

**Caracterización de la Pudrición de Cogollo  
como una enfermedad independiente del  
Amarillamiento Letal del Cocotero y  
evaluación del uso de tetraciclina para su  
manejo.**

**Gabriel Alejandro Jaramillo Echanique**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2008

**ZAMORANO**  
**CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

**Caracterización de la Pudrición de Cogollo  
como una enfermedad independiente del  
Amarillamiento Letal del Cocotero y  
evaluación del uso de tetraciclina para su  
manejo**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Gabriel Alejandro Jaramillo Echanique**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2008

# **Caracterización de la Pudrición de Cogollo como una enfermedad independiente del Amarillamiento Letal del Cocotero y evaluación del uso de tetraciclina para su manejo**

Presentado por:

Gabriel Alejandro Jaramillo Echanique

Aprobado:

---

María Mercedes Roca, Ph.D.  
Asesora principal

---

Miguel Vélez, Ph.D.  
Director Carrera Ciencia  
y Producción Agropecuaria

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Decano Académico

---

Estela Aguilar, M.Sc.  
Asesora

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

---

Abelino Pitty, Ph.D  
Coordinador de Fitotecnia

## RESUMEN

Jaramillo, G. 2008. Caracterización de la pudrición de cogollo como una enfermedad independiente del amarillamiento letal del cocotero y evaluación del uso de tetraciclina para su manejo. Proyecto especial de graduación para el programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 23 p.

El cocotero (*Cocos nucifera*) es una especie de importancia económica para la población que habita en la costa caribe de Honduras. En la última década ha sido afectado por enfermedades que han disminuido su producción, siendo el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) y la Pudrición de Cogollo (PC), las dos principales causas de mortalidad observadas. Ambas enfermedades presentan síntomas diferentes en etapas finales de la enfermedad, pero muy similares en etapas tempranas que puede llevar a un análisis erróneo a simple vista. Se desconoce el agente causal de la PC, pero se sospecha que se trata de un complejo de hongos y bacterias. El estudio determinó que la PC es una enfermedad independiente del ALC y no un efecto secundario de la PC, como se creía. Se evaluó la aplicación de tetraciclina al tallo y a la raíz como posible agente de manejo para PC. Otro objetivo del estudio fue determinar la presencia de infecciones mixtas entre PC y ALC. Se seleccionaron 20 palmas y se dividieron en tres grupos: al primer grupo se aplicó tetraciclina en la raíz, al segundo se aplicó tetraciclina en el tronco y al tercer grupo sin aplicación se consideró testigo. La duración y monitoreo del estudio fue de cinco meses con observaciones periódicas de cuatro a siete semanas. Mediante técnicas moleculares (PCR) se identificó una palma que presentó infección mixta (ALC y PC). Aunque los resultados del tratamiento con tetraciclina son ambiguos, se determinó que la PC es una enfermedad independiente del ALC.

**Palabras clave:** ALC, antibiótico, PC, PCR.

## ABSTRACT

Jaramillo, G. 2008. Characterization of the Bud Rot Disease as an independent disease from Coconut Lethal Yellowing and evaluation of root and trunk applications of tetracycline for its management. Special graduation project for the Program of Agricultural Science and Production, Zamorano, Honduras, 23p.

The coconut palm (*Cocos nucifera*) is a species of great economic importance for the coastal communities of the Honduran Caribbean coast. This species has been affected by several diseases that have significantly decreased production. Coconut Lethal Yellowing (LY) and Bud Rot Disease have been the main cause of palm mortality. The two main mortality causes observed. Both diseases present different symptoms in the final stages, but very similar symptoms in the early stages which at first glance could lead to wrong analysis. The causal agent of the Bud Rot Disease is still unknown, but it is thought that the disease is caused by a complex of bacteria and fungi. This study determined that the Bud Rot Disease in coconut palm in Honduras is an independent disease from Coconut Lethal Yellowing, and it is not a secondary effect of Lethal Yellowing, as it was thought. The application of the antibiotic tetracycline, was evaluated as a management practice for Bud Rot by applying it to the trunk and the roots of palms. Twenty palms were selected and divided into three treatments: the first treatment received antibiotic applications to the roots, the second treatment was to the trunk and the third treatment had no antibiotic application and was considered the control. The study lasted five months with periodic observations every four to seven weeks which included sample collection for Bud Rot Diseases and Lethal Yellowing. Molecular techniques (PCR) were used to identify LY and only one palm had mixed infection of Bud Rot and Lethal Yellowing. Although antibiotic application to treat Bud Rot gave ambiguous results, the study determined that Bud Rot is an independent disease from Lethal Yellowing.

**Key words:** Antibiotic, LY, BR, PCR

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Contenido.....	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>26</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro		Página
1.	Primers universales y grupos específicos del Amarillamiento Letal de Cocotero.....	16
2.	Resultado de los tratamientos con tetraciclina y análisis para ALC y PC.....	19
3.	Evolución del grado de severidad de las palmas.....	20
4.	Relación entre síntomas y presencia de patógenos.....	21
Figura		
1.	Síntomas de Pudrición de Cogollo.....	4
2.	Escala de severidad para PC.....	5
3.	Síntomas de Amarillamiento Letal de Cocotero.....	6
4.	Escala de severidad para ALC.....	7
5.	Diferencia de síntomas del Amarillamiento Letal del Cocotero y de la Pudrición de Cogollo.....	8
6.	Distribución de las palmeras con sus respectivos tratamientos.....	9
7.	Tratamiento a la raíz.....	10
8.	Tratamiento al tronco.....	11
9.	Grafica de toma de muestras para Pudrición de Cogollo.....	13
10.	Toma de muestras para PC.....	14

11.	Toma de Muestra para Amarillamiento Letal de Cocotero.....	15
12.	Gel de electroforesis para Amarillamiento Letal de Cocotero al 1% mostrando productos del PCR con P1P7.....	22

#### Anexo

1.	Palma 11 (a la raíz).- Muerta por Pudrición de Cogollo.....	26
2.	Palma 8 (testigo).- Muerta por infección mixta entre ALC Y PC.....	27
3.	Preparación de reactivos.....	28
4.	Protocolo para extracción de ADN.....	28



## INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera*) es una especie de importancia económica para la población que habita en la costa Caribe de Honduras, debido a su utilización en la alimentación y la producción de artesanías. Su importancia para la economía de las poblaciones rurales costeras aumenta cada vez más, ya que se puede extraer biodiesel de su aceite en lugares donde la producción industrial de palma de aceite no es posible, como en las zonas de playa e islas.

