

**ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE RECURSOS NATURALES Y CONSERVACION
BIOLOGICA**

**RESISTENCIA GENETICA EN *Gliricidia sepium* (Kunth.) A
LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUEÑA, SU
DESARROLLO Y TRANSMISION**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al
título de Ingeniero Agrónomo en el grado
académico de licenciatura

por:

Tania Jordán Barros

Honduras, 15 de abril de 1997

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Tania Jordán B.

Honduras, 15 de abril de 1997

**RESISTENCIA GENETICA EN *Gliricidia sepium* (Kunth.) A LA
ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUEÑA, SU DESARROLLO Y
TRANSMISION**

Por

Tania Jordán Barros.

Aprobada:

Sarah Gladstone, Ph.D.
Asesor principal

Silvia Chalukian, Msc..
Coordinador PIA

Michael Zeiss, Ph.D.
Asesor

George Philz, Ph.D.
Jefe de Dpto.

Phil Arnerson, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano académico

Keith Andrews, Ph.D.
Director

DEDICATORIA

A mis padres queridos Alvaro y Marina , a los cuales les debo gran parte de lo que soy, por hacerme sentir su amor, apoyo, confianza en todo momento y brindarme el regalo maspreciado que pudieron darme: infundirme confianza en mí misma para luchar por mis metas.

A mis hermanas Indiana y Anahí por compartir conmigo su amistad, cariño y apoyo; gracias.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros que he formado en este tiempo, lejos de mi patria; un sincero agradecimiento, estoy a su disposición cuando lo necesiten.

A los amigos de siempre una gracias por el apoyo dentro de la escuela y en la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera han contribuido en mi formación y en la elaboración de este proyecto.

A mis asesores Dra. Sally Gladstone, Dr. Michael Zeiss y Dr. Phil Arneron un agradecimiento especial por su tiempo, orientación y ayuda en todo momento. Al Dr. Francisco Gomez por su ayuda desinteresada.

Al Dr. Lawrence Kenyon, Dr. Erick Boa y Dr. Robert Black del Natural Resources Institute por sus consejos y el financiamiento de los gastos de esta tesis .

A la Embajada Británica por confiar en mí al otorgarme la beca que hizo posible la culminación de mis estudios de Ingeniería.

Al personal del departamento de Protección Vegetal por la colaboración prestada en todo momento.

Resumen

Gliricidia sepium (Kunth) es un árbol usado para postes vivos, leña, y alimento para el ganado en países en vías de desarrollo como Centroamérica, África y Asia. El Instituto Forestal de Oxford reporta la enfermedad de la hoja pequeña (EHP) en el árbol (1996). El agente causal es un fitoplasma similar al responsable de la "escoba de bruja" en la leguminosa *Cajanus cajan*. En este estudio se buscó resistencia genética a la EHP, se hicieron pruebas de transmisión y se estableció datos base para un estudio a largo plazo de el desarrollo de la enfermedad en diez árboles.

Se evaluó resistencia genética a la enfermedad de la hoja pequeña en árboles provenientes de 24 lugares, donde se formaron ecotipos llamados procedencias, de las cuales 22 se encuentran en Mesoamérica y dos de Tailandia. Para esto se usó una parcela establecida el 1987 por OFI en Zamorano, con un Diseño de Bloques Completos al Azar con tres replicas de cada procedencia. Se hizo una análisis de varianza, usando un modelo de medias repetidas en el tiempo para evaluar incidencia y mortalidad. Se observó que la procedencia con menor mortalidad, incidencia y expresión de síntomas fueron: Vado Hondo de Guatemala, Estelí de Nicaragua, Managua de Nicaragua, Guayabilla de Honduras, con un rango de 2 % al 8% de mortalidad y de 36% al 45 % de incidencia.

Se hizo un levantamiento de la fauna insectil identificandose ocho insectos asociados al árbol. Se probaron dos insectos como posibles vectores: *Empoasca hastosa* y *Alconerura* prob. *pseudoobliqua*. (Homoptera: Cicadellidae). Estos insectos fueron expuestos en ramas enfermas para que adquirieran la enfermedad y luego ser transferidos en plantas sanas para verificar la transmisión de la enfermedad. Las pruebas fueron negativas, no detectaron la presencia del fitoplasma en hojas expuestas al vector y en vectores. Antes de descartar estos insectos como vectores se está recomendando hacer una concentración previa del ADN y aumentar el número de ciclos al correr la prueba de la Reacción en la Cadena Polimérica (RCP), para obtener resultados más sensibles a la presencia de fitoplasma.

TABLA DE CONTENIDO

Portadilla.....	i
Derechos de autor.....	ii
Hoja de aprobación de tesis.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Indice de Tablas.....	vii
Indice de Figuras	viii
Indice de Anexos.....	ix
I. INTRODUCCION.....	1
II. RESISTENCIA GENETICA EN <i>Gliricidia sepium</i> A LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUENA.	
2.1 INTRODUCCION.....	3
2.2 OBJETIVOS.....	4
2.3 MATERIALES Y METODOS.....	4
2.3.1 Diseño del ensayo.....	4
2.3.2 Variables medidas.....	7
a) Mortalidad.....	7
b) Síntomas de la enfermedad.....	7
c) Evaluación cualitativa.....	9
2.4 RESULTADOS.....	10
2.4.1 Mortalidad.....	10
2.4.2 Incidencia.....	14
2.4.3 Severidad de síntomas de la enfermedad.....	17
2.4.4 Evaluación cualitativa.....	25
2.5 DISCUSION.....	31
2.6 CONCLUSIONES.....	34
2.6.1 Mejores procedencias.....	34
2.6.2 Distribución de las mejores procedencias.....	34
2.6.3 Relaciones entre procedencias y síntomas.....	34
2.6.4 Procedencias óptimas según su uso.....	35
2.7 RECOMENDACIONES.....	35

III. DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUENA EN *Gliricidia sepium* (Kunth)

3.1 INTRODUCCION.....	36
3.2 OBJETIVOS.....	37
3.3 MATERIALES Y METODOS.....	37
3.3.1 Características del árbol.....	38
3.3.2 Distribución de la enfermedad.....	39
3.3.3 Intensidad de la enfermedad.....	40
3.3.4 Características de la enfermedad.....	40
3.4 RESULTADOS.....	42
3.4.1 Características del árbol.....	42
3.4.2 Distribución de la enfermedad.....	43
3.4.3 Intensidad de la enfermedad.....	44
3.4.4 Características de la enfermedad.....	44
3.5 DISCUSION.....	45
3.6 CONCLUSIONES.....	46
3.7 RECOMENDACIONES.....	46

IV. TRANSMISION DEL FITOPLASMA CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUENA EN *Gliricidia sepium* (Kunth)

4.1 INTRODUCCION.....	49
4.2 OBJETIVOS.....	50
4.3 MATERIALES Y METODOS.....	50
4.3.1 Levantamiento de insectos.....	50
4.3.2 Cría de <i>Empoasca hastosa</i>	51
4.3.3 Estudios de transmisión de la enfermedad.....	51
a) <i>Empoasca hastosa</i>	51
b) <i>Alconeura sp...</i>	52
c) Método de diagnóstico.....	53
4.4 RESULTADOS y DISCUSION.....	
4.4.1 Insectos asociados con <i>Gliricidia sepium</i>	54
4.4.2 Cría de <i>Empasca hastosa</i>	54
4.4.3 Metodología de pruebas de vectoraje.....	55
4.4.4 Identificación del insecto vector.....	56
4.6 CONCLUSIONES.....	57
4.7 RECOMENDACIONES.....	57
5. BIBLIOGRAFIA.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Procedencias incluidas es el estudio de resistencia a la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i>	4
Tabla 2.	Niveles de síntomas de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i>	8
Tabla 3.	Categorías con las que se evaluó el crecimiento, distribución de la hoja pequeña y posición de la muerte de ramas del árbol en la parcela (Zamorano, Honduras 1997).....	10
Tabla 4.	Resultados de mortalidad con datos de altitud y precipitación del estudio de resistencia a la enfermedad de la hoja pequeña.	13
Tabla 5.	Resultados de incidencia con datos de altitud y precipitación del estudios de resistencia a la enfermedad de la hoja pequeña.....	16
Tabla 6.	Análisis del χ^2 del grado de asociación de severidad general y síntomas específicos evaluados con procedencia.....	17
Tabla 7.	Análisis de la asociación de tres características de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	25
Tabla 8.	Red de parcelas de OFI de <i>Gliricidia sepium</i> con las mejores procedencias evaluadas.....	33
Tabla 9.	Grado de severidad en número de árboles monitoreados (Zamorano, Honduras 1997).....	37
Tabla 10.	Ubicación geográfica y altitud de diez árboles monitoreados en el estudio del desarrollo de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	38

Tabla 11. Características físicas usadas en el monitoreo de árboles con la enfermedad de la hoja pequeña. (Zamorano, Honduras 1997).....	39
Tabla 12. Grado de severidad de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	40
Tabla 13. Categorías usadas en la evaluación de las características de los síntomas de la enfermedad en diez árboles de <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	41
Tabla 14. Características del desarrollo de la enfermedad de la hoja pequeña en diez árboles de <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	42
Tabla 15. Distribución de los síntomas de la enfermedad de la hoja pequeña evaluados en diez arboles de <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	43
Tabla 16. Intensidad de la enfermedad de la hoja pequeña evaluados en diez arboles de <i>Gliricidia sepium</i> (Zamorano, Honduras 1997).....	44
Tabla 17. Características de la enfermedad de la hoja pequeña evaluados en diez árboles de <i>Gliricidia sepium</i> (Zamorano, Honduras 1997)	45
Tabla 18. Formulas de color PANTONE que definen el color el color amarillento y saludable en los arboles de <i>Gliricidia sepium</i>	47
Tabla 19. Longevidad de <i>Empoasca hastosa</i> en plantas sanas durante 35 días de transmisión.....	52
Tabla 20. Longevidad de <i>Alconeura sp.</i> en plantas sanas durante 13 a 37 días de transmisión.....	53
Tabla 21. Insectos asociados al árbol de <i>Gliricia sepium</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de origen de procedencias usadas en el ensayo de resistencia genética en <i>Gliricidia sepium</i> a la enfermedad de la Hoja pequeña (Zamorano, Honduras 1997).....	4
Figura 2. Diagrama de selección de árboles por parcela.....	8
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Gliricidia sepium</i> por porcentaje de mortalidad (Zamorano, Honduras 1997).....	12
Figura 4. Distribución geográfica de procedencias según incidencia de la enfermedad de la Hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> (Zamorano, Honduras 1997).....	15
Figura 5. Severidad de la enfermedad de la hoja pequeña en 24 procedencias. Primera toma de datos (Zamorano, Honduras 1997)	18
Figura 6. Severidad de la enfermedad de la hoja pequeña en 24 procedencias. Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).	19
Figura 7. Grado de amarillamiento, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Primera toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).....	20
Figura 8. Grado de amarillamiento, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).....	21
Figura 9. Grado de muerte de ramas, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Primera toma de datos. (Zamorano, Honduras 1997).	22

Figura 10. Grado de muerte de ramas, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).	23
Figura 11. Grado de Hoja pequeña, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Primera toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).	24
Figura 12. Grado de Hoja pequeña, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).	25
Figura 13. Crecimiento del árbol en 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . Primera toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).....	26
Figura 14. Crecimiento del árbol en 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).	27
Figura 15. Distribución de la reducción de la hoja en el árbol, un síntoma de la enfermedad de la Hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Primera toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).....	28
Figura 16. Distribución de la reducción de la hoja en el árbol, un síntoma de la enfermedad de la Hoja pequeña en <i>Gliricidia sepium</i> . Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).....	29
Figura 17. Posición de la muerte de ramas en 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . Primer toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997).....	39
Figura 18. Posición de la muerte de ramas en 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . Segunda toma de datos. (Zamorano, Honduras 1997).....	30
Figura 19. Distribución de los cuadrantes del árbol.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Esquema del diseño de la parcela con 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras - 1997).....	62
Anexo 2.	Formulario usado para estimar la severidad de los árboles muestreados en la estimación de los síntomas de la enfermedad de la hoja pequeña. (Zamorano, Honduras - 1997).....	63
Anexo 3.	Análisis de varianza múltiple que muestra la correlación de los síntomas de la primer toma de datos (Zamorano, Honduras 1997).....	64
Anexo 4.	Análisis de varianza múltiple que muestra la correlación de los síntomas de la segunda toma de datos. (Zamorano, Honduras 1997).....	64
Anexo 5.	Análisis de varianza y separación de medias del porcentaje de mortalidad causada por la enfermedad de la hoja pequeña en 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	65
Anexo 6.	Análisis de varianza y separación de medias del porcentaje de mortalidad causada por la enfermedad de la hoja pequeña en 24 procedencias de <i>Gliricidia sepium</i> . (Zamorano, Honduras 1997).....	66
Anexo 7.	Formulario usado para calificar el desarrollo de la enfermedad de la hoja pequeña. (Zamorano, Honduras, 1997).....	67
Anexo 8.	Datos anuales de precipitación y temperatura. Periodo entre marzo de 1996 hasta marzo de 1997. (Zamorano, Honduras, 1997).....	68

I. INTRODUCCIÓN

Gliricidia sepium (Kunth) es un árbol de la tribu Robinieae, sub-familia Papilionoidae, familia Leguminosae (Lavin, 1996). Este es un árbol nativo de México y América Central adaptado a una estación seca bien definida, introducido en muchas zonas tropicales y naturalizado en otros países (CATIE, 1991).

Este árbol tiene importancia en los países en vías de desarrollo, en Centroamérica y África por sus múltiples usos como: fuente de leña; cercos vivos; postes de casa; control de infecciones fúngicas en la cara; alimento para el ganado; materia verde; control de ratas; fuentes de sombra para cafetales, cacaoales y té; soporte en el cultivo de vainilla, pimienta negra y ñame; y en cultivos de callejones (Mackenzie, 1995; CATIE 1991). El árbol también tiene características biológicas favorables como una buena adaptación a la sequía, facilidades propagativas ya sea por semilla ó por estaca y buena producción de biomasa.

Estudios recientes hechos por Boa y Lenne (1996) detectaron treinta patógenos fúngicos relacionados al árbol pero afirman, que las condiciones ambientales no favorecen el desarrollo de estos. Dos enfermedades merecían una especial atención en poblaciones naturales en Centroamérica, un posible virus (moteado y hojas de cuerda) y la enfermedad de la hoja pequeña (EHP) causada por un fitoplasma.

Posteriormente estudios hechos por el Instituto Forestal de Oxford (OFI), identificaron que esta enfermedad es la llamada ‘escoba de bruja’ presente en ***Cajanus cajan***. El agente causal es un fitoplasma según estudios de Maramorosch, K. et. al., McCoy R 1983, Chen, et al 1986, Kitajima E. (McCoy et. al. 1989).

Harrison¹ (comunicación personal) hizo las comparaciones de las bandas de los dos fitoplasmas para confirmar esto.

La forma más fácil de distinguir visualmente la EHP en ***G. sepium*** es por los pequeños ramilletes con hojas reducidas y a veces distorsionadas. La sintomatología va acompañada de amarillamiento de hojas, reducción de la distancia entrenudos, caída de hojas y ramas muertas.

El vector de la enfermedad aún no se conoce, como tampoco se sabe si hay material genético resistente a ella para evitar daños y por la novedad de la enfermedad aún es necesario describirla mejor.

¹ Dr. Nigel Harrison, Universidad de Florida en Fort Lauderdale (USA)

II. RESISTENCIA GENÉTICA EN *Gliricidia sepium* A LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUEÑA

2.1 INTRODUCCIÓN

Cuando encontramos un árbol de *Gliricidia sepium* con la enfermedad de la hoja pequeña (EHP) en el sistema de la finca, nos representa una perdida mayor a la que nos causaría una planta anual o bianual, por ser mayor el periodo comprendido entre la siembra hasta su aprovechamiento. Las enfermedades fitoplasmáticas como la EHP no tienen medidas curativas solo paliativas como es el uso de tetraciclina, razón que resalta lo importante que es prevenirlas. El uso de ecotipos o procedencias con semilla o material vegetativo resistente a la enfermedad de la hoja pequeña es la manera más práctica y económica en que un productor puede evadir este problema.

Para detectar una base genética a la resistencia en árboles de *G. sepium* se evalúa el impacto de la enfermedad en un ensayos llamado “Jardín común”, que consisten en establecer arboles de varias procedencias en un mismo sitio a manera de homogeneizar el efecto del medio ambiente y poder ver con más claridad la respuesta genética a evaluar (EHP). El Instituto Forestal de Oxford (OFI), montó una serie internacional de ensayos de procedencias donde evaluó, largura del tallo, producción de biomasa y de leña. Estos ensayos fueron hechos en Australia, Benin, Burundi, Camerún, Ghana, Haití, India, Indonesia, Kenya, Malasia, Nepal, Nigeria, Pakistán, Perú, Ruanda, Senegal, Sierra Leona, Sri Lanka, Tanzania, USA, Zaire y Zambia. (OFI, 1996). Gracias a estos estudios actualmente se conocen procedencias seleccionadas por parámetros productivos, siendo el reto de este estudio poder equilibrar esta selección, con resultados de la selección en base a resistencia genética a la (EHP).

