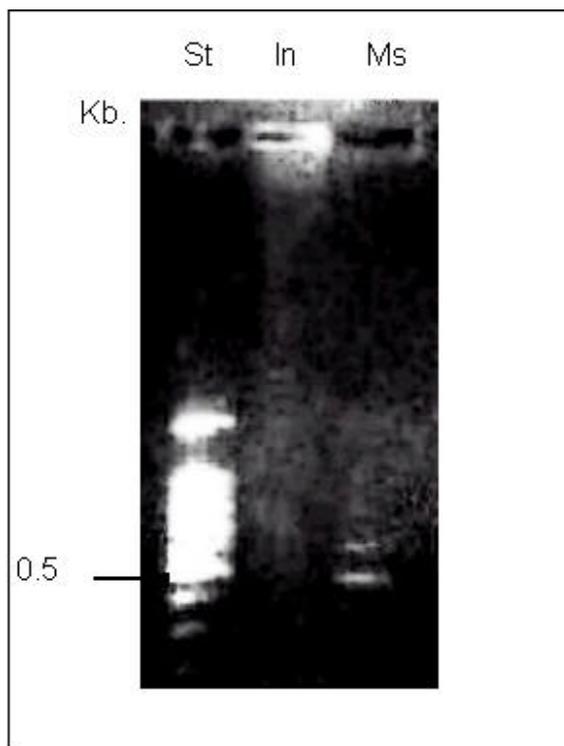
ANEXO 17 Comparación entre las diferentes ubicaciones de las trampas dentro del sector de colecta, mediante Andeva factorial.

Prueba de rango múltiple para las distintas ubicaciones de las trampas: Método 95% Tukey HSD

Ubicación	Nº trampas por meses de colecta	Promedios	Grupos Homogéneos
interior	130	0,546154	X b
borde	130	1,61538	X a

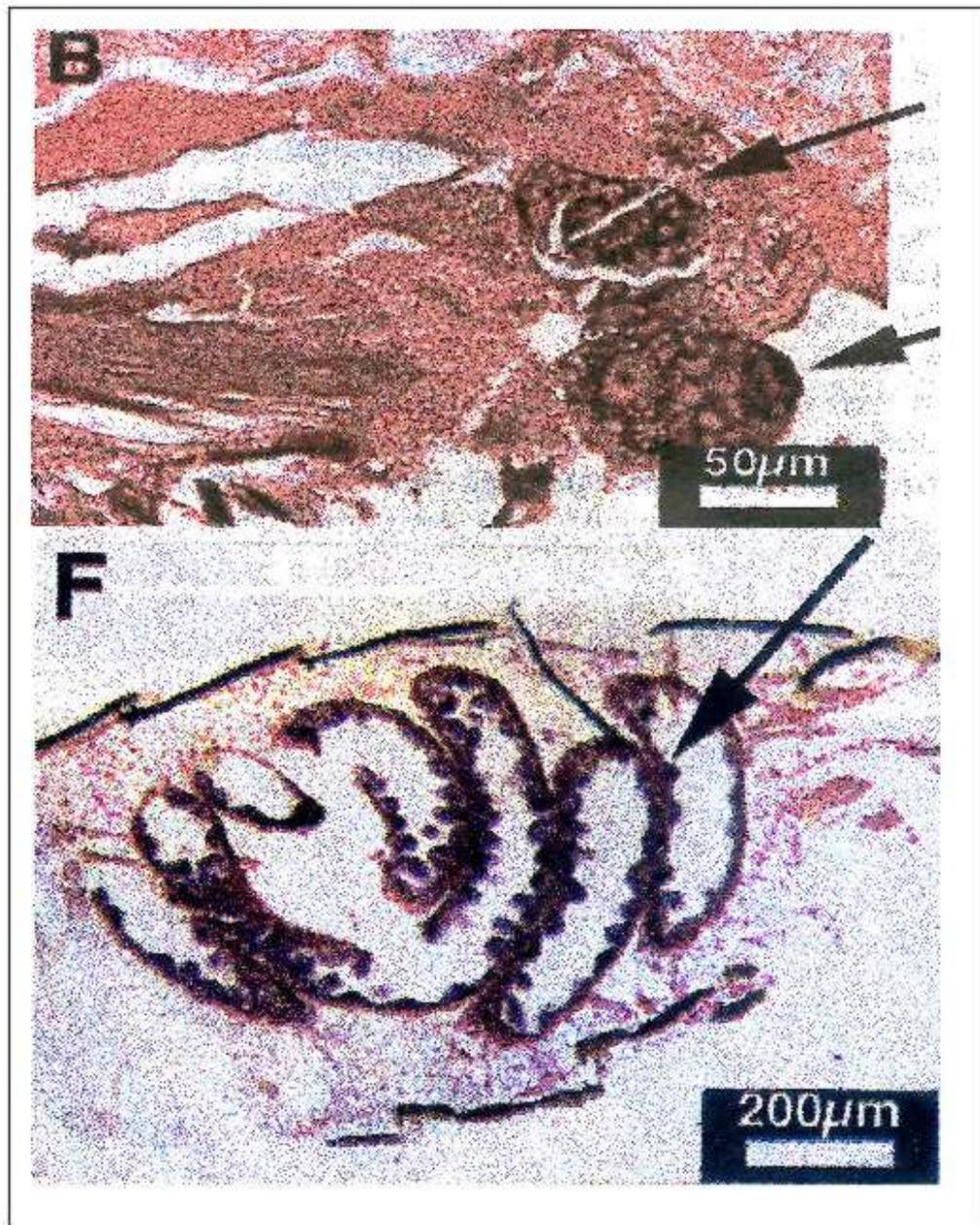
*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas

ANEXO 18 Fotografía Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR teñidos con bromuro de etidio. Usando los primer GLUT1 y GLUT2.



St: Marcador de peso molecular, 1: *Carelmapu aureonitens* y *Carelmapu ramosi*, y M: murta *in vitrosana*.

ANEXO 19 Hibridaciones *in situ* realizadas en *Euscelidius variegatus*, en (B) glándulas salivales e (F) intestinos.



FUENTE: WEBB *et al.* (1999).

ANEXO 20 Fotografía de análisis Southern blot efectuado en sondas fU5/rU3. (A) “sense” (fU5), (B) “antisense” (rU3) y (C y D) control.