El cocotero ha sido afectado por diferentes enfermedades que han devastado también a otras palmáceas, incluyendo la palma de aceite. En las últimas décadas, en la costa norte de Honduras se ha presentado un alto nivel de mortalidad de palmas a causa de enfermedades como Pudrición de Cogollo (PC) (40-50%), Amarillamiento Letal de Cocotero (ALC) (20-30%), anillo rojo causado por picudo (*Rhynchophorus palmarum*) y otros factores bióticos y abióticos (10- 20%) (Roca 2007).

Los síntomas de estas tres enfermedades son similares, sobre todo en las etapas iniciales. Históricamente, se ha considerado que la PC es un efecto secundario de una infección severa de ALC y no como un problema independiente. Los síntomas de PC sugieren que en la enfermedad puede ser una infección mixta, provocadas por hongos y bacterias. La PC se manifestó a gran escala en los años sesenta en palma aceitera en el norte de Colombia. En los dos últimos años se han reportado pérdidas del 1.4 % de las plantaciones de palma de aceite en Colombia, que dan como consecuencia pérdidas económicas significativas para los productores (Rocha 2007). Otros reportes recientes en periódicos nacionales, reportan pérdidas de más del 30% en algunas zonas (Roca <sup>1</sup>2008).

En Ecuador las pérdidas por PC han sido también importantes, llegándose a perder mas de 4000 ha. de palma desde 1980 (Román <sup>2</sup>2008). A pesar de las pérdidas en producción causadas por la PC en Colombia, Ecuador y Honduras, no se ha podido identificar los agentes causales de esta enfermedad. En Ecuador todavía se sospecha la presencia de *Phytophthora sp.* como agente causal de la PC, aunque investigaciones intensivas no han logrado confirmar este hecho (Román 2008)

Durante casi dos años, en Honduras también se realizaron estudios exhaustivos para determinar si *Phytophthora* era la causa de la PC. Se realizaron estudios de micología clásica (aislamiento, trampas, microscopia) así como también pruebas moleculares (Magandi Sánchez y Padilla Alduvin 2005). Se enviaron muestras de aislamientos al CABI de Inglaterra y su personal vino a Honduras a apoyar en el esfuerzo.

---

<sup>1</sup>Comunicación personal, Dra. Roca, laboratorio de diagnóstico molecular. Zamorano. Honduras

<sup>2</sup>Comunicación personal, Dr. Roman, Investigación de palma Ecuador.

Además se colaboró con el Central Science Laboratory (Inglaterra) para desarrollar primers para *Phytophthora* para PCR en tiempo real. Todos los resultados confirmaron la ausencia de *Phytophthora* en palmas con síntomas de PC.

En un estudio paralelo a esta investigación (Suazo Tejada 2008) se realizaron pruebas de patogenicidad y los análisis bioquímicos revelaron dos bacterias que se pueden considerar como candidatos a agentes causales de la PC en Honduras: una bacteria crema con características del género *Erwinia* (denominada BCTE) y una segunda bacteria de color rojo intenso (denominada BR), también con características bioquímicas del género *Erwinia*. Estas dos bacterias continuarán siendo caracterizadas en los laboratorios del CABI en Inglaterra.

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar los síntomas de la PC desarrollando una escala de severidad. Además de estudiar si la enfermedad de la PC es independiente del ALC o si es un efecto secundario de ésta. Finalmente se evaluó la respuesta de aplicaciones de tetraciclina aplicada a la raíz y al tronco, como práctica de manejo para PC en palmas que se encontraron en el grado 0 al 2 dentro de esta escala de severidad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Después de una búsqueda prolongada para encontrar el sitio idóneo para el estudio, se seleccionó una plantación comercial de cocoteros en la localidad de Esparta (Departamento de Atlántida), propiedad de la compañía Dinant.

El criterio de selección para establecer el ensayo fue seleccionar las palmas con síntomas clásicos de PC en etapas tempranas, para lo que se utilizó una escala de severidad del daño causado por la PC (Figura 2). En el estudio se seleccionaron palmas que tuvieran el grado 0 al 2 dentro de esta escala.

## Descripción de síntomas de PC

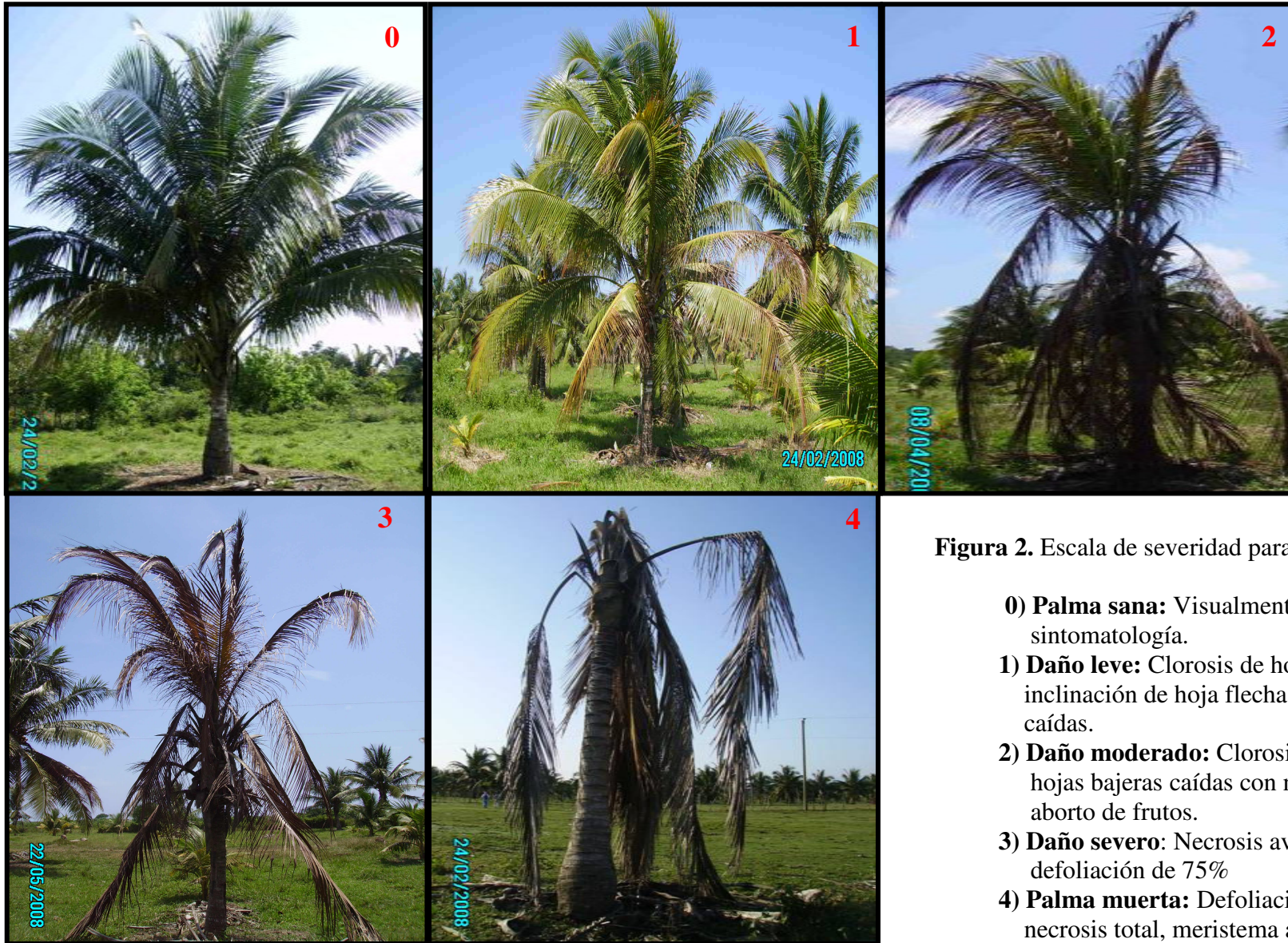
La Pudrición de Cogollo (PC) se caracteriza por producir inicialmente una pudrición de la base de la hoja flecha, acompañada, en ocasiones con clorosis de las hojas jóvenes. Éstas se desprenden con facilidad, luego las que siguen y después de 2 ó 4 meses la mayor parte de las hojas de la planta han caído (Figura 1). Las hojas viejas, cuyos tejidos de unión con el tronco son más fuertes permanecen unidas por varios meses, dándole a la corona del cocotero un aspecto característico inconfundible que denota presencia del mal (Fremond *et al.* 1969). Posteriormente se produce una pudrición húmeda en la zona del meristemo induciendo, eventualmente, el colapso de la corona que cae hacia un lado de la palma (FONINPAL 2003).