De 1984 al 1986 OFI recolectó semillas en 28 lugares de origen y dos de Tailandia. Los lugares nativos se encontraron en los países de Venezuela, Colombia, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, México y Tailandia. La mayoría son del Área Costera del Pacífico de Centroamerica, Valles Secos, Costa de México, el Centro de Honduras, Colombia y Venezuela. De estas, ocho procedencias se descartaron, por medio de pruebas preliminares en la localidad de Los Mangos (San Pedro Sula, Honduras), por mostrar muerte de ramas, stress y ataque de insectos. La semilla recolectada no ha sido seleccionada por el hombre previamente y se cree que la varianza genética es producto en su mayoría a adaptaciones ambientales mas que a actividades humanas (Simons, 1996).

La recolección de semilla tuvo como objetivo ser usada en estudios del árbol, orientados al entendimiento de su taxonomía, distribución, amplitud ecológica, fenología, sistema de mejoramiento y patrones de variaciones (Hughes, 1987). Paralelamente se establecieron parcelas con otros objetivos, los cuales buscaban evaluar las diferentes procedencias por su producción de leña, adaptación a zonas secas, respuesta al estrés y ataque de insectos. Se buscaba comparar entre lugares de experimentación para conocer la interacción ambiental. Una parcela se montó en la Escuela Agrícola Panamericana con estos fines y posteriormente nos proveyó la oportunidad de examinar la resistencia genética a la EHP.

2.2 OBJETIVOS

- Conocer cuales procedencias en el jardín común de la EAP tienen menor mortalidad.
- Determinar la varianza en la incidencia de la enfermedad entre procedencias.
- Determinar la varianza en severidad de la enfermedad de la hoja pequeña y la expresión de síntomas entre procedencias.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Diseño del ensayo

El ensayo consistió en parcelas sembradas con material de 22 procedencias nativas y dos exóticas de Tailandia (Gráfico 1, Tabla 1). Se sembró en 1987, en los predios de la Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano, Honduras) en coordinación con Coordinación Nacional de Servicios Forestales de Honduras (CONSEFORH). Está ubicada a 800 msnm, 14 ° 00' de latitud norte y 87° 02' longitud oeste. La zona tiene una temperatura máxima de 36,3 °C, mínima de 28,9 °C y una media de 32,9 °C también registra una precipitación promedio de 1132 mm/año. El diseño del ensayo fue de bloques completos al azar, con tres replicas de cada procedencia. Cada procedencia consistió en 35 árboles en 105 m². El espaciamiento de los árboles fue de un metro dentro de cada fila y tres metros entre filas (Anexo 1). El estudio presente comenzó en julio de 1996 y terminó en febrero del 1997. La parcela tuvo tres limpiezas al año previas a cada muestreo.

Tabla 1. Procedencias incluidas en el estudio de resistencia a la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*.

Nro. De Sitio	Código	Procedencia	País	Altitud (msnm)	Precipitación (mm)
1	55/87	Mariara	Venezuela	20	800
2	60/87	Bolívar	Colombia	20	950
3	58/87	Padesí	Panamá	20	850
4	56/87	El Roblar	Costa Rica	20	1000
5	57/87	Playa Tamarindo	Costa Rica	10	1500
6	59/87	Belén Rivas	Nicaragua	75	1650
7	45/87	Managua	Nicaragua	60	1100
8	44/87	Estelí	Nicaragua	605	800
9	41/87	Guayabillas	Honduras	480	1400
10	42/87	Mansaguara	Honduras	825	1100
11	38/87	Gualán	Guatemala	150	700
12	39/87	Vado Hondo	Guatemala	450	830
13	36/87	Volcán Suchitlan	Guatemala	950	1060
14	40/87	Monterrico	Guatemala	5	1650
15	37/87	Rethaluleu	Guatemala	330	3500
16	53/87	Arriaga	México	30	1790
17	48/87	San Mateo	México	10	950
18	47/87	Palmasola	México	10	1130
19	46/87	Los Amates	México	100	650
20	52/87	San José	México	30	1400
21	51/87	Playa Azul	México	30	900
22	54/87	Chamela	México	60	905
23	62/87	Chumpón	Tailandia	--	--
24	63/87	Phetchaburí	Tailandia	--	--

Fuente: OFI-1996.

* Al momento de la siembra en 1989 las semillas fueron inoculadas con *Rizhobium*.

2.3.2 Variables Medidas

a. Mortalidad

Mortalidad se evaluó en todos los árboles de la parcela en dos fechas, 23 de agosto 1996, 16 de noviembre 1996.

Para el conteo, cinco personas caminaron simultáneamente sobre una fila asignada; de esta manera reportaron los arboles muertos a quien tomaba los datos en el diagrama de la parcela. Se registró el número y disposición espacial de cada árbol muerto, esto fue importante para detectar arboles cortados para leña por habitantes aledaños a la zona. El árbol fue reportado muerto cuando no se observó ninguna hoja o brote verde en él.

Cálculo y análisis de mortalidad

Para calcular el porcentaje de mortalidad, se descontó al valor de mortalidad, los árboles sacados para leña por vecinos de la parcela fueron considerados como se reportaron en la toma de dato inicial. Este valor corregido se dividió entre los 35 árboles originales de cada parcela y fue multiplicado posteriormente por cien.

La variable mortalidad se analizó por medio de un análisis de varianza, usando un modelo de medidas repetidas en el tiempo. Se hizo un ANDEVA para probar la hipótesis nula, que todas las procedencias tienen igual mortalidad. Luego se analizó los residuales para buscar observaciones fuera de rango. La prueba Student-Newman-Keuls (SNK) sirvió para la separación de medias. Todos los análisis se realizaron con el paquete Statistical Application System (SAS, 1985).

Las 12 procedencias con medias de porcentaje de mortalidad mas baja fueron ubicadas en un mapa geográfico para ver si respondían a algún patrón de dispersión geográfico y fueron analizadas en cuanto a sus características geofísicas, climáticas y de precipitación.

b. Síntomas de la enfermedad

Se calculó incidencia y severidad general de la enfermedad anotando los tres síntomas componentes de esta: amarillamiento, hoja pequeña y muerte de ramas (Boa 1996). La evaluación se hizo en los primeros siete arboles internos de cada parcela sin contar los arboles muertos (Figura 2). Recolectamos datos el 23 de agosto y 16 de noviembre de 1996.

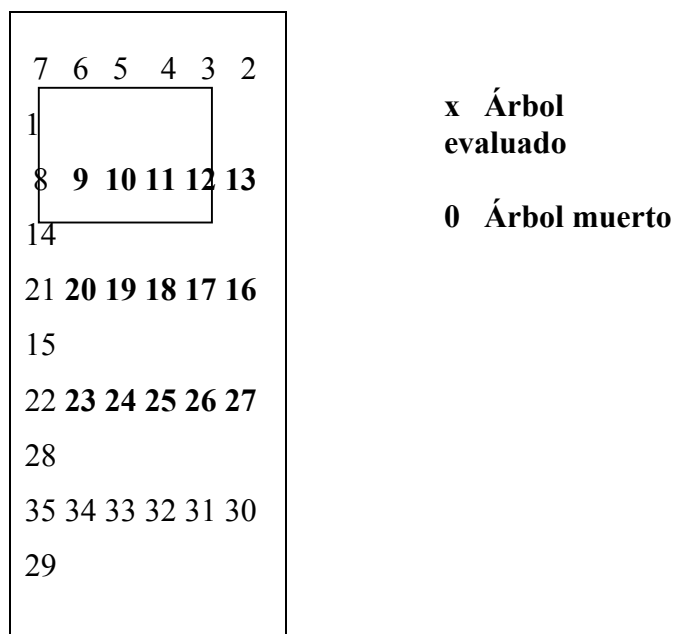


Figura 2 : Diagrama de selección de árboles por parcela

Lista y comentarios de síntomas usados

Se evaluó el amarillamiento, muerte de ramas y hoja pequeña. Para cada síntoma, se anotó la proporción del árbol afectados, usando una escala (Tabla 2). En esta evaluación se usó el formulario diseñado por E.Boa² (1996) (Anexo 2).

Estimamos la severidad general como una apreciación general de la enfermedad en el árbol, se hace en el campo como un resumen del impacto de los tres síntomas anteriores. Se hicieron análisis de varianza múltiple correlación entre los síntomas, para las dos fechas (Anexo 3 y 4) para se usados en otros estudios mas profundos en el tema.

Tabla 2. Niveles de síntomas de la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*

Calificación	Severidad	Proporción del árbol afectada
0	Saludable	0
1	Menor	< 1/4
2	Moderado	1/4 a 1/2
3	Severo	> 1/2
4	Muerto	1

² Fitopatólogo del Instituto de Recursos Natures (NRI).

Cálculo y análisis de incidencia

Los datos de incidencia se normalizaron como porcentaje, dividiendo el número de árboles enfermos que tenían severidad menor, moderado, severo y muerto (Tabla 2) sobre número total muestreado (en total 21), multiplicado por cien.

Se analizó incidencia por medio de una análisis de varianzas, usando un modelo de medias repetidas en el tiempo. Utilizamos ANDEVA para probar la hipótesis nula, que afirma que todas las procedencias tienen igual incidencia de la enfermedad. (Anexo 5).

La prueba Student-Newman-Keuls (SNK) se usó para la separación de medias.

Las 12 procedencias con medias de incidencia menor fueron ubicadas en un mapa geográfico para ver su agrupación espacial por sus características geofísicas, climáticos y altitudinales.

Cálculo y análisis de severidad

La clasificación de cada árbol entre cinco categorías saludable, mínimo, moderado y severo y muerto según el porcentaje de árbol afectado, sirvió para conocer la severidad general de la enfermedad en el árbol y la severidad de cada síntoma (amarillamiento, muerte de ramas y hoja pequeña). Se probó la independencia de severidad general y severidad de cada síntoma de procedencia, por medio de una prueba Chi cuadrado.

c. Evaluación cualitativa

Se evaluó otras características del árbol que podrían ser parte de la sintomatología de la enfermedad. Estas fueron crecimiento del árbol, distribución de la hoja pequeña y posición de la muerte de ramas (Tabla 3).

Tabla 3. Categorías con la que se evaluó el crecimiento, distribución de la hoja pequeña y posición de la muerte de ramas del árbol en la parcela. (Zamorano, Honduras 1997)

Crecimiento		
Calificación	Descripción	Aclaración
1	Normal	Si el árbol tiene el mismo tamaño al de los de su procedencia
2	Bajo ó alto	El árbol es más alto ó más pequeño que los de su procedencia
Distribución de la hoja pequeña		
Calificación	Descripción	Aclaración
0	Ausente	No hay presencia de hojas pequeñas en él árbol
1	No se distingue	El árbol tiene todas sus hojas pequeñas ó hay sospecha que hay solo en la punta de las ramas
2	En Ramas	Se distingue hoja pequeña en ramas
3	Con muerte de ramas	Se distingue hoja pequeña con muerte de ramas
Posición de muerte de ramas		
Calificación	Descripción	Aclaración
0	Ausencia	No hay muerte de ramas.
1	Alto	Se presenta muerte de ramas en la parte alta del árbol.
2	Baja	Se presenta muerte de ramas en las parte baja del árbol.

La independencia de cada variable de procedencia fue probada por medio de una prueba de Chi cuadrado.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Mortalidad

Se observó una diferencias altamente significativa ($p = 0.0001$) entre procedencias en cuanto a la mortalidad de árboles. (Anexo 5). Procedencia explicó el 98% de la variabilidad expresada en la mortalidad de plantas. El efecto de las fechas fue significativo ($p = 0.01$). La interacción entre procedencia y fecha no fué significativa por lo cual no se justificó hacer un análisis por fecha.

Las procedencia 39.87 Vado Hondo, 36.87 Volcán Suchitlan de Guatemala; 41.87 Guayabillas de Honduras; 45.87 Managua y 44.87 Estelí de Nicaragua con un rango de 1.7 a 6.6 % de mortalidad presentaron menor mortalidad debido a la enfermedad que las procedencias 48.87 San Mateo de México y 37.87 Rethaluleu de Guatemala, que tuvieron los mayores índices de mortalidad con una media de mortalidad 36% y 37% respectivamente. En base a mortalidad se agruparon cinco grupos (Tabla 4).

La distribución geográfica de las 12 procedencias con menor mortalidad (Figura 3) mostró una agregación en los países de Guatemala 4, Honduras 2, Tailandia 1, Nicaragua 3, Costa Rica 1, Panamá 1. Mientras que las procedencias de mayor mortalidad están en los extremos de Centroamérica y Sudamérica: Venezuela 1, Colombia 1, México 7, Costa Rica 1, Tailandia 1 y Guatemala 1.

La distribución de las 12 procedencias con altitudes de origen mas alto coincide en un 66.66% con las 12 procedencias con menor mortalidad y un 75% con los 12 lugares mas secos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de mortalidad con datos de altitud y precipitación del estudio de resistencia a la enfermedad de la hoja pequeña.

Procedencia	Mortalidad %	SNK*	Altitud msnm	Precipitación mma
39.87 Vado Hondo- Guatemala	2	c	450	830
36.87 Volcan Suchitlan -Guatemala	4.5	c	950	1060
45.87 Managua - Nicaragua	5.0	c	60	1100
41.87 Guayabilla - Honduras	5.8	c	480	1400
44.87 Estelí - Nicaragua	7.7	c	605	800
42.87 Mansaguara - Honduras	10.2	bc	825	1100
57.87 Playa Tamarindo - Costa Rica	13.8	bc	10	1500
63.87 Patchiburí - Thailandia	15.3	bc	-	-
40.87 Monterrico - Guatemal	18.0	bac	5	1650
38.87 Gualán - Guatemala	18.8	bac	150	700
59.87 Belén Rivas - Nicaragua	19.0	bac	75	1650
58.87 Padesí - Panamá	21.5	bac	20	850
51.87 "Playa Azul - México	23.0	bac	30	900
47.87 Palmasola - México	24.7	bac	10	1130
56.87 El Roblar - Costa Rica	25.2	bac	20	1000
53.87 Arriaga - México	26.2	bac	30	1790
52.87 San José - México	26.2	bac	30	1400
46.87 Los Amates - México	27.3	bac	100	650
54.87 Chamela - México	28.0	bac	60	905
55.87 Mariara - Venezuela	28.6	bac	20	800
60.87 Bolivar - Colombia	29.8	bac	20	950
62.87 Chumpón - Thailandia	35.2	ba	-	-
37.87 Rethaluleo - Guatemala	42.0	a	330	3500
48.87 San Mateo - México	42.5	a	10	950
RESULTADOS DEL ANDEVA				
P > F	0.0001			
CV	13.09			
R ²	0.98			

2.4.2 Incidencia

La diferencia en la incidencia de la enfermedad entre las 24 procedencias fue altamente significativa, ($P = 0.0001$) como se observa en el (Anexo 6). El efecto de las fechas fue significativo ($P = 0.0001$).

Como muestra la Tabla 6, las procedencias 39.87 Vado Hondo de Guatemala, 42.87 Mansaguara de Honduras, 41.87 Guayabilla de Honduras, 45.87 Managua de Nicaragua tuvieron un rango 4.5 a 5.3 % de porcentaje de arboles enfermos. Las procedencias 55.87 Mariara de Venezuela, 62.87 Chumpon de Tailandia y 54.87 Chamela de Mexico, fueron significativamente diferentes al anterior grupo, tuvieron porcentajes de incidencia entre 97% y 100% . En base a la separación de medias se agruparon las procedencias en seis grupos (Tabla 5).

El análisis geográfico (Figura 4) mostró que las procedencias con menor incidencia se hallan concentrados en el centro de la región en los países de Guatemala 4, Honduras 2, Nicaragua 3, y Costa Rica 2, México 1, mientras que entre las doce procedencias con mayor incidencia están en las periferias Venezuela 1, Colombia 1, Panamá 1, México 6, Tailandia 2, Guatemala 1.

Las 12 procedencias mas altas coinciden en un 83% con las 12 procedencias con menor incidencia y un 75% con los 12 lugares mas secos.

La separación de medias hecha para fechas muestra diferencias significativas ($p = 0.05$) entre los dos muestreos.

Tabla 5. Resultados de incidencia con datos de altitud y precipitación del estudio de resistencia a la enfermedad de la hoja pequeña.