Es posible que los insectos que atacan a esta especie sean los vectores mecánicos que transmiten la enfermedad porque permiten la entrada de microorganismos en los tejidos internos de la palma al provocar perforaciones. En las palmas atacadas, los frutos que se encuentran en proceso de desarrollo rara vez llegan a su estado de madurez. Una vez se han presentado los primeros síntomas de la enfermedad, no se vuelve a formar ningún fruto (MAG, 2002)



**Figura 1.** Síntomas de Pudrición de Cogollo. (Fotos MM Roca). **A.** Hoja flecha caída. **B.** Palma necrótica a punto de doblarse, **C.** Tejido interno putrefacto y emite un olor fétido.

### Desarrollo de la escala de severidad para Pudrición de Cogollo.



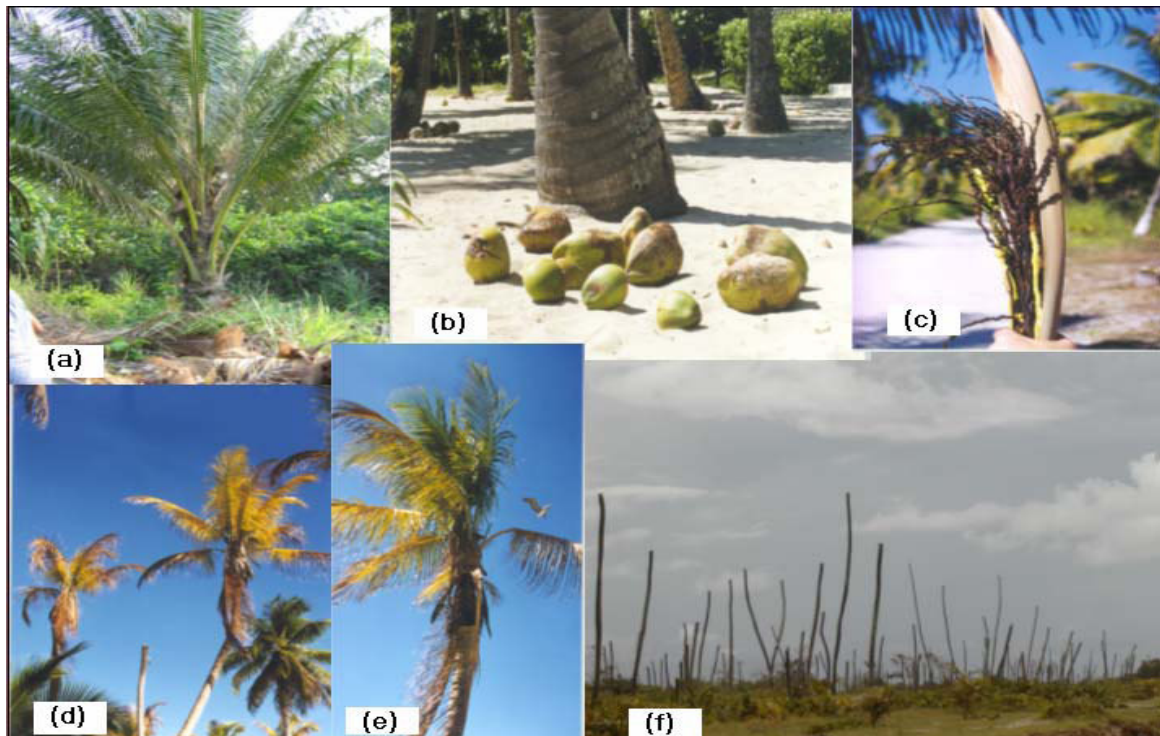
**Figura 2.** Escala de severidad para PC

- 0) Palma sana:** Visualmente no presenta sintomatología.
- 1) Daño leve:** Clorosis de hojas jóvenes, inclinación de hoja flecha, hojas bajas caídas.
- 2) Daño moderado:** Clorosis en un 50%, hojas bajas caídas con necrosis, aborto de frutos.
- 3) Daño severo:** Necrosis avanzada, defoliación de 75%
- 4) Palma muerta:** Defoliación de 95%, necrosis total, meristema apical doblado y flácido.

### Descripción de síntomas de ALC

Los síntomas iniciales del ALC, se relacionan con la caída prematura de los cocos, la cual puede ser parcial o total. Posteriormente se da el amarillamiento de las hojas bajas de la palma y necrosis de las inflorescencias nuevas (Fig. 3).

Las hojas bajas alcanzan una coloración marrón y pueden permanecer pegadas al tronco de la planta o caer. Las hojas del medio presentan una coloración amarilla y las espatas se encuentran totalmente ennegrecidas. La mayoría de las hojas secas y fracturadas caen y la planta se asemeja a un poste telefónico (Castillo López 2005).



**Figura 3.** Síntomas de Amarillamiento Letal de Cocotero: a) Planta sana b) Caída prematura de cocos, estadio 2. c y d) Necrosis de la inflorescencia y hojas amarillas, estadio 3. e) hojas se tornan amarillas y marrón, estadio 4. f) palma se asemeja a un poste telefónico, estadio 5.

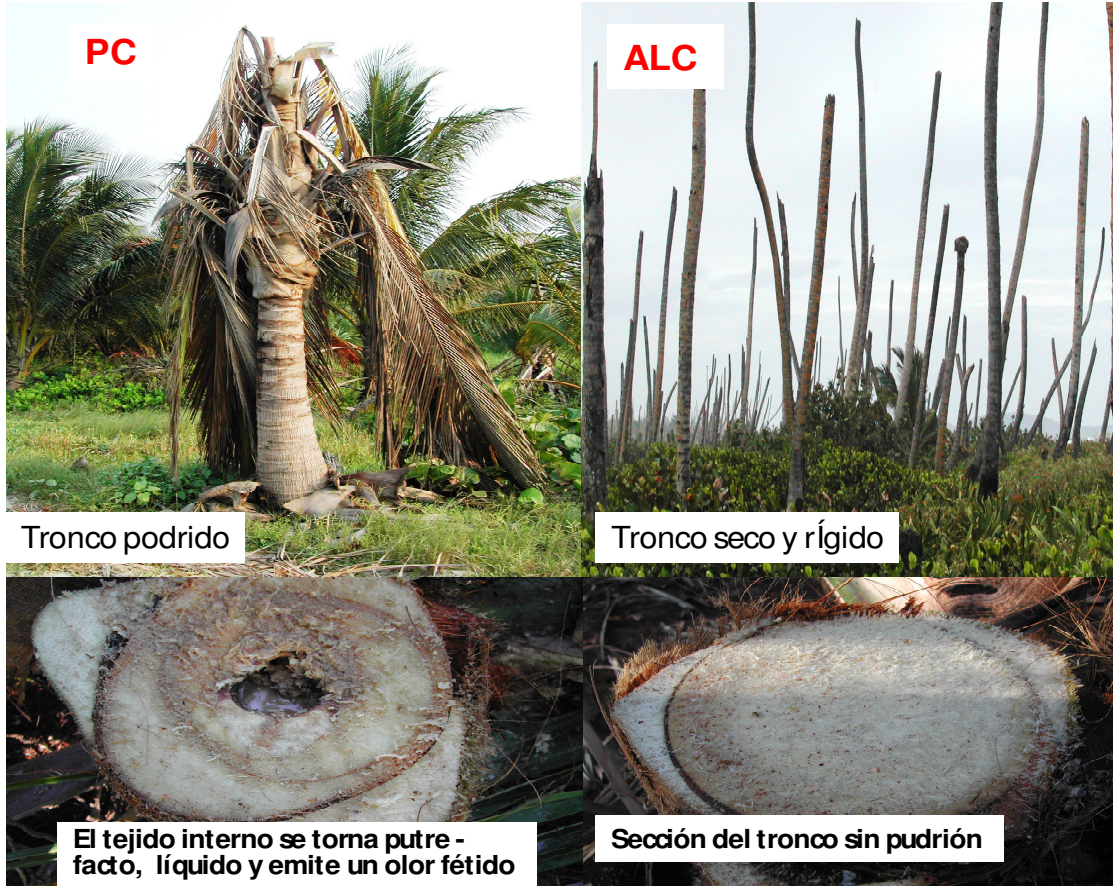
### Desarrollo de la escala de severidad para Amarillamiento Letal del Cocotero.



**Figura 4.** Escala de severidad para ALC

**0) Palma sana:** Visualmente no presenta sintomatología, **1) Daño leve:** Clorosis de hojas jóvenes, inclinación de hoja flecha, hojas bajas caídas, **2) Daño moderado:** Clorosis en un 50% hojas bajas caídas con necrosis, aborto de frutos. **3) Daño severo:** Necrosis avanzada, defoliación de un 90%, **4) Palma muerta:** Defoliación de 100%, tronco parece un poste telefónico.

## Diferencias de las infecciones de PC y ALC



**Figura 5.** Diferencia de síntomas del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) y de la Pudrición de Cogollo (PC)



### Criterio de selección de palmas con PC para el estudio.

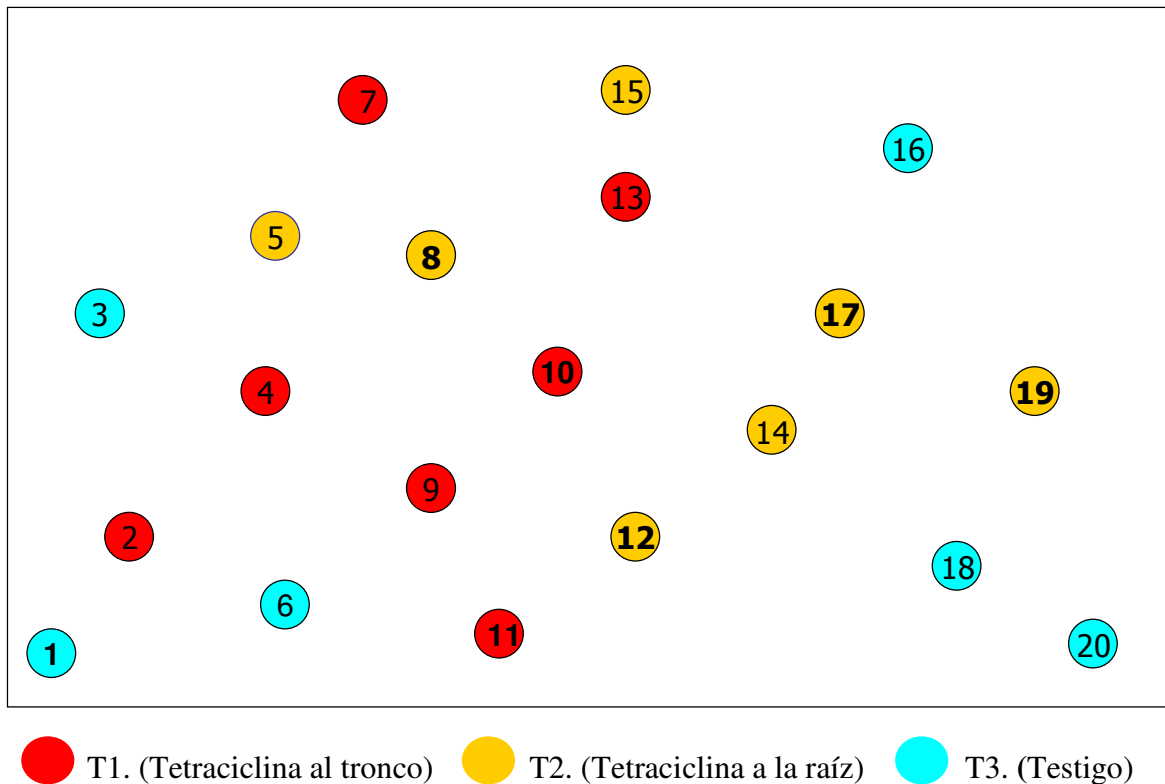
Se utilizó la escala de severidad (Figura 2), desarrollada para el estudio, como criterio para seleccionar las palmas que se utilizaron en el estudio. Se encontraron algunas limitantes que hicieron la selección de palmas ambigua; ya que los síntomas de clorosis del follaje en etapas tempranas pueden ser confundidos con factores abióticos como nutrición deficiente y estrés hídrico. En el estudio se utilizaron palmas que tuvieron del grado 0 al 2 dentro de la escala de severidad (Figura 2).