Procedencia	Incidencia %	SNK	Altitud msnm	Precipitación mm
39.87 Vado Hondo- Guatemala	35.8	c	450	830
42.87 Mansaguara - Honduras	40.5	c	825	1100
41.87 Guayabilla - Honduras	40.5	c	480	1400
45.87 Managua - Nicaragua	45.3	bc	60	1100
44.87 Estelí - Nicaragua	54.8	ba	605	800
56.87 El Roblar - Costa Rica	64.3	bac	20	1000
36.87 Volcan Suchitlan -Guatemala	66.7	bac	950	1060
53.87 Arriaga - México	76.2	bac	30	1790
37.87 Rethaluleo - Guatemala	76.3	bac	330	3500
57.87 Playa Tamarindo - Costa Rica	76.3	bac	10	1500
59.87 Belén Rivas - Nicaragua	73.7	bac	75	1650
38.87 Gualán - Guatemala	73.8	bac	150	700
40.87 Monterrico - Guatemal	83.3	bac	5	1650
63.87 Patchiburí - Thailandia	83.5	bac	-	-
46.87 Los Amates - México	88.00	bac	100	650
52.87 San José - México	88.2	bac	30	1400
51.87 "Playa Azul - México	95.3	bac	30	900
47.87 Palmasola - México	95.3	bac	10	1130
58.87 Padesí - Panamá	92.8	bac	20	850
48.87 San Mateo - México	92.8	bac	10	950
60.87 Bolivar - Colombia	92.8	bac	20	950
54.87 Chamela - México	97.7	ba	60	905
55.87 Mariara - Venezuela	100	a	20	800
62.87 Chumpón - Thailandia	100	a	-	-
ANDEVA	0.0001			
CV	26.79			
R ²	0.89			

* Medidas seguidas de diferente letra son significativamente diferentes α p=0.05 mediante la prueba SNK

2.4.3 Severidad de síntomas de la enfermedad

Severidad general

Se rechazó la hipótesis de independencia de procedencia de la severidad de los síntomas de la enfermedad (Tabla 6), en ambas fechas.

Tabla 6. Análisis χ^2 del grado de asociación de severidad general y síntomas específicos evaluados con procedencia.

Síntomas Principales	GL	23 de agosto 1996		6 de noviembre 1996	
		χ^2	P	χ^2	P
Severidad General	69	186.743	0.0005	273.904	0.0005
Amarillamiento	69	208.602	0.0005	350.773	0.0005
Muerte de Ramas	69	348.871	0.0005	296.592	0.0005
Hoja Pequeña	69	211.164	0.0005	260.241	0.0005

GL = Grados de libertad

La primer toma de dato muestra la siguiente clasificación de la severidad de árboles (Figura 5).

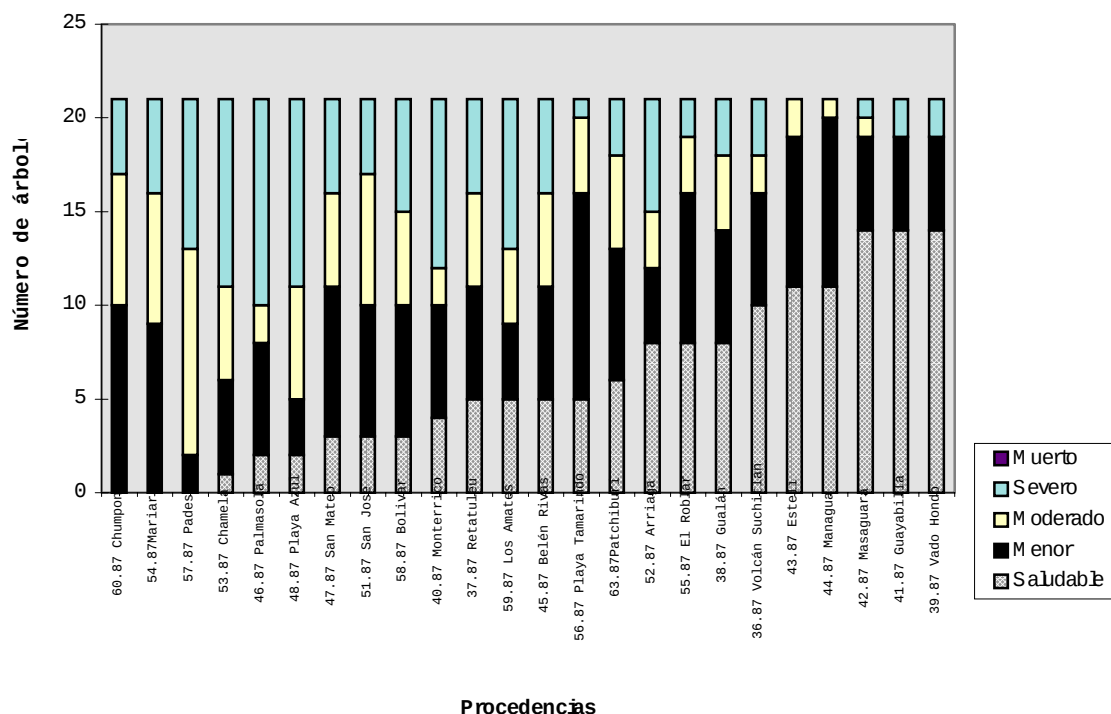


Figura 5. Severidad de la enfermedad de la hoja pequeña en 24 procedencias, Primera toma de datos (Zamorano, Honduras 1996)

Para la segunda toma de datos la enfermedad afectó con mayor severidad (Figura 6). Se observó mortalidad nueva de árboles en cuatro procedencias: Los Amates de México, Bolívar de Colombia, San José de Costa Rica y Guayabilla de Honduras.

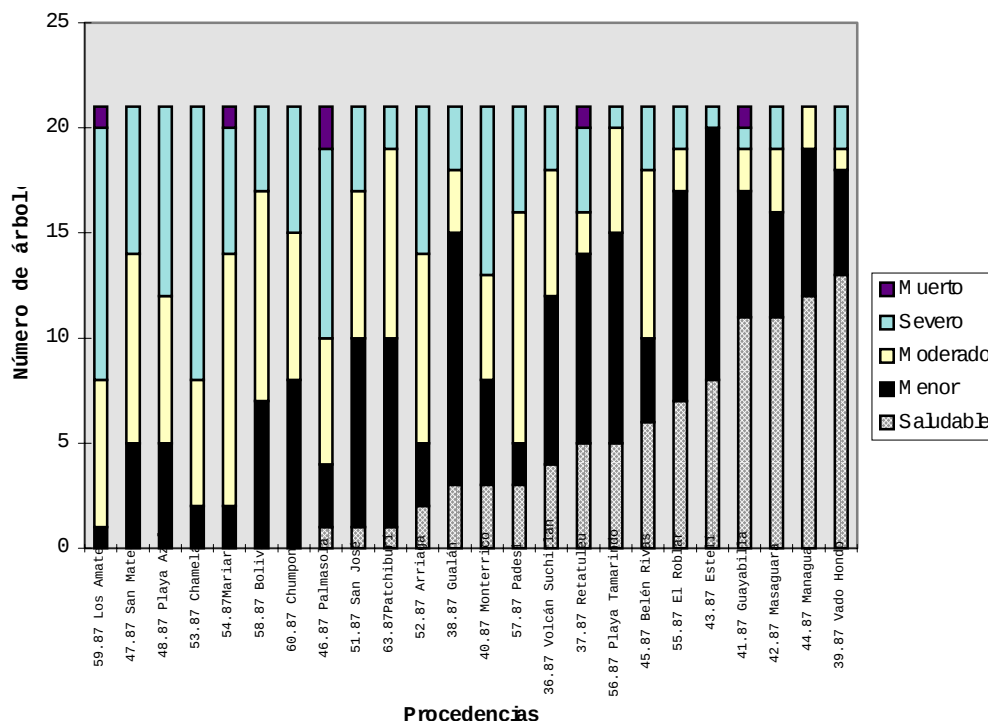


Figura 6. Severidad de la enfermedad de la hoja pequeña, en 24 procedencias. Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1996)

El síntoma de amarillamiento (Tabla 6), tuvo una dependencia significativa en procedencia.

Las procedencias Guayabilla de Honduras, Mansaguara de Honduras, Vado Hondo de Guatemala, Volcan Suchitlan de Guatemala y Arriaga de México tuvieron menor amarillamiento en el muestreo (Figura 7) y se observa una considerable cantidad de árboles con amarillamiento de una intensidad severa.

El tamaño de los árboles no cambió entre las dos tomas de datos (Figura 13 y 14), y la mayor parte de los árboles tuvieron un tamaño normal.

Las procedencias Guayabilla, Masaguara, Vado Hondo, Volcan Suchitlan y Arriaga tuvieron menor amarillamiento en el muestreo (Figura 5) y se observa una considerable cantidad de árboles con amarillamiento de una intensidad severa.

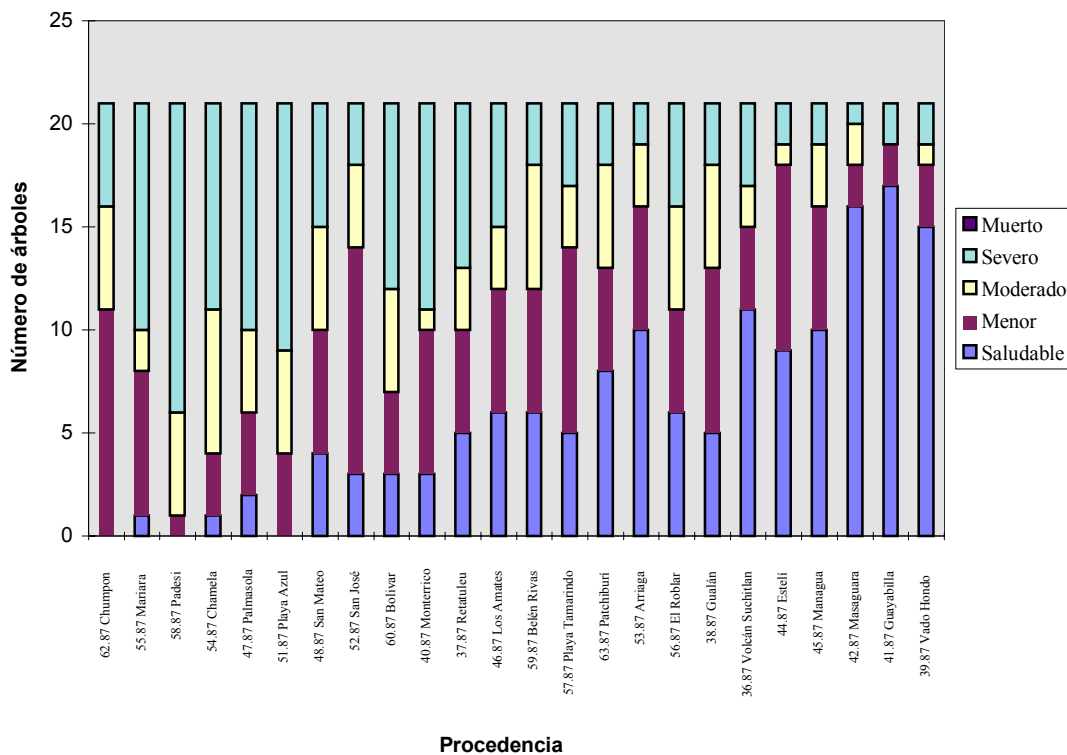


Figura 7. Grado de amarillamiento, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Primer toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997)

En la segunda toma de datos (Figura 8) comienzan a aparecer árboles con la categoría de muerto, estos árboles pertenecen a las procedencias: San Mateo, Palmasola y Los Amates de México; Mariara de Venezuela; Retalhuleo de Guatemala y Guayabilla de Honduras. Hay un ligero aumento de árboles con severidad moderada. Las procedencias menos amarillas son Estelí de Nicaragua; Monterrico y Vado Hondo de Guatemala; Guayabilla de Honduras y Masaguara de Honduras.

No se observaron cambios drásticos entre la primera y segunda toma de datos.

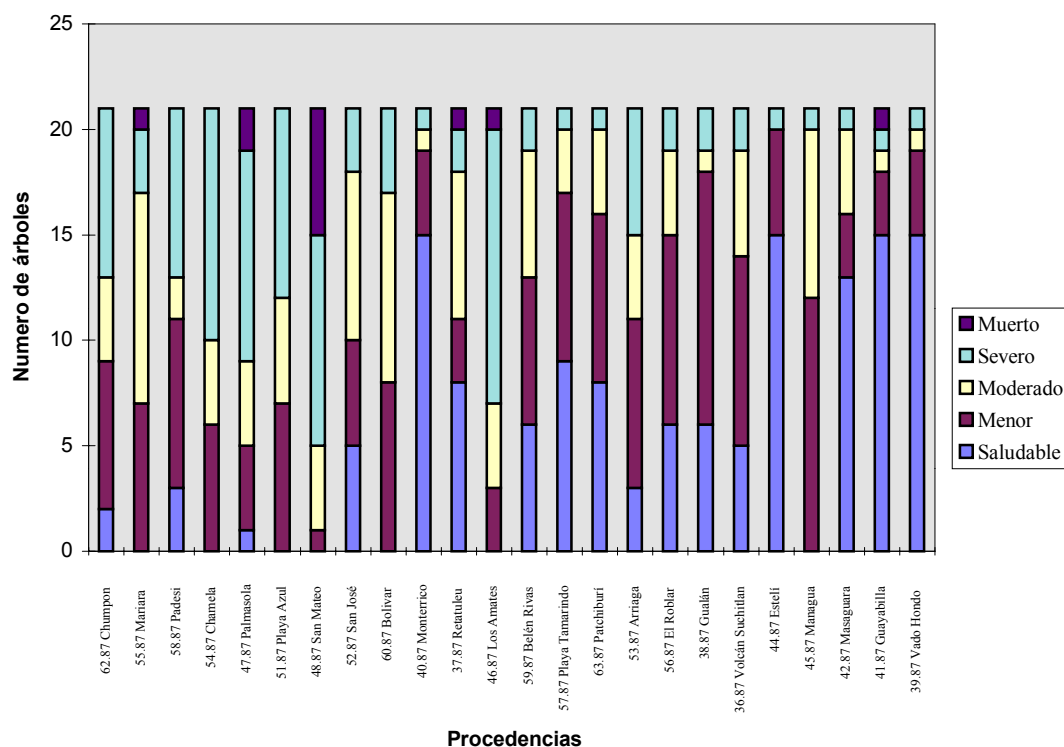
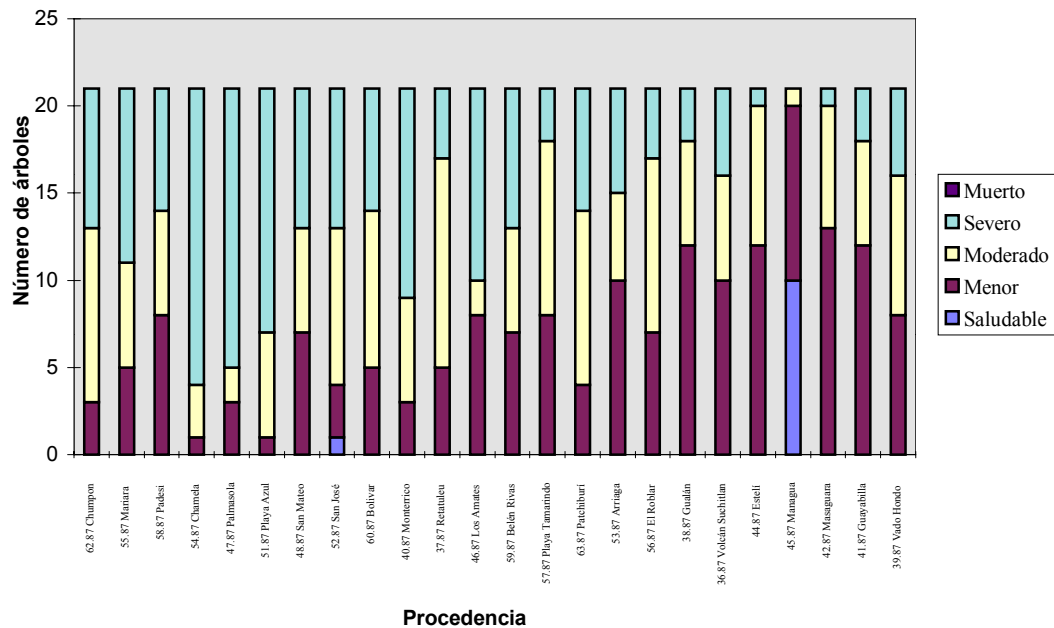


Figura 8. Grado de amarillamiento, síntoma de la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Segunda toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997)

Muerte de ramas no presentó cambios bruscos entre fechas de muestreo. En el primer muestreo (Figura 9), las cinco procedencias con menor muerte de ramas fueron Managua de Nicaragua; San José de México; Masaguara de Honduras; Estelí de Nicaragua y Guayabilla de Honduras.



Procedencia
Figura 9. Muerte de rama, síntoma de la enfermedad de hoja pequeña en
***Gliricidia sepium*. Primer toma de dato (Zamorano, Honduras 1997)**

La segunda toma de datos (Figura 10) mostró con menos muerte de ramas a Volcan Suchitlan de Guatemala; Masaguara de Honduras; Gualán de Guatemala; El Roblar de Costa Rica y Estelí de Nicaragua.