### Selección de palmas

Se seleccionaron 20 plantas utilizando la escala de severidad (Figura 2). Las que se rotularon y dividieron en tres tratamientos. La asignación de las palmas a los tratamientos se hizo completamente al azar (Figura 6).

Tratamientos y palmeras involucradas:

- |                                   |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1) Seis con aplicación a la raíz  | (1, 3, 6, 16, 18, 20)      |
| 2) Siete con aplicación al tronco | (2, 4, 7, 9, 10, 11, 13)   |
| 3) Siete sin aplicación (Testigo) | (5, 8, 12, 14, 15, 17, 19) |



**Figura 6.** Distribución de las palmeras con sus respectivos tratamientos.

### Rotulación de palmas para diferenciar tratamientos

Luego de la asignación de las palmas por tratamiento, se procedió a numerarlas con pintura de colores, dependiendo el tratamiento:

- Verde para palmas con aplicaciones a la raíz
- Rojo para palmas con aplicaciones al tronco
- Negro para palmas testigo

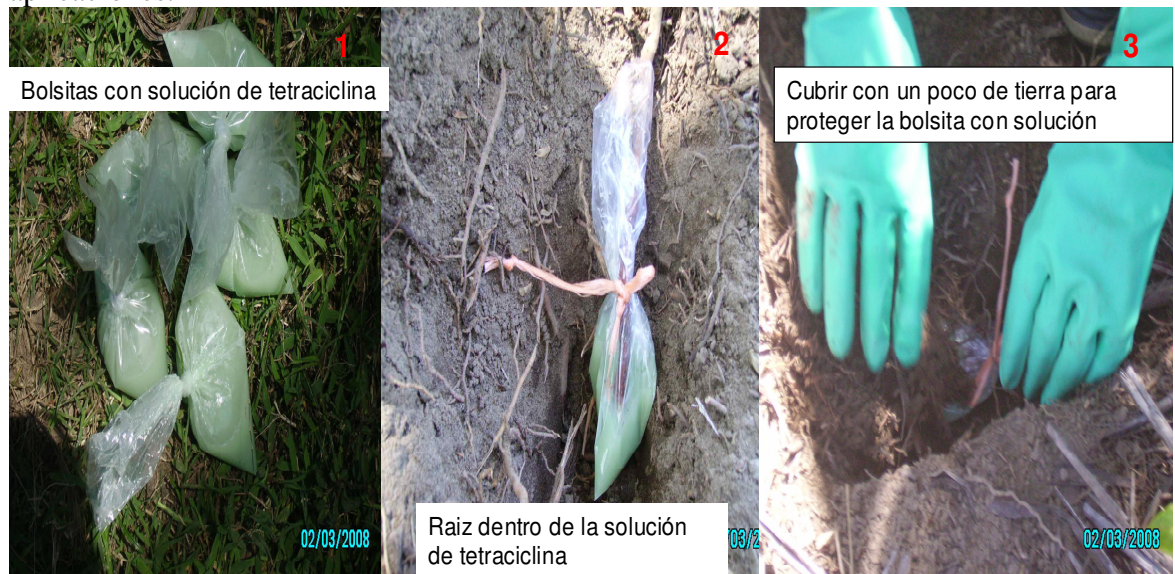
Posteriormente se membretó el tronco con su tratamiento correspondiente con cinta Scotch® (Figura 6) y se les dio un número dentro de la escala de severidad al principio y al final de los tratamientos (Cuadro 2).

### Aplicación de Tratamientos

#### • Tratamiento con tetraciclina a la raíz

En este tratamiento se escarbó al pie del tallo del cocotero hasta encontrar una raíz. Esta fue cortada en la sección final llamada cofia, para que permitiera una mejor absorción de la solución de tetraciclina. La solución estaba compuesta de 4 gr. del antibiótico y 60 ml de agua, que se aplicó en una bolsa plástica de (20 × 15 cm), amarrada a la raíz.

**Aplicaciones.-** Se realizaron cuatro aplicaciones con un intervalo de un mes entre aplicaciones.



**Figura 7 .** Tratamiento a la raíz.

**1)** Se preparó la solución en una bolsita plástica de (20 × 15 cm). **2)** La raíz se introdujo dentro de la bolsa con el antibiótico para permitir su absorción. **3)** Se tapó la bolsita con un poco de tierra como protección.

- **Tratamiento con tetraciclina al tronco**

Con un taladro manual se abrió un orificio en el tronco del cocotero con un ángulo de inclinación de 40°C y una profundidad de 5 cm. En este se aplicaron 12 ml de tetraciclina en presentación de 100 mg/ml. Posteriormente se selló el orificio con plastilina para evitar la entrada de posibles microorganismos contaminantes (Fig. 8). Por sugerencia de Oropeza (comunicación personal, & 2008). Se realizaron cinco aplicaciones con un intervalo entre aplicación de dos días. Cabe recalcar que se aplicó el tratamiento en el mismo orificio todas las veces por lo que solamente fue necesario herir la palma una vez con el taladro.

**Aplicaciones.-** Se realizaron 5 aplicaciones con un intervalo entre aplicaron de dos días.



**Figura 8.** Tratamiento en el tronco.

**1.** Abertura del orificio en el tronco del cocotero. **2.** Inyección de tetraciclina. **3.** Sellado del orificio con plastilina.

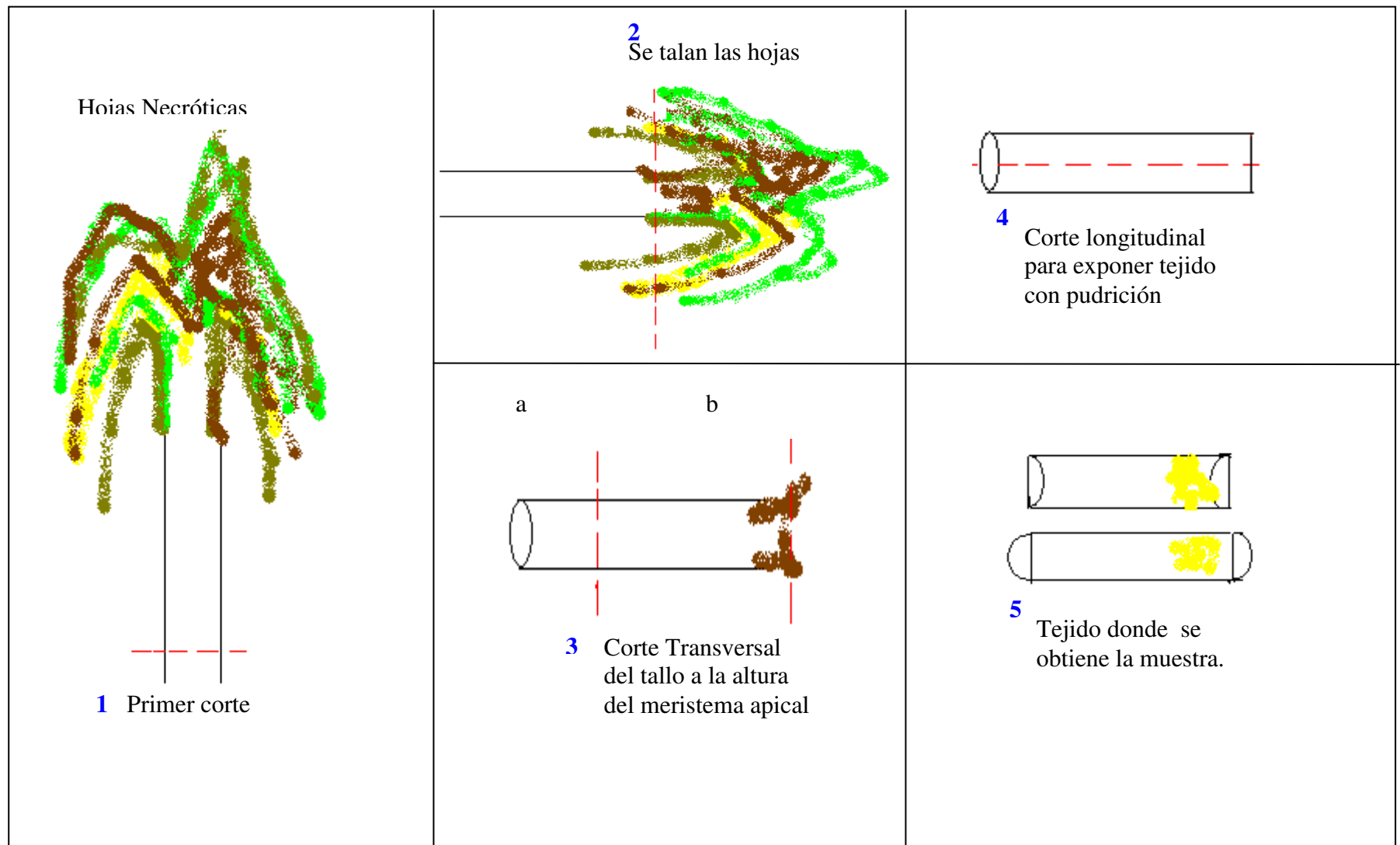
& Comunicación personal, Dr. Carlos Oropeza, unidad de biotecnología. C ICY- México.

### **Toma de muestras para PC**

La toma de muestras para PC no es una práctica bien definida. La norma común es derribar la palma y tomar un trozo de tejido interno del meristema con signos de pudrición y trasladarlo a un laboratorio (normalmente al día siguiente) para proceder con análisis fitopatológicos. Estas prácticas conllevan a un alto grado de contaminación de la muestra, al momento del análisis y no han permitido obtener resultados claros o confiables.

Es difícil identificar los cocoteros enfermos en las primeras fases ya que los síntomas no son visibles hasta que la enfermedad se encuentra muy avanzada y los síntomas son comúnmente confundidos con el ALC (Rivera Vega 2007). Para muestrear cocoteros con PC es necesario sacrificar palmas que estén en un estado avanzado de la enfermedad (grado 3 – 4). Se realiza cortes transversales en el tallo de aproximadamente 80 cm de longitud, a una altura por encima del meristema apical, para posteriormente hacer un corte longitudinal, que divida a la palma talada en dos y así poder tomar una muestra del tejido interno (Figura10).

Posteriormente se procedió a tomar la muestra e inocular un frasco de cultivo agar (Figura 10). Los análisis se realizaron en el laboratorio de Zamorano. En este estudio se pudieron tomar dos muestras para PC de las palmas ocho y once cuando se encontraban con un grado cuatro dentro de la escala de severidad (Figura 2).



**Figura 9.** Gráfica de toma de muestras para Pudrición de Cogollo



**Figura 10.** Toma de muestras para PC.

**A)** Tala y cortes de cocotero. **B)** Localización de pudrición en el cogollo. **C)** Inoculación de la muestra en un medio de cultivo.

#### **Toma de muestras para ALC.**

Para establecer si la PC es una enfermedad que ocurre independientemente del ALC, se procedió a tomar muestras para ALC de todas las palmas seleccionadas en el ensayo, sin tomar en cuenta los síntomas. Se quería investigar si en las palmas con síntomas clásicos de PC se podía detectar el fitoplasma del ALC, lo mismo que en palmas aparentemente sanas.

Las muestras se colectaron del tejido interno (floema) del tronco en un buffer CTAB para evitar la degradación del ADN (Figura 11) y siguiendo el método descrito en el manual de Zamorano (Castillo Lisardo 1999) se analizaron las muestras en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Zamorano.



**Figura 11.** Toma de Muestra para Amarillamiento Letal de Cocotero.  
 1) Recolección de la muestra. 2) Muestras de los 20 cocoteros de este estudio.

### **Análisis de muestras**

#### **Análisis de muestras para ALC (PCR)**

Las muestras del tejido interno para el análisis de ALC se procesaron en el Laboratorio de Diagnostico Molecular de Zamorano, con los siguientes procedimientos:

#### **Extracción de ADN**

El ADN de las muestras se extrajo según el método Doyle y Doyle (1990) modificado por Harrison, (1998).

#### **Amplificación de ADN por PCR directo y por nPCR**

Se realizaron pruebas de diagnóstico de ALC a través de PCR (Polimerase Chain Reaction). Se utilizaron los primers universales para fitoplasmas (P1, P7) (Harrison 1998) y para aumentar especificidad y sensibilidad en el diagnostico, los productos obtenidos en el PCR directo fueron sometidos a una prueba de PCR anidado (o Nested PCR), técnica que utiliza primers específicos para el grupo de Amarillamiento Letal. Para primers (LY16S/LY16S23rs) (Harrison 1998) (Cuadro 1).

#### **Electroforesis horizontal**

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 80 voltios. Posteriormente el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio para visualizar los resultados con luz ultravioleta.