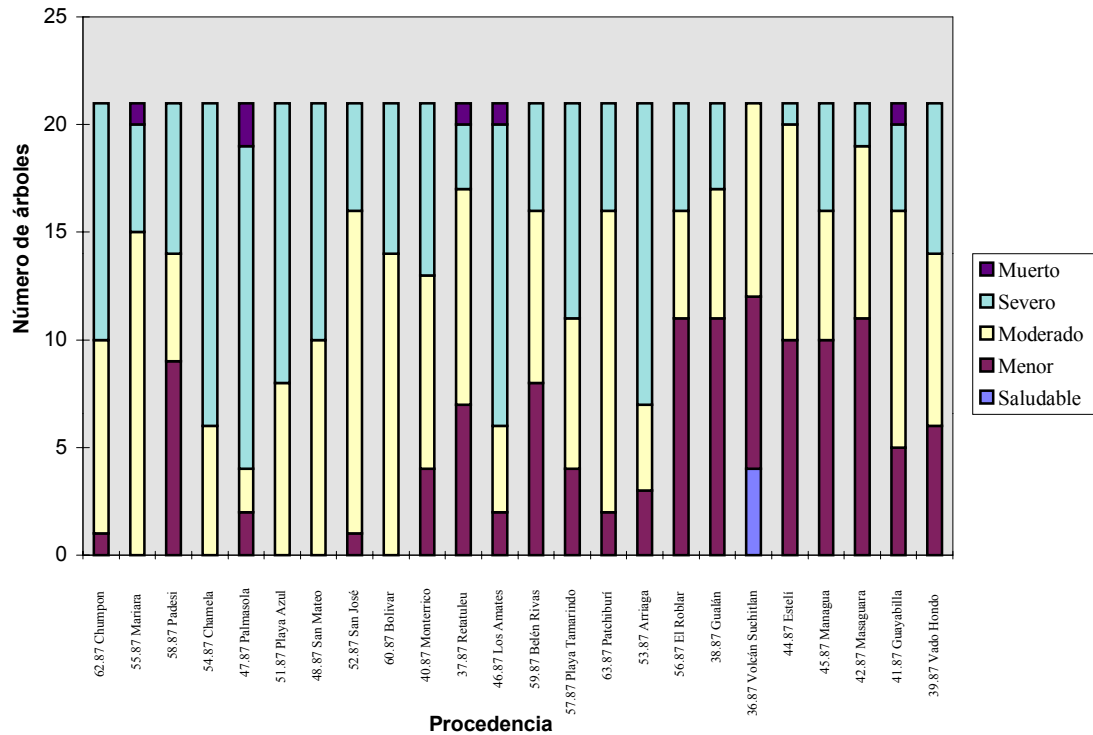


Figura 10. Grado de muerte de rama, síntoma de la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Segunda toma de datos (Zamorano, Honduras 1997)

El grado de severidad de hoja pequeña fué altamente relacionado con procedencia (Tabla 6). Las cinco procedencias con menor grado de hoja pequeña fueron: Masaguara y Guayabilla de Honduras; Vado Hondo de Guatemala; Managua y Estelí de Nicaragua (Figura 11).

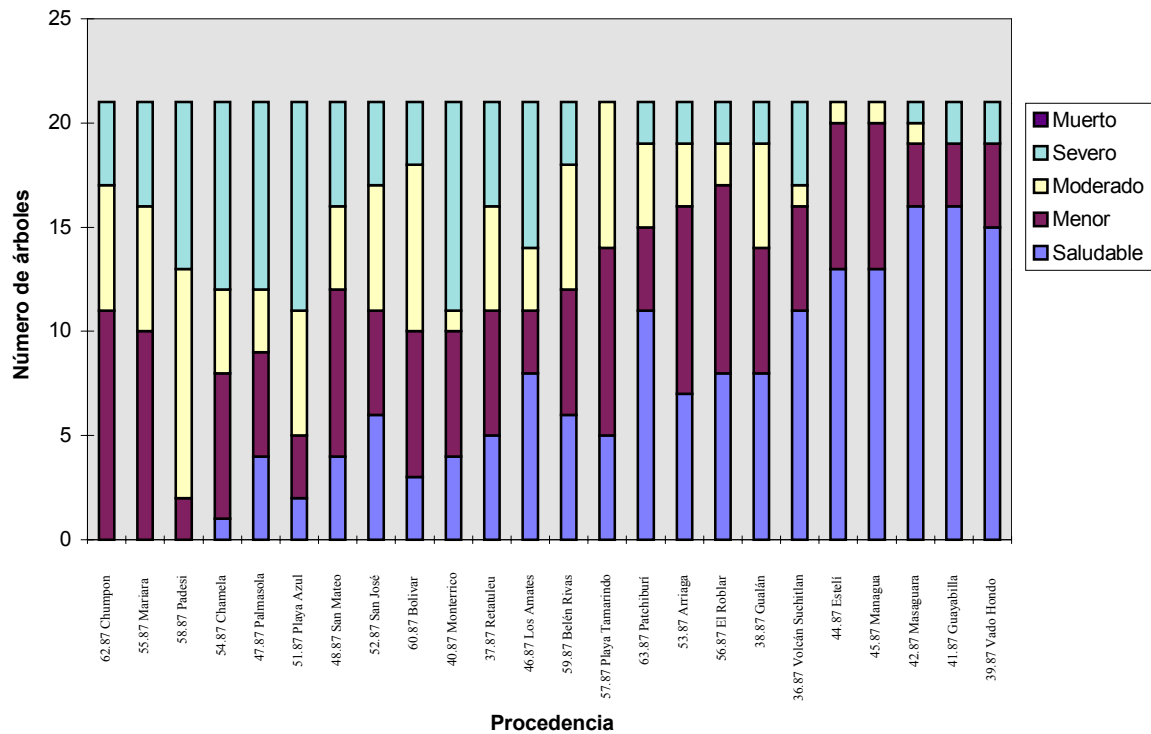


Figura 11. Grado de hoja pequeña, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Primer toma de dato (Zamorano, Honduras 1997)

En la segunda toma de datos la expresión del síntoma de hojas pequeñas cambió ligeramente, permaneciendo como las más saludables, aunque ya no en la misma proporción (Fig. 12) las procedencias: Masaguara y Guayabilla de Honduras; Vado Hondo de Guatemala; Managua y Esteli de Nicaragua.

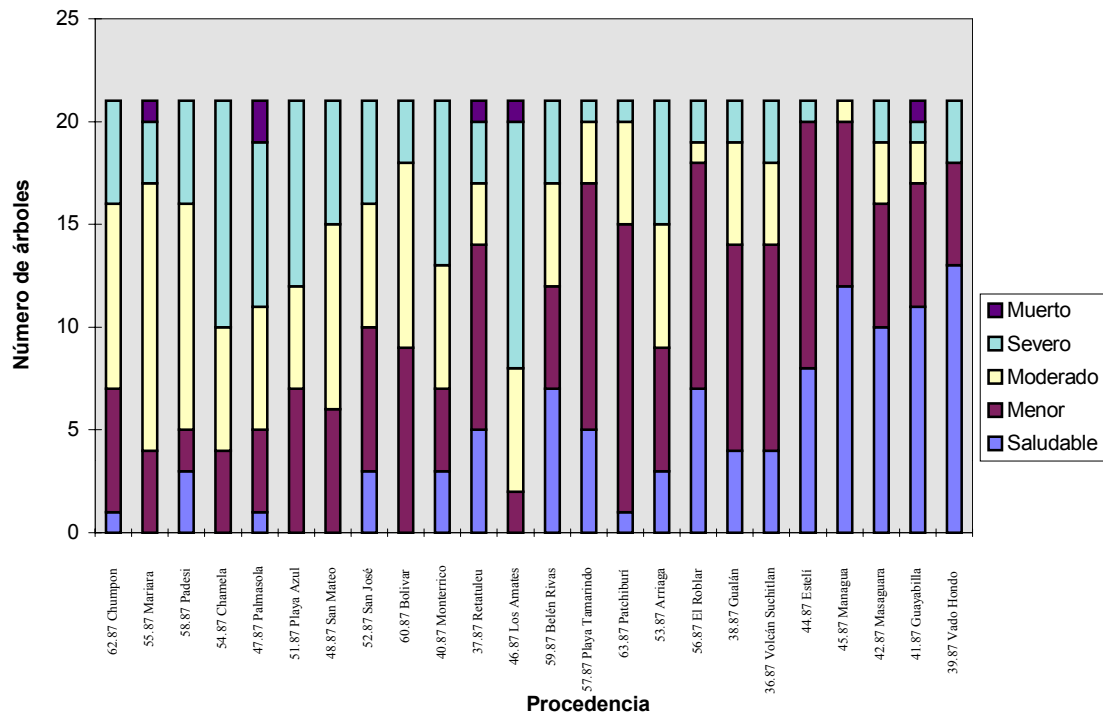


Figura 12. Grado de hoja pequeña, síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Segunda toma de dato, (Zamorano, Honduras 1997)

2.4.4 Evaluación cualitativa

La expresión de las tres características, crecimiento, formación de hoja pequeña y posición de muerte de ramas ($P \leq 0.05$) dependieron de la procedencia, en ambas fechas de muestreo (Tabla 7).

Tabla 7. Analisis de la asociaci3n de tres características de la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium* (Zamorano, Honduras 1997)

Síntomas Principales	GL	23 de agosto 1996		6 de noviembre 1996	
		χ^2	α	χ^2	α
Crecimiento	23	38.173	0.024	39.891	0.016
Formaci3n de hoja pequeña	69	243.180	0.000	240.51	0.000
Posici3n de muerte de ramas	23	73.237	0.001	36.878	0.024

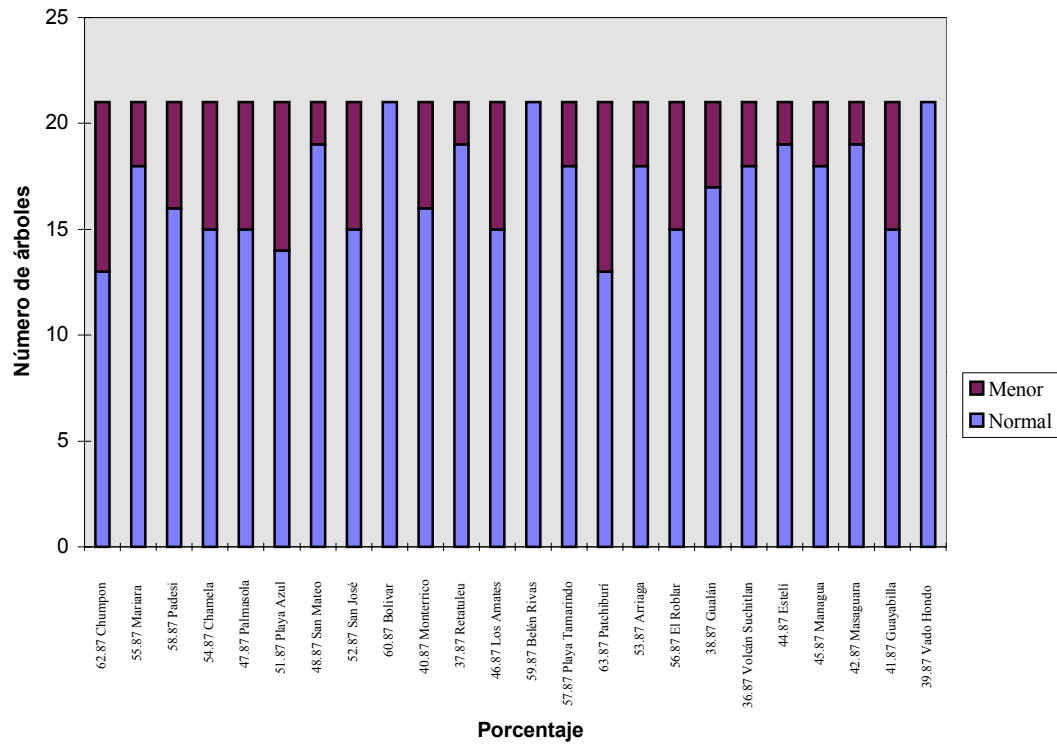


Figura 13. Crecimiento del árbol en 24 procedencias de *Gliricidia sepium*. Primer toma de dato (Zamorano, Honduras 1997)

Las procedencias de Tailandia, Chumpon y Patchiburi mostraron tener mayor cantidad de árboles deprimidos, mientras que la procedencias: Bolívar de Colombia; Belén Rivas de Nicaragua; Vado Hondo de Guatemala no presentaron árboles deprimidos (Figura 14).

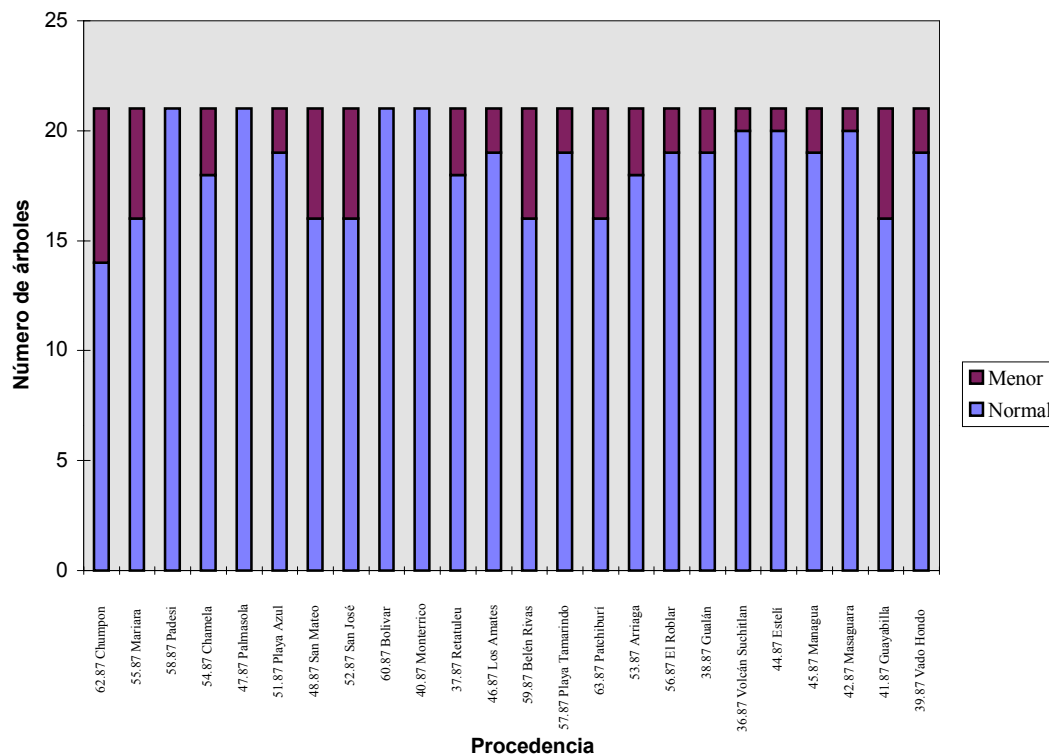


Figura 14. Crecimiento del árbol en 24 procedencias de *Gliricidia sepium*. Segunda toma de dato (Zamorano, Honduras1997).

En ambas fechas la forma en que se distribuye el síntoma de la hoja pequeña fue afectada significativamente por procedencia, ($p \leq 0.0001$). Se nota un gran cambio entre las dos tomas de datos en la proporción de árboles con hoja pequeña en los que no se distinguen ramilletes y en los que si se distingue ramilletes. Los que presentan ramilletes pequeños en ramas muertas aparecen recién en la segunda toma de dato (Figura 15 y 16).

En la primer toma de datos las procedencias que tienen menos hoja pequeña, como: Vado Hondo de Guatemala; Guayabilla de Honduras y Masaguara de Honduras, tienen pocos árboles en las categorías con hojas pequeñas donde aún no se distingue ramillete, donde si se distingue ramillete y los que presentan ramilletes pequeños en ramas muertas (Figura 15).