**Cuadro 1.** Primers universales y grupos específicos del Amarillamiento Letal de Cocotero

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Autores</b>
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GATT	Deng y Hiruki 1991
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	Schneider 1995
LY16S	CAT GCA AGT CGA ACG GAA ATC	Harrison 1997
LY16S/23sr	TTG AGA ATT TAC GTT GTT TAT CTA C	Harrison 1997
LYR1	TCG TTT TGA TAA TCT TTC ATT TGA C	Harrison 1997
LYF1	CAT ATT TAT TTC CTT TGC AAT CTG	Harrison 1997

### **Análisis para PC**

El análisis para PC fué realizado en un estudio paralelo (Suazo Tejada 2008) quien realizó una caracterización bacteriológica clásica, pruebas bioquímicas, un análisis molecular por PCR y pruebas de patogenicidad (bioensayos).



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Caracterización de síntomas de ALC y PC**

La caracterización sistemática de los síntomas del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) y de la Pudrición de Cogollo (PC) permitió establecer sin ambigüedad que ambas enfermedades tienen una sintomatología parecida al inicio de la infección (grado 1-2), pero a medida que la enfermedad avanza (grado 3-4), los síntomas de infección se tornan muy característicos y es posible distinguir el ALC del PC. (Figura 2). La enfermedad de la PC en cocotero en Honduras es una enfermedad independiente del ALC y no un efecto secundario del ALC.

### **Tratamiento con tetraciclina al tronco**

En las aplicaciones de tetraciclina cada dos días la palma absorbió el volumen total del antibiótico solamente durante las dos primeras aplicaciones. En las aplicaciones subsecuentes hubo saturación en las palmas, que llegaron a expulsar parte del antibiótico inyectado. Se concluye que este no es el procedimiento apropiado para inyectar antibiótico en palmas de coco.

De las siete palmas tratadas se obtuvieron: cuatro palmas con aparente reversión de síntomas de grado uno a cero, una que mantiene el grado de severidad desde el inicio hasta el final del estudio y en estados terminales de la enfermedad (Cuadro 3).

### **Tratamiento con tetraciclina a la raíz**

Al realizar la aplicación de tetraciclina a la raíz con intervalos entre aplicación de un mes, se observó que hubo una absorción total del producto en un tiempo de dos a tres días. También se observó retardo del avance de la enfermedad en tres palmas (Cuadro 2).

De las seis palmas tratadas se obtuvieron: tres palmas con reversión de síntomas de grado uno a cero, dos que mantienen el grado de severidad desde el inicio hasta el final del estudio y una en grado tres en la escala de severidad (Figura 2)

### **Testigo**

De las siete palmas se obtuvieron: una palma con aparente reversión de síntomas de grado uno a cero, cuatro que mantienen el grado de severidad desde el inicio hasta el final del estudio, una en grado tres en la escala de severidad (Figura 2)

La reversión de síntomas en algunas palmas, en especial la número cinco crea ambigüedad por cambiar de grado 1 a 0 en la escala de severidad, sin que se le haya aplicado ningún antibiótico. Posiblemente esta observación se deba a que la planta no presentaba clorosis por PC si no por otros factores no determinados en este estudio. Una de las dificultades para determinar infecciones tempranas por PC en palmas es la similitud de síntomas de la enfermedad con los de deficiencias nutricionales o estrés hídrico.

**Cuadro 2.** Resultado de los tratamientos con tetraciclina a la raíz o al tronco

Palmas	Tratamientos	Fechas de monitoreo					ALC	PC
		12/03.	18/04.	22/05.	08/07.	06/10.		
1	A la raíz	0	0	0	0	0	-	n
3	A la raíz	1	0	0	0	0	-	n
6	A la raíz	0	0	0	0	3	-	n
16	A la raíz	1	1	0	0	0	-	n
18	A la raíz	0	0	0	0	0	-	n
20	A la raíz	1	0	0	0	0	-	n
2	Al tronco	1	1	0	0	0	-	n
4	Al tronco	0	0	0	0	0	-	n
7	Al tronco	2	2	2	2	3	-	n
9	Al tronco	1	1	0	0	0	-	n
10	Al tronco	1	1	1	0	0	-	n
11	Al tronco	1	2	3	4	4	-	x
13	Al tronco	1	1	0	0	0	-	n
5	Testigo	1	1	0	0	0	-	n
8	Testigo	0	2	3	4	4	+	x
12	Testigo	0	0	0	0	0	-	n
14	Testigo	0	0	0	0	0	-	n
15	Testigo	0	0	0	0	0	-	n
17	Testigo	0	0	0	0	0	-	n
19	Testigo	0	0	0	0	0	+	n

+ Plantas positivas para ALC; - Plantas negativas para ALC; × Plantas positivas para PC, **n** No se hizo prueba  
**0.** Palma sana, **1.** Daño leve, **2.** Daño moderado, **3.** Daño severo, **4.** Palma muerta.

### Análisis de tratamientos

**Cuadro 3.** Evolución del grado de severidad del daño en las palmas.

<b>Grado de severidad</b>		<b>(al tronco)</b>	<b>(a la raíz)</b>	<b>(testigo)</b>
<b>Inicial</b>	<b>Final</b>	<b>(7 palmas)</b>	<b>(6 palmas)</b>	<b>(7 palmas)</b>
0	0	1	2	4
0	3		1	
0	4			1
0	4			
1	0	4	3	1
1	4	1		
2	3	1		1
		<b>7</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

### Análisis de muestras para PC.

La toma de muestras para PC se realizó únicamente en las palmas 8 y 11, cuando se encontraron en la etapa terminal de la enfermedad. De las muestras obtenidas se pudo aislar colonias de bacterias las cuales se encuentran en etapa identificación (Suazo Tejada 2008).

### Análisis de ALC por PCR

Después de realizar el análisis para ALC de las 20 palmas se observó que las plantas 8 y 19 resultaron positivas para ALC en la gel de electroforesis (Figura 12). Dando como resultado la senescencia de la planta 8 que presentaba a parte de los síntomas de ALC, síntomas de PC en escala 3 (Figura 2). Por lo que se clasificó como una palma con infección mixta (ALC y PC). Por el contrario la planta número 19 no presentó síntomas de ALC pero mostró resultado positivo al realizar el PCR.