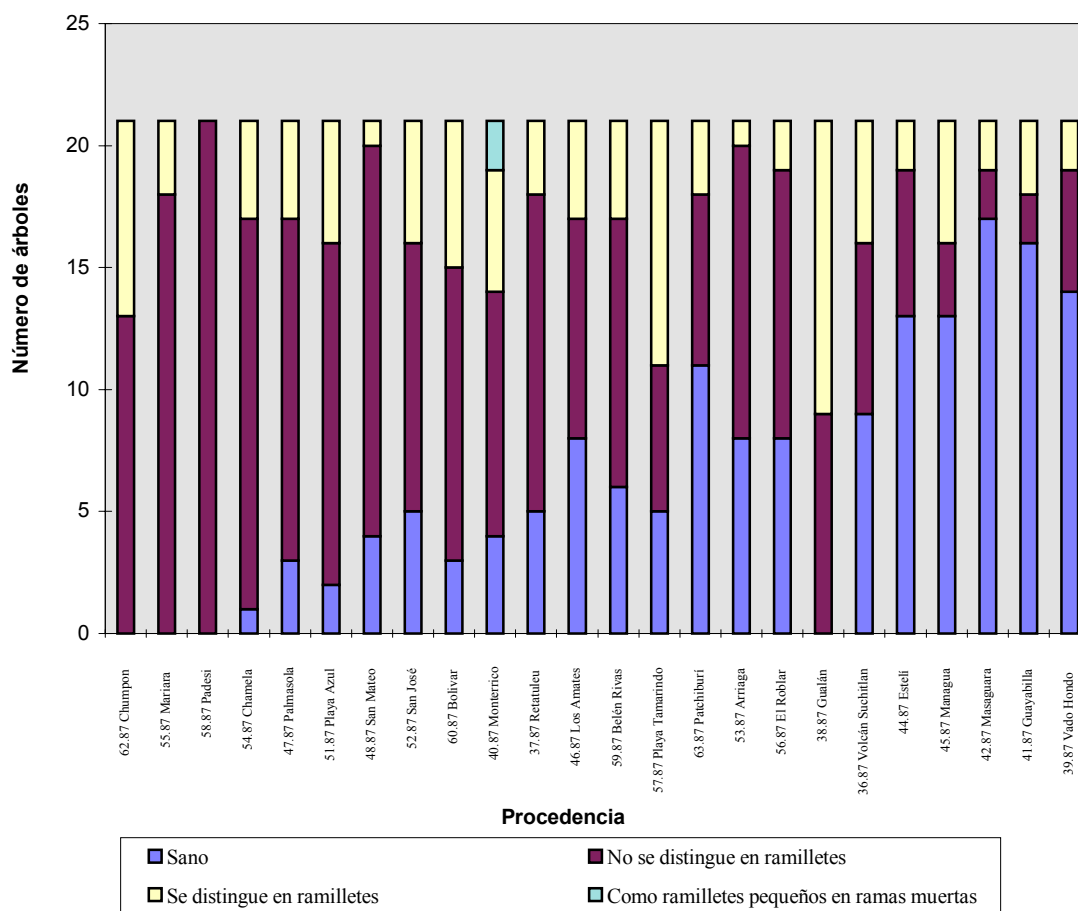


Figura 15. Distribución de la reducción de la hoja en el árbol, un síntoma de la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Primer toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997)

En la segunda toma de datos, de las 24 procedencias, 18 presentan muerte de rama con hoja pequeña. La formación de ramilletes aumente ligeramente y la presencia de hoja pequeña sin formación de ramillete disminuye. Las procedencias: Managua y Estelí de Nicaragua; Playa Tamarindo de Costa Rica; Patchiburí de Tailandia y Palmasola de México no muestran muerte de ramas (Figura 16).

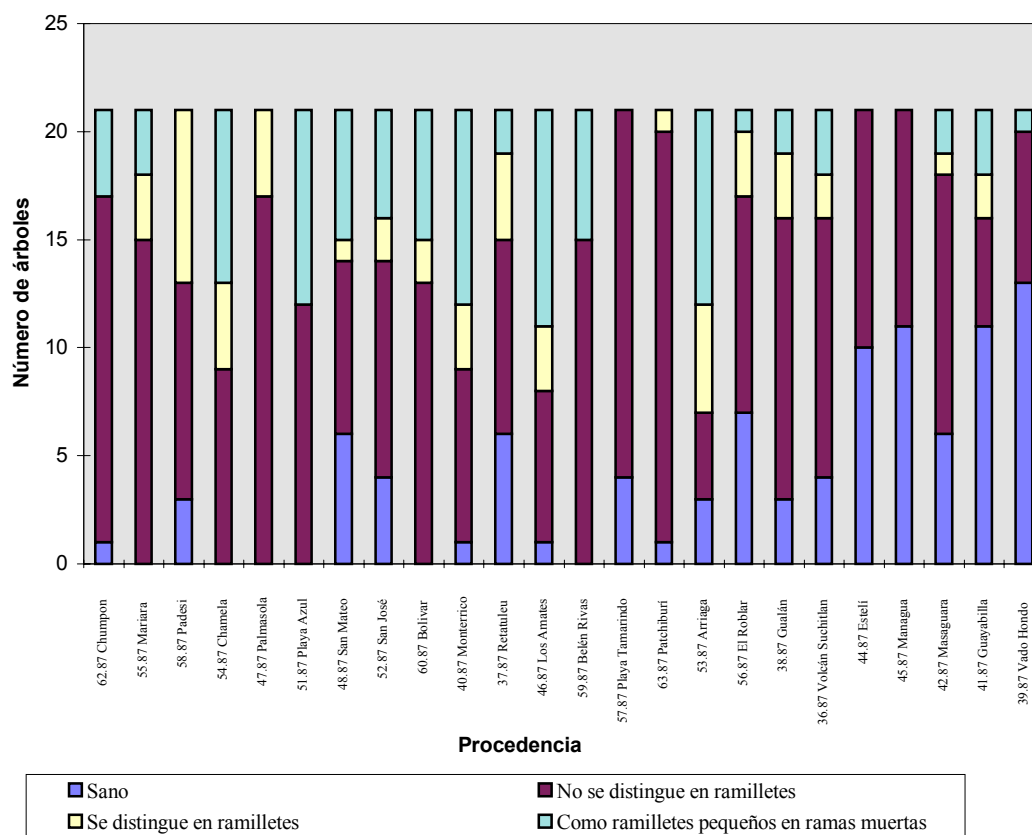


Figura 16. Distribución de la reducción de hoja en el árbol, un síntoma de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. Segunda toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997)

La posición de la muerte de ramas mostró dependencia altamente significativa frente a las procedencias ($p = 0.001$) en la primer toma de datos (Tabla 7), disminuyendo la significancia en el segundo muestreo ($p = 0.024$).

La primer toma de datos (Figura 17) las procedencias: Estelí de Nicaragua; Guayabilla de Honduras; Vado Hondo de Guatemala; El Roblar y Playa Tamarindo de Costa Rica tienen la mayor parte de la muerte de ramas en la parte baja de los árboles, mientras que Palmasola de México; Chamela de México; Bolívar de Colombia; Chumpón de Tailandia y San José de México tienen mayor mortalidad de hoja en la parte alta del árbol.

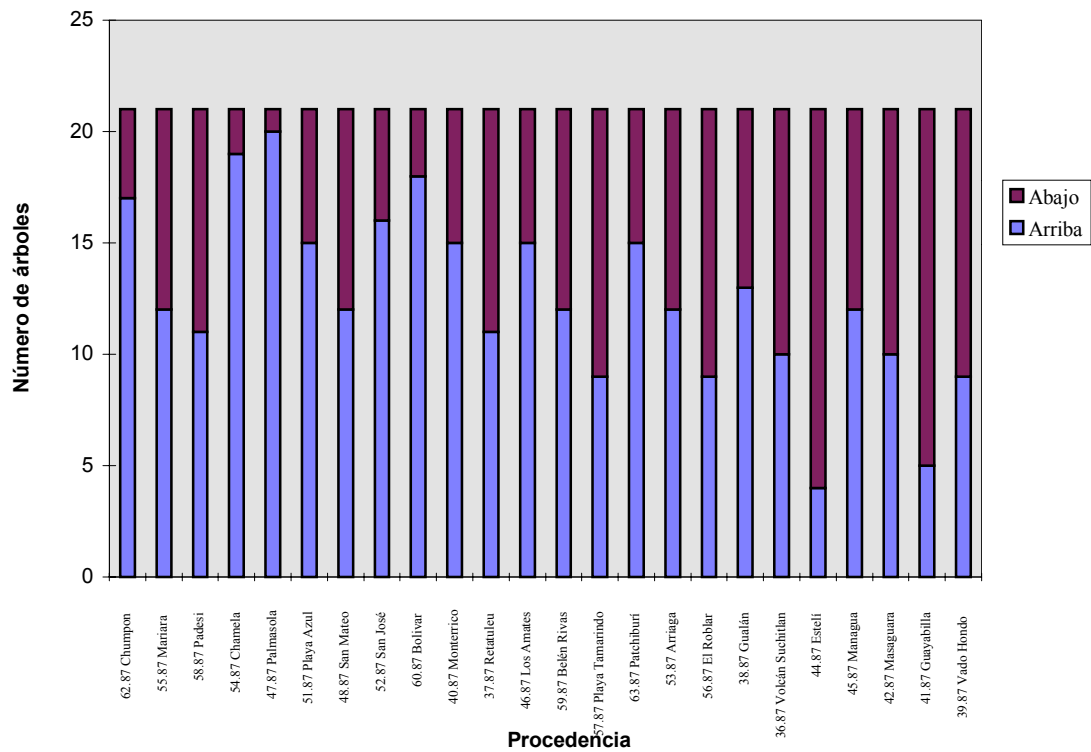


Figura 17. Posición de la muerte de las ramas en 24 procedencias de *Gliricidia sepium*. Primer toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997)

La segunda toma de datos (Figura 18) difieren de la primera en que la mortalidad de ramas bajas ha aumentado considerablemente.

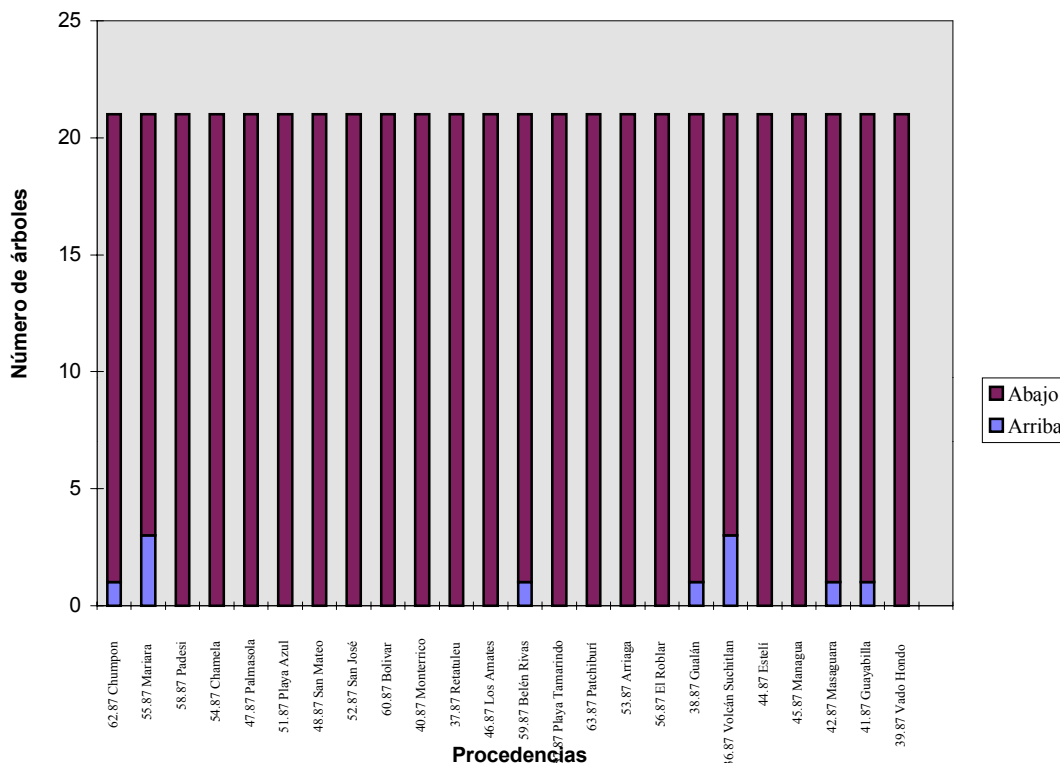


Figura 18. Posición de la muerte de ramas, en 24 procedencias de *Gliricidia sepium*. Segunda toma de dato. (Zamorano, Honduras 1997)

2.5 DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que de los sitios que se compararon, para conseguir semilla son buenas las procedencia: Vado Hondo en Guatemala; Masagura y Guayabilla en Honduras; Managua y Estelí en Nicaragua significativamente. En general las procedencias resistentes coinciden con lugares moderadamente altos (450 - 650 msnm) y precipitaciones entre 800 -1400 mm de agua al año, con excepción de Managua que está a 60 msnm de altura.

Las procedencias cercanas al lugar de estudio tienen los menores índices de mortalidad e incidencia es decir, esa decir expresan menos la enfermedad de la hoja pequeña (Figura 3). Esto podría ser debido a que las procedencias encuentran condiciones climáticas parecidas al lugar de origen. Se puede observar que estas están distribuidas en el centro del istmo, encontrándose las de mayor incidencia y mortalidad esparcidas en los extremos del istmo como ser el Norte de México, Colombia, Venezuela y Tailandia.

Mortalidad mostró ser un buen indicador del daño provocado por la EHP en las procedencias. Pudimos ver que las procedencias con menor mortalidad son las mismas que las de menor incidencia, como vimos en los dos casos esta fue Vado Hondo de Guatemala.

Las procedencias con menor mortalidad e incidencia coinciden en tener la mayor parte de la muerte de ramas en la parte bajera entre 10 a 11 árboles de los 21 muestreados. Se lo puede observar en las procedencias Vado Hondo de Guatemala, Guayabilla de Honduras, Estelí de Nicaragua. Esta información nos es útil para poder separar acertadamente la mortalidad de ramas debida a la enfermedad, con la propia del árbol como lo es la debida a competencia por luz.

La evaluación de crecimiento de los árboles puede estar influenciada por la mortalidad de ramas del árbol y la caída de hojas. Es muy poco probable que los árboles hayan crecido notablemente en tres meses, sino que los árboles con aumento de muerte de ramas y caída de hojas dan la apariencia de ser más bajos de lo que se aprecian en el follaje. Esto explicaría porque Vado Hondo de Guatemala se encuentra en terciaba posición de procedencias con menos árboles deprimidos, luego de figurar sin árbol deprimido en la primer toma de datos.

El caso anterior explicado podría sustentarse con mayor confianza si se contara con árboles testigos sanos en los cuales se podría observar comportamiento del árbol sin la influencia de la enfermedad y así hacer una diferenciación mas clara, entre comportamiento intrínseco del árbol y efectos debido a la enfermedad.

Vado Hondo de Guatemala; Managua y Estelí de Nicaragua; Mansaguara y Guayabillas de Honduras, mostraron que aparte de tener menor incidencia a la enfermedad también mostraron menos expresión de los síntomas (Figura 6 hasta Figura 15), podría deberse a que estos árboles tienen cierta tolerancia a la EHP.

Tabla 8. Características productivas de las mejores procedencias de *Gliricidia sepium* evaluadas.

Característica	Procedencias mejores (Promedio de todos los sitios)	Procedencias más estables (Mayor promedio esperado en > 80% de los sitios)
Largura de tallos	1. Rethaluleu, Guatemala(17%) 2. La Garita, Honduras (13 %) 3. Pontezuela, Colombia (11%)	1. La garita, Honduras 2. Rethaluleu, Guatemala 3. Estelí, Nicaragua 4. Pontezuela, Colombia
Producción de hojas	1. Rethaluleu, Guatemala (33 %) 2. Belén Rivas, Nicaragua (17%) 3. Monterrico, Guatemala (14%)	1. Rethaluleu, Guatemala 2. Belén Rivas, Nicaragua
Producción de leña	1. Rethaluleu, Guatemala (53 %) 2. Pontezuela, Colombia (24%) 3. Belén Rivas, Nicaragua (21%)	1. Pontezuela, Colombia 2. Rethaluleu, Guatemala 3. Belén Rivas, Nicaragua 4. Vado Hondo, Guatemala

Este cuadro es resultado de una red de parcelas que se estableció el Instituto Forestal de Oxford en África, Asia y algunos países Sud - Americanos para evaluar las procedencias en base a parámetros productivos. Nos sirvió para equilibrar nuestros resultados con aspectos productivos.

Balanceando en la elección de la procedencia a sembrar resistencia genética y parámetros productivos podríamos ver que Vado de Hondo la procedencia mas resistente no es la mejor alternativa siempre. Si lo que el productor busca es largura de tallo, La Garita, Honduras podría ser la mejor, teniendo como segunda alternativa Estelí de Nicaragua. Si nos interesa el árbol para producción de hojas Belén Rivas de Nicaragua podría ser una buena procedencia para estos fines. Por último si buscamos producción de leña Belén Rivas es una buena elección y en segundo lugar es Vado Hondo de Guatemala.

2.6. CONCLUSIONES

2.6.1 Mejores Procedencias

Las procedencias con menor mortalidad fueron: Vado Hondo de Guatemala; Volcán Suchitlan; Managua de Nicaragua, Guayabilla de Honduras y Estelí de Nicaragua. Estas procedencias tuvieron una mortalidad entre 2% a 8%.

Las procedencias con menor incidencia fueron : Vado Hondo de Guatemala; Mansaguara de Honduras, Guayabilla de Honduras y Managua de Nicaragua. Estas procedencias tuvieron una incidencia entre 36% al 45%.

Las procedencias que mostraron mejor tolerancia a la enfermedad por tener un menor avance de los síntomas fueron: Vado Hondo de Honduras; Estelí de Nicaragua, Managua de Nicaragua, Guayabilla de Honduras y Mansaguara de Hondura.

En base a estos tres parámetros las procedencias mejores fueron: Managua de Nicaragua; Guayabilla de Honduras y Vado Hondo de Guatemala.

2.6.2 Distribución de las mejores procedencias

Las procedencias con árboles más resistentes a la EHP se encuentran en lugares altos (450 -605 msnm) excepto Managua y en lugares con precipitaciones medias alta (800 a 1400 mm). Al mismo tiempo las procedencias más cercanas al istmo mostraron mayor resistencia. No se sabe si es porque la parcela del estudio tiene condiciones parecidas a sus lugares de origen o si en realidad hay una concentración de resistencia genética cerca de centroamérica.

2.6.3 Relaciones entre procedencias y síntomas

Procedencias con menor mortalidad e incidencia tienen la mayor parte de la muerte de ramas en la parte bajera. Esta información es útil en diferencia la muerte de ramas debida a la enfermedad con la debida a otras causas.

La estimación del crecimiento está influenciada por la mortalidad de las ramas y la caída de las hojas, por eso los árboles de las procedencias como Vado Hondo de Guatemala en tres meses disminuyó de tamaño de terciaba posición de los árboles con menos árboles deprimidos luego de no tener árbol deprimido en la primer toma de datos.

La procedencia Rethaluleo no coincidió en la posición obtenida del ordenamiento de árboles con menor mortalidad con el ordenamiento por menor incidencia.

2.6.4 Procedencias óptimas según su uso

Buscando el equilibrio entre resistencia y parámetros productivos, se definió la mejor procedencias según el uso que se le quiera dar al árbol. Para largura de tallo la mejor procedencia es La Garita Honduras, producción de hojas y de leña la mejor es Belén Rivas.

2.7 RECOMENDACIONES

1. Se debe hacer este mismo estudio en otros lugares como Norte de México, Colombia ó Venezuela para evaluar la estabilidad de los resultados obtenidos en diferentes condiciones ambientales. Esto daría la certeza de que los resultados obtenidos son debido a resistencia genética y no a las condiciones ambientales.
2. Es importante evaluar el rebrote de estos mismos árboles para observar de que manera la caída de hojas afecta el progreso de la severidad de la enfermedad.
3. Vado Hondo es una buena procedencia para Centramérica, valdría la pena evaluarla en otro continente como Asia o África.
4. Es necesario evaluar la evolución de la enfermedad de la plantación por períodos mas largo para obtener resultados mas confiables del desarrollo de la enfermedad en las diversas procedencias..
5. Profundizar los estudios en las procedencias con menor EHP como Vado Hondo de Guatemala, Managua de Nicaragua, Guayabillas de Honduras. Como estudiar la edad en que los árboles se infectan y la rapidez del avance de la enfermedad en el árbol.
6. Las procedencias más susceptibles, Rethaluleo de Guatemala, San Mateo de México, Chamela de México, Mariara de Venezuela y Chumpón de Tailandia podrían se útiles para trabajos de búsqueda del vector y de transmisión de la EHP por su alta susceptibilidad a ésta.

III. DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUEÑA EN *Gliricidia sepium* (Kunth).

3.1 INTRODUCCIÓN

Es necesario conocer y caracterizar los síntomas de la enfermedad para entender mejor cual es el desarrollo de la enfermedad y de esta manera hacerla conocer a los productores agropecuarios.

La autora de este artículo, hizo visitas en las procedencias de Belén Rivas en Nicaragua y Honduras (Choluteca) donde pudo entrever la percepción del productor hacia la enfermedad (1996). Se tuvieron conversaciones informales con productores de una procedencia natural del La Garita en Choluteca y en este caso, el productor percibía la enfermedad como un problema de "mala tierra" y hasta mencionaron la colocación de fertilizante para este problema.

Otro productor de Choluteca afirmó haber visto muchos insectos en el árbol que posteriormente murió. En Nicaragua los productores con los que se conversó tampoco mencionaron la posibilidad de que la muerte de sus árboles se debiera a una enfermedad.

Entonces para el estudio y la divulgación de información referente a la EHP es necesario conocer y caracterizar los síntomas de la enfermedad. Se le ha asociado con síntomas como reducción de entrenudos, reducción del tamaño de las hojas, proliferación de ramas, amarillamiento del follaje afectado, muerte de ramas y distorsión de la hoja. Pero no se conocen detalles referentes a la velocidad y características del avance de la enfermedad.

El seguimiento del desarrollo de la enfermedad es un proceso que durará bastantes años, la muerte de un árbol por infecciones fitoplasmáticas es algo lenta en relación a plantas de menor tamaño. Los datos obtenidos en estos estudios podrían ayudar a comprender los procesos que se suceden en el árbol por el avance de la enfermedad, información muy útil al momento de buscar alternativas de manejo y divulgación de la enfermedad.

El propósito inmediato de este trabajo fue escoger diez árboles y tomar datos del desarrollo de la EHP para el primer año de estudio. La última meta fue iniciar un estudio a largo plazo que produciría una descripción de la progresión completa de los síntomas de la enfermedad.

3.2 OBJETIVOS

Este trabajo buscó explicar como es el desarrollo de la enfermedad a largo plazo. De esta manera habrían bases para un protocolo para medir el desarrollo de síntomas en árboles individuales. El estudio lo enfocamos a:

- Como están distribuidos los síntomas en el árbol.
- Cual es la intensidad de la expresión de los síntomas.
- Que características de la enfermedad se presentan en el tiempo

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Selección y numeración de los árboles

El 23 de Agosto de 1996 se escogieron diez árboles en un radio de 4 kilómetros a la redonda dentro de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. Los árboles se escogieron por tener diferentes grados de severidad inicial basado en la escala de saludable, menor, moderado y severo (Tabla 9). En la presentación de resultados y análisis posteriores se agruparán por medio de esta severidad inicial.

A cada árbol se le asignó una numeración, que fue pintada en el tronco con letras grandes, de color amarillo. También se colocó una placa metálica en el tronco principal de cada árboles con la numeración repujada en el metal. Para todas las tomas de datos la posición de muestreo fue frente a la placa.

Los arboles se fotografiaron cada tres meses en slides y papel fotográfico, para documentar el desarrollo de la enfermedad de la hoja pequeña.. Se usó el formulario diseñado por E.Boa (Anexo 7)

Tabla 9. Grado de severidad y número de árboles monitoreado (Zamorano Honduras, 1997).

Nro. de árbol	Severidad
22, 25	Saludable
23, 21	Menor
28, 26	Moderado
24, 27, 29, 30	Severo

En cada árbol se anotó la latitud, longitud y altura (msnm) en que se encontró el árbol, los datos se obtuvieron usando un Sistema de Posicionamiento Geográfico (GPS) individual (Tabla 10).

Tabla 10 Ubicación geográfica y altitud de diez árboles monitoreados en el estudio del desarrollo de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium* (Zamorano, Honduras - 1997).

Severidad → inicial del árbol	Saludabe		Menor		Moderado		Severo			
Nro. de Árbol.	22	25	21	23	28	26	29	24	27	30
Altitud (msnm)	800	740	800	790	740	740	800	740	740	800
Latitud N	14°00'21"	13°59'22"	14°00'21"	14°00'18"	14°00'42"	13°59'44"	14°00'29"	13°59'22"	14°00'17"	14°00'29"
Longitud S	87°01'11"	87°00'14"	87°01'11"	87°00'52"	87°00'21"	87°00'39"	87°00'24"	87°00'14"	87°00'28"	87°00'24"

3.3.2 Características del árbol

En cada fecha de muestreo se registraron en los diez árboles (Tabla 11) sus características físicas, como: altura del árbol, número de ramas principales, diametro del árbol a la altura del pecho (1.5 mts. arriba de la superficie del pecho), distribución de la copa del árbol y el tipo de manejo recibido, que se entiende por la cantidad de podas recibidas.

Los datos se tomaron con un espaciamento de 84 a 92 días, las fechas fueron; 23 de agosto de 1996, 16 de noviembre de 1996 y 12 de febrero de 1997.

Tabla 11. Características físicas usadas en el monitoreo de árboles con la enfermedad de la hoja pequeña.(Zamorano, Honduras).

	Calificación	Descripción	Aclaración
Altura	1	Bajo	< a 5 mts.
	2	Medio	Entre 5 a 10 mts.
	3	Alto	> a 10 mts.
Número de ramas	1.....x	Ramas que salen del suelo	Cantidad de ramas que salen del suelo no se cuentan bifurcaciones posteriores
Diámetro a la altura del pecho	1	Delgado	Entre 10 a 20 cm.
	2	Grueso	Mayor a 20 cm
Cobertura	1	Simétrico	El follaje está distribuido simétricamente en los dos lados.
	2	Asimétrico	El follaje se encuentra en mayor cantidad en uno de los lados.
Manejo	1	Cortes menores	Pocas ramas han sido cortadas
	2	Cortes mayores	Muchas ramas recién han sido cortadas*
	3	Cortes viejo	Ha sido podado hace 1 ó 2 años.

* Más del 20 % del árbol cortado

Para evaluar el manejo y estimar la antigüedad de los cortes, se usó la foto del árbol en el anterior muestreo del árbol..

3.3.2 Distribución de la enfermedad

Se evaluó la distribución de los síntomas en la cobertura vegetal. Se evaluaron cuatro variables, la primera fue la presencia de sintomatología general propia de la enfermedad, las otras tres fueron: amarillamiento, muerte de ramas y hoja pequeña. La distribución se evaluó como la presencia de estas variables en los cuadrantes.

La posición para la toma de datos fue siempre frente a la placa metálica del árbol. Los cuadrantes se numeraron como se muestra en la (Figura 9).

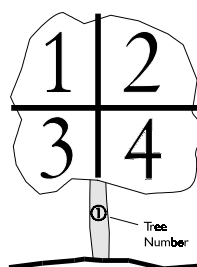


Figura 19. Distribución de los cuadrantes del árbol.

3.3.3 Intensidad de la enfermedad

Se registro la intensidad de la EHP en los árboles en base a la proporción de amarillamiento, muerte de ramas y hoja pequeña que presentó el árbol (Tabla 12). Para un entendimiento visual, se tomaron fotos seleccionándose las Figuras 1, 2, 3, 4 y 5 que ilustran los cuatro grados de severidad: saludable, menor, moderado y severo.

Tabla 12. Grados de severidad * de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*. (Zamorano, Honduras 1997)

Calificación	Severidad	Proporción del árbol afectado
0	Saludable	0
1	Menor	< 1/4
2	Moderado	1/4 a 1/2
3	Severo	> 1/2
4	Muerto	1

* Fuente E. Boa.

3.3.4 Características de la enfermedad

Se evaluaron las características de los síntomas de la enfermedad como ser, la manera en que se presenta la formación de hoja pequeña, proporción de la reducción de hoja, presencia de distorsión de hoja, distribución de la caída de hojas, localización de la distribución de la proliferación de ramas, proporción de la reducción de la distancia de entrenudos y localización del síntoma de amarillamiento en el árbol (Tabla 13). Para tener un punto de comparación se usaron las fotos de la anterior toma de datos.

Tabla 13. Categorías usadas en la evaluación de las características de los síntomas de la enfermedad en diez árboles de *G. sepium* (Zamorano, Honduras)

Característica	Calificación	Descripción	Aclaración
Formación de hoja pequeña	0	Ausente	No hay presencia de hojas pequeñas en el árbol
	1	No se distingue	El árbol tiene todas las hojas pequeñas ó hay sospecha que hay solo en la punta de las ramas
	2	En Ramas	Se distingue hoja pequeña en ramas
	3	Con muerte de ramas	Se distingue hoja pequeña con muerte de ramas
Reducción de hojas	0	Ausente	No hay hojas de menor tamaño
	1	> 50%	Follaje enfermo es mayor al 50% del tamaño normal
	2	<50%	Follaje enfermo es menor al 50% del tamaño normal
Distorsión de la hoja	1	Ausente	Las hojas son normales sin distorsión
	2	Presente	Se observan pequeños ramilletes con distorsión
Caída de hoja	1	Ausente	No se observa
	2	Ramas jóvenes	Poco, sobretodo retoños enfermos de ramas jóvenes.
	3	General	Presente en toda la cobertura del árbol.
Proliferación de ramas	1	Ausente	La cantidad de ramas por nudo se ve normal
	2	Pocas ramas enfermas	Presente solo en algunas ramas enfermas.
	3	Muchas ramas enfermas	Presente en muchas ramas enfermas.
Distancia entrenudos	0	normal	La distancia entrenudos se ve normal
	1	> 50%	La distancia entrenudos es mayor al 50 % de lo normal.
	2	< 50%	La distancia entrenudos es menor al 50 % de lo normal
Amarillamiento	0	Ausente	No hay amarillamiento en el árbol
	1	En parches	Hay amarillamiento en varias partes de la cobertura.
	2	General	Presente en toda la cobertura generalizado.
	3	Punta de ramas	Solo presente en la punta de las ramas.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Características del árbol

La mayor parte de árboles tuvieron menos de diez metros de altura, los árboles menores a 5 metros fueron el 22, 29 y 24. Puede observarse que en el caso de plantas saludables se encontraron pequeñas variaciones en la altura de la planta entre las tres tomas de datos el árbol 25 y el manejo de la planta 22 (Tabla 14).

El diámetro a la altura del pecho fue variable, los árboles 22, 25, 21, 24, 29, 30 lo tenían menor a 20 cm. Lo demás mayor a 20 cm. La cantidad de ramas por árbol fue constante en los tres periodos, en la mayoría de los casos; los números 21, 28, 24 sufrieron podas de muchas ramas a mediados de octubre. Solo dos árboles tuvieron una distribución de copa asimétrica los números 21, 22, y 24 luego de una poda.

Debido a la poda hubo variación en los datos de simetría de la copa y manejo del árbol de severidad menor, como ejemplo la planta 21. En el árbol 30 de sintomatología severa se registró un ligero crecimiento (Tabla 14).

Tabla 14. Características del desarrollo de diez árboles de *Gliricidia sepium*, agrupados por severidad inicial de la enfermedad de la hoja pequeña. (Zamorano, Honduras 1997)

	Severidad inicial del árbol																													
	Saludable						Menor						Moderado						Severo											
Nro. de árbol	22			25			21			23			28			26			29			24			27			30		
Toma de dato	A ¹	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C			
Altura	1 ²	1	1			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1		2
Ramas	4	4	4	2	2	2				3	3	3	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	
DAP 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	
Cobertura	1	1	1	1	1	1				2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	
Manejo	(			1	1	1	(			1	1	1	2	2	2	(			1	1	1				1	1	1	1	1	

- 1.- **A** primera toma de datos (23/08/96); **B**. Segunda toma de datos (16/11/96); **C**. Tercera toma de datos (12/02/97)
 - 2.- Características de desarrollo de las diferentes partes vegetativas de las plantas, como fueron descritos en materiales y métodos.
 - 3.- Diámetro a la altura del pecho (1.5 metros arriba del suelo)
- Áreas sombreadas representan los parámetros donde fueron detectadas variaciones entre las tres tomas de datos.

3.4.2 Distribución de la enfermedad

La enfermedad estuvo generalmente distribuida en los cuatro cuadrantes pero no uniformemente, sino que los síntomas se presentaron zonificados como describiremos en las características de la enfermedad.(Tabla 15).

Los síntomas mostraron casi siempre la misma distribución cada tres meses, con la excepción de tres casos; En los dos primeros hubo diferencias entre los resultados obtenidos en diversas fechas de toma de datos, cuando el árbol número 23 no presentó amarillamiento en la segunda toma de datos y el número 28 no presentó muerte de ramas (por causas desconocidas) en las dos primeras tomas de datos presentándolo recién en el tercer periodo. En estos dos casos, los síntomas se presentaron en los cuatro cuadrantes del árbol.

El tercer caso fue en el árbol 21 que mostró ausencia de muerte de ramas en el segundo cuadrante, en la segunda y tercera toma de datos, mientras que los otros tres cuadrantes mostraron el síntoma. Es decir la respuesta varió en tiempo y no fue la misma en los cuatro cuadrantes.

Tabla 15.- Distribución de los síntomas de la enfermedad de hoja pequeña en *Gliricidia sepium*, en diez árboles evaluados (Zamorano, Honduras 1997).

Número promedio de cuadrantes en que se presentaron síntomas:																															
Severidad → inicial del árbol	Saludable n = 2						Menor n = 2						Moderado n = 2						Severo n = 4												
Nro. de árbol →	22			25			21			23			28			26			29			24			27			30			
	A ¹	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Sintomatología general	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Amarillamiento	0	0	0	0	0	0	4	4	4				4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Muerte de ramas	0	0	0	0	0	0					4	4	4				4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Hojas Pequeñas	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	

1.- **A** primera toma de datos (23/08/96); **B**. Segunda toma de datos (16/11/96); **C**. Tercera toma de datos (12/02/97)

2.- **0** representa ausencia del síntoma; **4** representa presencia del síntoma.

Áreas sombreadas representan los parámetros donde fueron detectadas variaciones entre las tres tomas de datos.

3.4.3 Intensidad de la enfermedad

Cuando se evaluó la intensidad de la enfermedad (Tabla 16) se notó que hubo casos aparentes de recuperación de síntomas en las plantas, obsérvese el amarillamiento de las plantas 23, 24, 26, 28 y 29, la muerte de ramas en los árboles 26 y 29, debido a la época seca.

También hubieron progresos en la enfermedad, como se observa en el síntoma de muerte de ramas de los árboles 23, 24, 26, 28, 29 y 30.

Sin embargo, cuando estas evaluaciones (amarillamiento, muerte de ramas, hoja pequeñas) se consideran como un todo (todo el árbol), el cambio de la intensidad de la enfermedad fue mínimo y solo se detectó uno en el árbol 21 donde hubo un aumento.

Tabla 16.- Intensidad de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*, en diez árboles evaluados (Zamorano, Honduras 1997).

Severidad inicial del árbol →	Saludable						Menor						Moderado						Severo											
Nro. de árbol	22			25			21			23			28			26			29			24			27			30		
Toma de datos	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Sintomatología general	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Amarillamiento	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3
Muerte de ramas	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	3	3
Hojas Pequeñas	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3

- 1.- A primera toma de datos (23/08/96); B. Segunda toma de datos (16/11/96); C. Tercera toma de datos (12/02/97)
- 2.- 0 representa severidad saludable (0%); 1 representa severidad menor (25%) con el síntoma; 2 representa severidad moderado, entre el (25 -50%) con el síntoma; 3 representa severidad mayor al (50 %) y 4 muerto.
- Áreas sombreadas representan los parámetros donde fueron detectadas variaciones entre las tres tomas de datos.

3.4.4 Características de la enfermedad

La expresión de la enfermedad bajo los criterios utilizados formación de la hoja pequeña, reducción del tamaño de hoja, distorsión de las hojas, proliferación de ramas, distancia entrenudos, amarillamiento indicó que los mayores cambios fueron considerados como afectados severamente al inicio del experimento. La distorsión de las hojas en general fue constante con excepción del árbol 29 (Tabla 17).

Se notaron casos de aparente recuperación de síntomas en la planta. Estos casos se observó en el amarillamiento de las plantas 23, 27, 28 el síntoma de proliferación de ramas en el árbol 24, 26 y 29, caída de hojas del árbol 24, distancia de entrenudos en las árboles 24, 27, 29, 30; distorsión de la hoja en el árbol 26 y 29; reducción del tamaño de la hoja en el árbol 26. Sin embargo, el cambio en la formación de la hoja pequeña fue mínimo y solo se detectó un aumento en el árbol 21.

Por otro lado se observaron progresos en algunos síntomas como caída de hojas en los árboles 21, 22, 25, 27, proliferación de las ramas del árbol 21, amarillamiento de los árboles 24 y 29.

Tabla 17 .- Características de la enfermedad de la hoja pequeña en *Gliricidia sepium*, en diez árboles evaluados (Zamorano, Honduras 1997).

Severidad inicial del árbol →	Saludable						Menor						Moderado						Severo											
Nro. de árbol	22			25			21			23			28			26			29			24			27			30		
Toma de dato	A ¹	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Formac. de hoja pequeña	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Reducción del tamaño	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1				1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
Distorsión de la hoja	N	N	N	N	N	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S	2	2	2	2	2	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Caída de hojas										2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	2	2	1	2	2	3	3	3	3
Proliferación de ramas	1	1	1	1	1	1				2	2	2	2	2	2									2	3	3	3	3	3	3
Distancia entre nudos	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1						1			1			1
Amarillamiento	0	0	0	0	0	0	3	3	3							2	2	2						3			1	2	2	2

1.- A primera toma de datos (23/08/96); B. Segunda toma de datos (16/11/96); C. Tercera toma de datos (12/02/97)

2.- Características de la expresión de la enfermedad, como fueron descritos en materiales y métodos. Áreas sombreadas representan los parámetros donde fueron detectadas variaciones entre las tres tomas de datos.

3.5 DISCUSIÓN

Se mencionaron casos aparentes de recuperación de síntomas en las evaluaciones de intensidad y características de la enfermedad. Esto puede ser debido a la pérdida de las hojas amarillas por el acercamiento a la época seca. Una vez que ocurre la defoliación de hojas amarillas, la presencia de hojas verdes en los brotes nuevos puede dar la falsa apariencia de recuperación cuando se evalúan síntomas foliares. Lo mismo puede ocurrir con hojas pequeñas como en el árbol 26 y 29 (Tabla 16) donde se notó una disminución de la categoría (valores de severidad) utilizada para describir este parámetro.

La muerte de ramas implica que hubo defoliación previa, como se evidencia en los árboles 21, 22, 25, 27 es decir caen las hojas sanas como las enfermas. Eso podría explicar la reducción de una escala de severidad de la hoja pequeña. (Tabla 16) Así se puede explicar también una aparente disminución de la distorsión de hojas en el árbol 29. Las ramas que fueron consideradas muertas se les confirmó la verdadera muerte mediante cortes de la corteza, lo cual puede haber sobrestimado el síntoma.

Existen datos aparentemente inconsistentes (Tabla 17) donde se registra que el síntoma de amarillamiento aumenta en un árbol (árbol 24) y disminuye en el otro (árbol 27), siendo los dos árboles de un mismo grado de severidad inicial. Esto puede ser debido simplemente a factores de apreciación más que a causas reales, como ser el no haber definido desde un inicio el color que se considera como amarillo.

3.6 CONCLUSIÓN

Desde el punto de vista del número de cuadrantes afectados y severidad, no se puede detectar una progresión de los síntomas durante un periodo de 9 meses.

No todos los cambios pudieron ser explicados lógicamente, existiendo inconsistencias que podrían evitarse buscando una manera de cuantificar los síntomas. La caída de hojas bota material vegetativo que evidencia el desarrollo de la enfermedad. La planta como estrategia de sobrevivencia bota las hojas jóvenes al final.

Este ensayo no comprendía la evaluación de rebrote debido a que, en este se puede ver la evolución de los síntomas.

Existen inconsistencias en los resultados debido a que las apreciaciones categóricas son algo subjetivas, se debe trabajar en cuantificar las variables evaluadas como amarillamiento. Las distintas procedencias pueden variar en la expresión de los síntomas como se observa el capítulo 1, en este ensayo no supimos cuál era la procedencia de los árboles monitoreados.

3.6 RECOMENDACIONES

1. Se propone como fechas apropiadas para el muestreo; 15 de mayo, 15 de agosto, 15 de octubre (Anexo 8). La primera fecha evaluaría el rebrote del periodo seco que en este ensayo no se logró evaluar.
2. Dar un seguimiento a los árboles individualmente por un periodo mayor a un año.
3. Hacer otro tipo de división del entre secciones mas pequeñas, haciendo caso omiso de árbol como ser : ramas nuevas, ramas viejas, parte baja del árbol o parte alta del árbol.
4. Se debe buscar que algunas variables de muestreo sean más objetivas. Para amarillamiento se podrían usar fórmulas de colores de PANTONE usada por los diagramadores, donde el color de amarillamiento y saludable está definido por códigos y puntos de mezcla de papel mate (Tabla 18).

Tabla 18. Fórmulas de color de PANTONE que definen el color de amarillamiento y saludable en árboles de *Gliricidia sepium*.

Estado	Código	Mezcla
Saludable	PANTONE 371C	12 pts PANTONE yellow 4 pts PANTONE pro - blue 4 pts. PANTONE black
	PANTONE 378C	12 pts PANTONE yellow 4 pts PANTONE GREEN 4 pts. PANTONE black
Amarillo	PANTONE 390C	15 pts PANTONE yellow 92.3 4 pts PANTONE pro - blue 6.2 4 pts. PANTONE black 5.9

Pts = puntos

C = papel mate

Estas fórmulas de color PANTONE pueden obtenerse en:

55 Knickerbocker Road
Moonchie, New Jersey
07074 - 9988
USA
TEL. No: (201) 935 - 5500
TWX No: 710 - 989 - 0114
FAX No: (201) 896 -0242

5. Busar días soleados para la toma de datos de noviembre si se encontrará una manera de estandarizar la luz en todas las exposiciones fotográficas. Estas fotos serían más comparables.
6. La tercer toma de datos fue difícil de hacer pues la floración de los árboles oculta el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, sería importante evaluar el rebrote de hojas una vez que termine el periodo reproductivo del árbol. Esa cuarta toma de datos debiera hacerse a mediados de mayo del 1997.

IV TRANSMISION DEL FITOPLASMA CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA HOJA PEQUEÑA EN *Gliricidia sepium* (Kunth).

4.1. INTRODUCCION

Enfermedades fitoplasmáticas no son transmitidas a través de la savia. El fitoplasma se encuentra solamente en los tubos cribosos del floema y células compañeras de plantas enfermas. Es por medio de insectos vectores que se transmite la enfermedad. Estos insectos vectores pertenecen a la familia de los saltahojas (Cicadellidae), saltapatas (Fulgoroidea), cercópidos o chinches de saliva (Cercopidae) ó psilidos (Psyllidae). Otra forma de transmisión es a travez del uso de plantas mas suculentas como la cúscuta (*Cuscuta* spp.) que se usa como un injerto y para la propagación de partes enfermas de plantas (Castaño-Zapata, 1994, Agrios, 1992).

N.G. Agrios (1992) afirma que los insectos vectores adquieren el patógeno luego de alimentarse por horas o días en una planta enferma, aumentando su infectividad si lo hacen de tejido joven de la planta. El insecto necesita un periodo de incubación para poder transmitir la enfermedad entre 10 a 45 días, dependiendo de la temperatura. Esto es porque el fitoplasma se multiplica primero en las células internas del vector y luego pasa a la hemolinfa e infecta órganos internos. Cuando la concentración de fitoplasma alcanza un nivel adecuado en las glándulas salivales del insecto, se inicia la transmisión del patógeno, a plantas nuevas para toda la vida, es decir de manera circulativa.

Este estudio trabajó levantando la fauna insectil asociada al árbol de *Gliricidia sepium*, esto es muy importante para poder hacer la búsqueda del insecto vector responsable de la transmisión de la enfermedad de la hoja pequeña (EHP) para poder desarrollar algun método de control en base a esta. Para la detección del insecto vector se necesita hacer pruebas de vectorajes, en este estudio desarrolló una metodología para hacer posteriores pruebas de vectoraje de la EHP. También se probaron dos insectos resultantes del levantamiento de insectos como posibles vectores de la hoja pequeña.

4.2. OBJETIVOS

Objetivo General:

Generar información básica sobre la relación entre el insecto vector y la EHP.

Objetivos específicos:

- Levantar la fauna insectil asociada al árbol enfocando en vectores potenciales.
- Desarrollar un método de cría para candidatos posibles insectos vectores.
- Desarrollar una metodología para determinar el insecto vector del EHP.
- Identificar el insecto vector, responsable de la transmisión de la enfermedad.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el trabajo en tres fases: El levantamiento de la fauna insectil, desarrollo de una metodología de cría y estudios de adquisición y transmisión de la enfermedad.

4.3.1 Levantamiento de insectos

Para escoger los insectos a evaluar en las pruebas de vectoraje, se necesitaban conocer los insectos asociados al árbol, que potencialmente podrían ser vectores, por pertenecer a familias taxonómicas conocidas como vectores de enfermedades micoplasmáticas.

Se recolectó insectos haciendo énfasis en Cicadelidos, Membrácidos y Cercópidos, porque son familias insectiles importantes, como vectores de enfermedades micoplasmáticas. (Castaño-Zepeda 1994) ya que todos tienen aparato bucal chupador y penetran hasta el floema al hacer su punción (Andrews y Quezada, 1987).

La recolección de insectos se hizo en la parcela de *G. sepium* ubicada en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), establecida en 1987 en coordinación con el Instituto Forestal de Oxford (OFI) y el Consejo Nacional Forestal de Honduras (CONSEFORH).

Los insectos fueron recolectados en el período comprendido entre junio de 1996 hasta febrero de 1997. La recolección de insectos se hizo manualmente y con la ayuda de un aspirador para los insectos más pequeños. Los insectos fueron identificados a nivel de género algunos y otros a nivel de especie por el Dr. Ronald Cave, taxónomo de la Escuela Agrícola Panamericana.

Se seleccionaron los cicadellidos más pequeños que según comunicación personal con L. Kenyon fitopatólogo del NRI, los reporta como mejores vectores potenciales de enfermedades fitoplasmáticas. Mientras que las ordenes de Membrácidos y Coleoptera reportan menos organismos transmisores del fitoplasma.

4.3.2. Cría de *Empoasca hastosa*

Para la cría de vectores se establecieron cincuenta plantines en maceteros plásticos de cinco pulgadas de diámetro. Para ello se usó semilla recolectada de árboles cercanos a la EAP, pues el fitoplasma no se transmite por semilla. Se utilizó suelo pasteurizado a 80°C para la siembra.

Para asegurar la propagación de plantas totalmente sanas se cubrió los maceteros con bolsas plásticas porosas y se introdujo estas en cajas de malla fina para evitar el acceso de insectos y la posibilidad de infección de los plantines..

Se recolectó *E. hastosa* en estado adulto y ninfal del campo y se transfirió a plantines de *G. sepium* sanos, para que allí se produzcan varias generaciones del insecto en la planta. Las plantas fueron reemplazadas por nuevas cuando el daño del insecto fué muy severo.

El uso de bolsas plásticas porosas fue una herramienta muy cómoda para la cría y el manipuleo de los insectos, estas bolsas no presentaron problemas de rompimiento o fuga de los insectos.

4.3.3 Estudios de transmisión de la enfermedad

a) *Empoasca hastosa*

En este ensayo insectos adultos y ninfas extraídos de la cría fueron expuestas en el campo por cinco días en tres ramas jóvenes de árboles vivos con severos síntomas de la enfermedad. Se sacaron muestras foliares para verificar la presencia del fitoplasma. Las ramas se embolsaron en bolsas plásticas porosas de 58*28 cm. Dentro de cada bolsa se colocó entre 25 a 35 insectos en su mayoría adultos y algunas ninfas. Al quinto día las ramas fueron cortadas. De estas ramas se sacaron muestras foliares para confirmar la presencia del fitoplasma por la prueba de PCR.

De cada rama cortada se tuvieron insectos suficientes como para infectar tres o cuatro plantines. Cinco insectos fueron colocados por macetero, algunos fueron puestos en estadíos ninfales y otros en adultos (Tabla 19). Los insectos de *E. hastosa* permanecieron 24 días en las plantas sanas, para dar oportunidad a que el micoplasma se incube en el insecto vector y pueda ser transmitido a plantas sanas. La prueba para *E. hastosa* se realizó desde el 5 de diciembre al 14 de enero del 1997

Tabla 19. Longevidad de *Empoasca hastosa* en plantas sanas durante 35 días de transmisión.

Nro. de plantín	Insectos iniciales	Estadio y nro. de insectos transferidos		Mortalidad del insecto en diferentes tiempos de exposición , en días						Total de insectos recolectados
		Ninfas	Adultos	3	5	10	14	21	24	
R ₁₁	5	2	3	0	1	0	0	2	2	5
R ₁₂	5	0	5	1	0	0	1	0	3	5
R ₁₃	5	0	5	1	0	3	0	0	2	6
R ₂₁	5	1	4	1	0	0	0	0	3	4
R ₂₂	5	0	5	1	0	2	0	1	1	5
R ₂₃	5	0	5	1	0	0	1	2	0	4
R ₂₄	5	0	5	2	0	0	0	0	2	4
R ₃₁	5	0	5	0	0	1	1	0	3	5
R ₃₂	5	0	5	2	0	1	0	0	2	5
R ₃₃	5	0	5	3	0	0	0	1	1	5

R₂₁ Significa que es el primer macetero de la segunda rama.

El periodo de incubación del fitoplasma en el insecto y transmisión a plantas sanas, fue entre 3 hasta 29 días, limitada esta exposición por la mortalidad del insecto. En algunos casos hubieron nuevas generaciones como en la planta R₁₃ de *E. hastosa*, confundiendo con los insectos iniciales (adultos). Por lo tanto cuando el dato no fue confiable se recolectaron los insectos dudosos para ser analizados.

Transcurrida dos semanas del retiro de los insectos del macetero se sacaron muestras foliares de 3gr. para constatar la transmisión del fitoplasma

Los plantines R₁₂, R₂₃, R₃₂, R₃₃ perdieron todas sus hojas por el daño del insecto por lo cual se debió esperar su rebrote para sacar muestras para el análisis de PCR.

b) *Alconeura sp.*

El ensayo con *Alconeura sp* se hizo con insectos recolectados del campo. Se expusieron entre 25 y 35 insectos por rama con síntoma de la enfermedad. Hubo una alta mortalidad del insecto en ramas enfermas , por lo cual se debió hacer una segunda recolección (Tabla 23). Se tomaron muestras foliares de estas ramas para confirmar la presencia del fitoplasma.

La primer fecha de exposición de los insectos a ramas enfermas fué el 11 de enero y la segunda el 17 de enero de 1997. Para la incubación del fitoplasma en sus organismos y posterior transmisión a plantas sanas se expusieron los insectos de las primeras ramas 8 - 36 días y de la segunda 8-30 días (Tabla 20). En este estudio se intentó prolongar la exposición de los insectos en las plantas a manera de aumentar la posibilidad de incubación y transmisión de la enfermedad.

Tabla 20. Longevidad de *Alconeura sp.* en plantas sanas durante 13 a 37 días de transmisión.

Nro. de plantín	Insecto s iniciales	Cantidad de insectos transferidos	Mortalidad del insecto en diferentes tiempos de exposición , en días						Total de insectos recolectados
			8	12	17	22	27	31	
		Adultos	8	12	17	22	27	31	
R ₁₁	5	5	2		1			3	3
R ₂₁	5	5	1					1	1
R ₂₂	5	5	1					1	1
		Adultos	2	6	11	16	21	25	
R ₃₁	5	5	1						1
R ₃₂	5	5		3		1	1	1	6
R ₄₁	5	5	2			1	1	1	5
R ₄₂	5	5				1	1	2	4
R ₄₃	5	5	4	1					5
R ₄₄	5	5	3		2		1	2	7

Algunos insectos murieron en el periodo estimado para la incubación (Tabla 23) , estos fueron recolectados, otros no fueron encontrados en el suelo del macetero por lo tanto se perdieron formando parte del error experimental. En algunos casos hubieron nuevas generaciones como en el caso de plantas R₃₂ y R₄₄.

Estos se recolectaron también para la prueba PCR. Los recolectados fueron guardados en refrigerador, para ser mezclados con los que sobrevivieron todo el periodo de incubación y transmisión del fitoplasma. (Tabla 19 y 20), para luego poder ser enviados al análisis de laboratorio. Se sacaron muestras foliares transcurrida dos semanas del retiro de los insectos del macetero, para permitir la diseminación del fitoplasma en el tejido vegetal.

c) Método de diagnóstico

El Dr. Nigel Harrison fitopatólogo de la Universidad de Fort Lauderdale (Florida - USA), se encargó del diagnóstico de la presencia del fitoplasma mediante la prueba de Reacción en la Cadena Polimérica (PCR) en las muestras insectiles y foliares. Para la prueba PCR se usó la sonda extraída de *Cajanus cajan*, planta portadora del mismo fitoplasma y se usó 30 ciclos de amplificación.

Se analizaron los insectos de cada ensayo, las muestras foliares de las ramas enfermas usadas para infectar los insectos y los plantines, antes y después que se realizara la prueba.

Para el envío de los insectos, un preservativo Borax (Ca₂ Cl). fué puesto en las puntas de pequeños tubos de ensayo ente 0.2 a 0.3 gr. Luego se colocó un poco de papel toalla a manera de evitar el contacto directo del preservativo con los insectos. Los insectos fueron colocados encima del papel toalla.

Las muestras foliares fueron pequeñas ramas y hojas extraídas de plantines y ramas usados en la prueba, entre 1.5 a 3 gr, según la disponibilidad de hojas. A veces no se logró tener los 3 gr de tejido fresco como es lo ideal, debido al poco desarrollo de los plantines. Para el envío el Borax fué mezclado con la muestra foliar en un tubo de ensayo entre 1.5 a 1 gr. por muestra.

En los casos de pérdidas de hoja en los plantines se esperó el rebrote para obtener tejidos destinados a los análisis foliares (Tabla 19). puesto que *G. sepium* suele dejar caer sus hojas ante cualquier condición del estrés hídrico.

4.4 DISCUSION Y RESULTADOS

4.4.1 Insectos asociados con *Gliricidia sepium*

Del levantamiento de insectos, se recolectaron ocho especies abundantes en el árbol, llamando la atención dos cicadellidos *Empoasca hastosa* Ross & Moore y *Alconeura sp.* por ser los posibles transmisores de la enfermedad. (Tabla 21)

Tabla 21. Insectos asociados *Gliricidia sepium*

Género y especie	Orden	Familia	Sitio de recolección
<i>Empoasca hastosa</i> (Ross & Moore)	Homopte ra	Cicadellidae	EAP/Hondur as
<i>Alconeura sp</i>	Homopte ra	Cicadellidae	EAP/Hondur as
<i>Homalodisca vitripennis</i> (Germar.)	Homopte ra	Cicadellidae	EAP/Hondur as
<i>Oncometopia clarior</i> (Walker)	Homopte ra	Cicadellidae	EAP/Hondur as
<i>Calloconophora oblicua</i> (Dietrich.)	Homopte ra	Membracida e	EAP/Hondur as
<i>Polyglyptodes sp.</i>	Homopte ra	Membracida e	EAP/Hondur as
<i>Hypoptus sp.</i>	Coleopte ra	Curculionida e	Nicaragua
<i>Colecerus sp.</i>	Coleopte ra	Curculionida e	Nicaragua

4.4.2 Cría de insectos vectores

E. hastosa que tuvo una etapa de cría previa a las pruebas de adquisición y transmisión, presentó menor mortalidad en estas pruebas. En cambio *Alconeura sp.* fue muy susceptible al manipuleo pues tuvo alta mortalidad en la etapa de adquisición y transmisión. Los insectos expuestos a ramas enfermas en el campo tuvieron el mayor porcentaje de mortalidad. La recolección de insectos y el traspaso a ramas enfermas en el campo el mismo día, provocó alta mortalidad. En la fase de incubación y transmisión *Alconeura sp.* tuvo también una alta mortalidad, y fué muy difícil poder exponer los insectos 30 a 37 días como se quería.

En la cría de *E. hastosa* terminado el periodo de exposición, las plantas de los maceteros (R12, R23, R32 y R33) quedaron muy afectados por lo que perdieron todas sus hojas antes de poder extraerlas para el análisis de PCR por lo que se mandaron los rebrotes dos semanas después. Este severo daño se debió a la producción de numerosas generaciones nuevas de los insectos de los plantines.

En *Alconeura sp.* si hubieron generaciones nuevas pero no en esa proporción, lo que observamos en estos insectos fué que la nueva generación tendió más a confundirse con los insectos iniciales.

Se notó que los insectos necesitan sombra para permanecer en los maceteros embolsados usados para la cría. Los insectos a medida que se van reproduciendo en el macetero, van matando el plantín por lo cual se necesita traspasar los insectos en dos o más plantines. Los insectos necesitan que las plantas estén bien regadas y no deben estar expuestos al sol para evitar la mortalidad de los insectos y el intento de escape de los insectos. Cuando los insectos intentaban escapar quedaban adheridos en la cinta adhesiva utilizada para cerrar el corte hecho en la bolsa en el momento de la introducción de los insectos en el macetero.

No se observaron problemas con depredadores o parasitoides que afectaran de alguna manera la cría.

Cinco insectos por plantín es un buen número para evitar tener que hacer el traspazo muy pronto.

4.4.3 Metodología de pruebas de vectoraje

En el periodo de incubación y transmisión los dos cicadellidos produjeron nuevas generaciones siendo difícil en algunos casos reconocer los insectos iniciales con los que se comenzó la prueba. Según comunicación personal con el Dr. Pablo Guzmán profesor de la Universidad de California. El fitoplasma no se transmite a la fase de huevo del insecto, sino que cuando hace sus primeras punciones para alimentarse adquiere nuevamente el fitoplasma., en este caso probablemente se disminuye probabilidad de encontrar resultados positivos en el tejido del insecto.

Empoasca kraemeri que forma parte del complejo de *Empoasca fabae* al cual pertenece también *E. hastosa*. (Ross y Moore 1957) tiene un periodo de desarrollo, desde el estado de huevo hasta su transformación en adulto, de 18 días en promedio. Luego de la pre-oviposición de cinco días aproximadamente, la hembra coloca entre 107 huevos insertados en el tejido vegetal. Viviendo la hembra un promedio de 65 días y los machos

58 días. (Gonzales A., 1994). Tomando estos datos como referencia se propone para alargar los periodos usados en la adquisición, incubación y transmisión de la enfermedad fitoplasmática, de esta manera mejorar la probabilidad de un resultado positivo. Es necesario conocer la vida promedio del insecto para para maximizar de esta manera los días de adquisición y transmisión del fitoplasma. Este dato será también útil para trabajar con una misma edad del insecto y de esta manera evitar que nuevas generaciones se confundan con nuevas en el momento de recolectar los insectos para el análisis de PCR. Otra alternativa podría ser sexar los insectos previamente para evitar nuevas generaciones.

Shiomi T. (1990), resalta la importancia de la temperatura en el tiempo de adquisición y transmisión del fitoplasma en el cicadellido *Macrosteles striifrons*, el cual adquirió el micoplasma con un 80 % de infección en 3 a 5 días de exposición, mientras que cuando lo hizo a 15°C alcanzó 64 % de infección en 7 días. El insecto a los 25 y 30 °C ya comenzó a transmitir la enfermedad a plantas sanas a las dos semanas alcanzando su pico de transmisión a la quinta semana. Mientras que a 20 °C comenzó recién al cuarto día a transmitir la enfermedad teniendo su pico de transmisión a la octava semana. Como no controlamos la temperaturas de nuestro ensayo lo mejor es trabajar con periodos lo más largos posibles.

La metodología usada fué cómoda de manejar y muy simple. Hubo una alta mortalidad de insectos embolsados en las ramas enfermas de *G. sepium por* adquirir la EHP.

Cuando se hacía en conteo cada 3 a 4 días de insectos vivos, no se encontraban algunos de los muertos en el suelo del macetero formando esto parte del error experimental.

4.4.4 Identificación del insecto vector

1. Los resultados preliminares del análisis de PCR en muestras foliares e insectiles, dieron resultados negativos. En *E. hastosa* los testigos positivos de la prueba de vectoraje no evidenciaron presencia del fitoplasma en el análisis de PCR. Es decir que las ramas con evidentes síntomas de la enfermedad usadas no se les pudo detectar el fitoplasma. En los testigos negativos (plantines antes del contacto con los insectos) no se les pudo encontrar la presencia del fitoplasma. Los insectos usados en la prueba no mostraron presencia del fitoplasma de la EHP, como tampoco los tejidos foliares usados en la alimentación de estos insectos.
2. Las posibles explicaciones podrían ser:
 - 2.1 Falta de tiempo adecuado en la fase de exposición ,incubación y transmisión.
 - 2.2 Falta de enfermedad en las ramas porque obtuvimos resultados positivos solamente para las ramas utilizadas para la infección del cicadellido *Alconeura sp.*
 - 2.3 Falta de sensibilidad de la prueba PCR porque el uso de tejidos demasiados fibrosos hace difícil la extracción de proteína para la prueba por lo cual las concentraciones del fitoplasma son muy bajas, y la prueba de PCR puede dar falsos negativos. Para disminuir este inconveniente, estudios similares usan plantas suculentas para la prueba de transmisión entre estas plantas se mencionan *Catharanthus roseus* (Bertaccini A. et. al. 1992, Guglielmonel et. al 1990), *Cuscuta campestris* (Bertaccini A. et al . 1992) *Brassica napus* (Sarson) cv. Oro. Cress, *Catharanthus roseus*, *Lettuca* sp. y *Portulaca oleracea* (Salhei M., Izadpanah K. 1992). En estudios futuros podría probarse *Portulaca oleracea*, maleza de amplia difusión en Zamorano, Honduras

4.5 CONCLUSION

Una etapa previa de cría de insectos era necesaria para llevar a cabo las pruebas exitosamente, es decir con poca mortalidad de los insectos.

El hecho de manejar varias generaciones en estas pruebas es confuso puesto que el período de transmisión es tan largo que da oportunidad a nuevas generaciones del insecto que se confunden con la antigua, en el momento de la recolección de los insectos iniciales para el análisis de PCR y por otro lado le producen mucho daño a las plantulas, habiendo mucha caída de hojas.

En la cría del insectos se debe tener cuidado de mantener la planta bien irrigada y en la sombra para evitar mortalidad de insectos. Por otro lado se debe usar un papel sobre el suelo del macetero para hacer mas visibles los insectos muertos que caen al piso y facilitar su recolección.

Las pruebas de vectoraje con *E. hastosa* y *Alconeura* no lograron identificar el insecto vector de la enfermedad, las pruebas de PCR dieron resultados negativos, lo que no necesariamente significa que ninguno de estos insectos no sean el transmisor de la enfermedad sino que estos resultados pueden deberse a la falta de concentración del fitoplasma en los tejidos insectiles y foliares. Problema común en especies algo leñosas.

4.6 RECOMENDACIONES

Es necesario hacer unos ensayos previos para tener conocimientos básicos de la biología de los insectos a probar, como ser los días del ciclo de vida, sus etapas y sobrevivencia del insecto como adulto para maximizar los días de adquisición e incubación del fitoplasma en el insecto y su posterior transmisión en plantas sanas.

Se deben repetir las pruebas de vectoraje con los insectos de la familia Cicadellidae *Empoasca hastosa* (Ross & Moore), *Alconeura sp.*, *Homalodisca vitripennis* (Germar.), y *Oncometopia clarior* (Walker),

En las pruebas de vectoraje se debe procurar manejar solo una generación.

Previo a la prueba PCR se debe hacer una concentración del ADN, luego de la fase de extracción de proteína para tener resultados más sensibles. Por otro lado se debe aumentar el número de ciclos al máximo posible para tener una prueba más sensible a la presencia del fitoplasma.

Registrar la temperatura en que se desarrollan las pruebas de adquisición, incubación y transmisión puede ser una herramienta útil a la hora de analizar los resultados y evaluar si los días usado en cada una de estas fase es el deseable.

V. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, N.G. 1995. Fitopatología. 2 ed. Massachusetts, USA., UTHEA p.619-633.
- BERTACCINI A. et al. 1994 Detection and molecular characterization of mycoplasma-like organism present in pear crops in *Emilia Romagna*. Rivista-di Frutticoltura e di Ortofloricultura (Bélgica, Italia) 56(9):83-86.
- BOA E. Y LENNÉ J.M. 1996. Diseases and Insects Pest. *Gliricidia sepium*; Genétic Resources. No. 33 :73-77.
- BOA E; LENNE 1996 *Gliricidia sepium* diseases. (Inglaterra) Avance técnico del Instituto Forestal de Oxford no.33:19-31.
- CASTAÑO-ZAPATA , J. 1994. Prinipios básicos de Fitopatología. 2 ed. Zamorano, Honduras., Zamorano Academic Press. p.407-417.
- CATIE 1991. Madero Negro; *Gliricidia sepium* (Jacquin) Kunth ex Walpers) árbol de uso múltiple en América Central/CATIE. Costa Rica. Editorial El país. 150p.
- GONZALES A. 1994 Control Biológico de *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) en dos sistemas de labranza. Tesis Lic. Zamorano, Honduras Programa de Ingeniería de Zamorano/E.A.P. p. 1-10.
- KIRKPATRICK B.C. et. al. 1990. Epidemiological and phylogenetic studies on westwrn x-disease mycoplasma like organism. Proviene del septimo Congreso de la organización Internacional de Micoplasmatología, Baden, Viena, 1988. p. 288-297.
- LAVIN M. 1996 Taxonomy. *Gliricidia sepium* genetic resources for farmers. (Inglaterra) Avance técnico del Instituto Forestal de Oxford no.33:3-17
- MACKENZIE C. 1995. El palo más útil aquí; Local perceptions of the uses of *Gliricidia sepium*. NRI. No CO762. Inglaterra. 15p.
- MANEJO integrado de Plagas Insectiles en la Agricultura: Estado Actual y Futuro. 1989 Ed. por K. Andrews; R. Quezada. Zamorano, Honduras., Zamorano Academic Press. 623 p.

- PONNAMMA K.N.; RAJEEV G.; SOLOMON J.J. 1991 Detection of mycoplasma like organism in *Proutista moesta* (Westwood) a putative vector of yellow leaf disease of arecaunt Plantación Crops Journal. (Kerala, India). 19(1):63-65.
- ROSS H.; MOORE T. 1957 New species in the *Empoasca fabae* complex (Hemiptera, Cicadellidae) Annals of entomological society of América. (USA) 50(2):118-122.
- SALEMI M.; IZADPANAH K.; 1992 Etiology and transmisión of sesame phyllody in Irán. Phytophatology Journal. (Shiraz, Irán). 135:1, p.37-47.
- SHIOMI T. 1990 Effect of air temperature on transmisión of sickle hare's ear yellow MLO by *Macrostes stiifrons*. Kansai Plant Protección Society. (Japan), 32:13-15.
- SHIOMI T.; SUGIURA M. 1984 Difference among *Macrostes orientalis* transmitted MLO, potato purple top wilt MLO in Japan and aster yellow MLO from USA. Annals of the Phytopathological Society of Japan 50(4):455-460.
- SIMONS A.J. 1996 Ecology and reproductive Biology. (Inglaterra) Avance técnico del Instituto Forestal de Oxford no.33:19-31.
- STATISTICAL APLICATION SYSTEM 1985 SAS/STAT. Guide 4 personal Computer. Versión 6.Cary, N.C. SAS. Institute INC. USA. 378 pg.