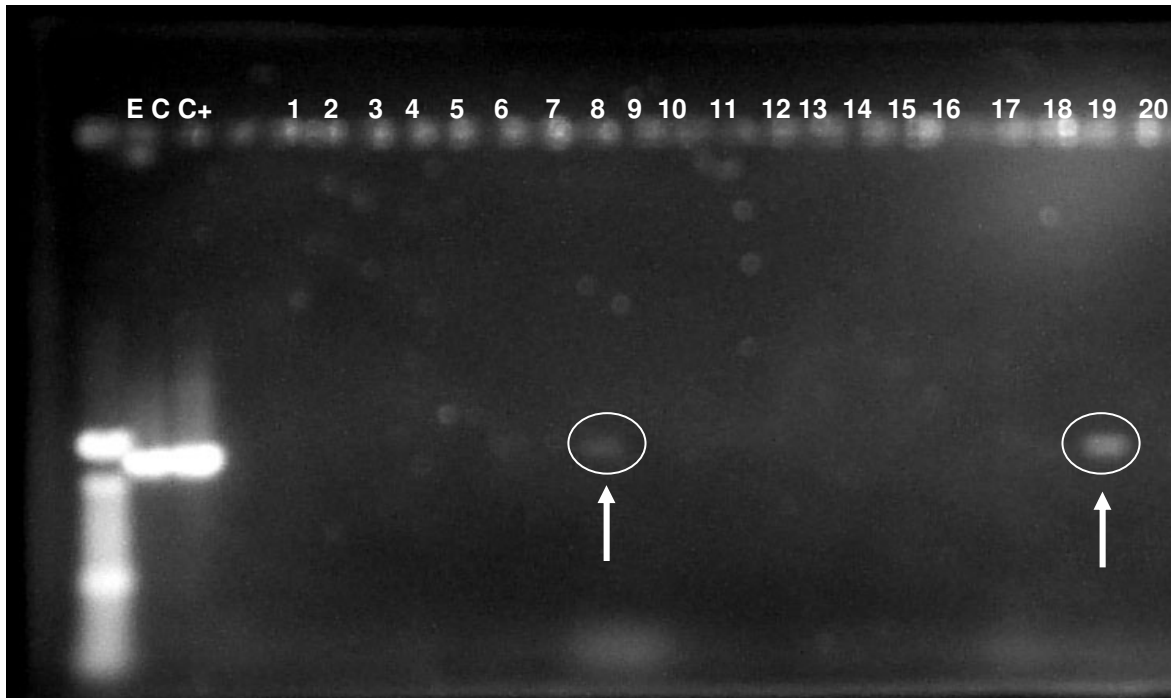
**Cuadro 4.** Relación entre síntomas y presencia de patógenos.

Palmas	Muestreos		Síntomas de severidad al muestreo				Análisis de laboratorio	
	12/03/2008	06/10/2008	Sana	ALC $\infty$	PC	Mixta	ALC	PC
1	0	0	x				-	n
2	1	0				x	-	n
3	1	0				x	-	n
4	0	0	x				-	n
5	1	0			x		-	n
6	0	3	x				-	n
7	2	3			x		-	n
8	0	4	x				+	+
9	1	0			x		-	n
10	1	0				x	-	n
11	1	4				x	-	+
12	0	0	x				-	n
13	1	0			x		-	n
14	0	0	x				-	n
15	0	0	x				-	n
16	1	0			x		-	n
17	0	0	x				-	n
18	0	0	x				-	n
19	0	0	x				+	n
20	1	0				x	-	n

+ Plantas positivas para ALC o PC; - Negativas para ALC; x Plantas positivas para PC; n No se hizo prueba; 0. Palma sana; 1. Daño leve; 2. Daño moderado; 3. Daño severo; 4. Palma muerta;  $\infty$  No presentó síntoma

En consecuencia se comprueba que el ALC y el PC son dos enfermedades independientes y establecen que el PC no es un efecto secundario del ALC, como se lo ha considerado (Cuadro 4).

La palma 8 y 20 no mostraron síntomas clásicos de ALC, pero sin embargo fueron positivas al fitoplasma del ALC al analizarlo por PCR. No fue posible analizar todas las palmas para PC ya que el muestreo requiere sacrificar la palma y un análisis subsecuente, laborioso y costoso.



**Figura 12** Gel de electroforesis para Amarillamiento Letal de Cocotero al 1% mostrando productos del PCR con P1P7

Productos de la amplificación obtenida por PCR con primers P1P7. **E:** Escalera molecular, **C+:** Control positivo, **C-:** Control negativo. Flechas indican los productos de la amplificación obtenidos 1,700pb en las muestras 8 y 19.

Ya que el ALC es causada por un fitoplasma (bacteria sin pared celular) sensible a antibióticos, y el PC es posiblemente causado por bacterias del genero *Erwinia* (Rivera Vega 2007; Suazo Tejada 2008), se considera apropiado tratar palmas con infecciones de ALC o PC, con tetraciclina. El tratamiento de ALC con inyecciones de tetraciclina es ampliamente utilizado en la Florida y otros lugares donde se cultivan palmáceas como ornamentales.

## **CONCLUSIONES**

- Se determinó que la PC es una enfermedad independiente del ALC, y no un efecto secundario del ALC como se creía históricamente. Este resultado es significativo para las plantaciones de coco en Honduras.
- La clorosis que presentaron algunas palmas al principio de los tratamientos pudo deberse a factores no determinados en este estudio y que se consideraron erróneamente síntomas de PC. Este hecho dificultó la interpretación posterior de resultados, con los tratamientos de tetraciclina.
- La tetraciclina inyectada al tronco no es absorbida por la palma de coco.
- Se encontró una palma con infección mixta de ALC y PC.

## **RECOMENDACIONES**

- Encontrar una plantación comercial de cocotero de mayor escala que permita ampliar considerablemente el número de palmas analizada y permita aplicar un análisis estadístico al estudio.
- Evaluar un sistema de inyección Emicina® diferente, como el utilizado para el manejo de ALC.
- Se recomiendan prácticas culturales (control de malezas, distanciamiento adecuado, fertilización, drenajes) y como medida de protección contra enfermedad, la aplicación de fungicidas.
- Se recomiendan seguir las prácticas realizadas en Jamaica, monitoreando síntomas tempranos de cualquier enfermedad y derribar y quemar las palmas enfermas.

## LITERATURA CITADA

Castillo López, D. 2005. Evaluación de la situación actual de las variedades resistentes a la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Atlántida y Colon, Honduras. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 53 p.

Castillo, M. 1999. Estudio básico de la diversidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 53 p.

Doyle, J.; Doyle, L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Fremond, Y.; Ziller, R.; Nuce de Lamonthé, M. 1969. El Cocotero; Pudrición del Cogollo, Colección Agricultura Tropical. 1ª ed. Barcelona – España. 165 p.

FONINPAL (Fondo de Investigación en Palma Aceitera). 2003; Pudrición del Cogollo, Boletín informativo nro. 24. En línea. Visitado el 5 de octubre de 2008. Disponible en: <http://www.foninpal.org/boletines/boletin24a.htm>

Harrison N. 1998 Recent studies on detection of Letal Yellowing disease phytoplasmas in the Americas. In proceedings of an International Workshop on LY like diseases of coconut, Elmina, Ghana, November 1995.

Magandi Sánchez, J.; Padilla Alduvin, A. 2005. Evaluación de la situación actual de las variedades resistentes a la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Atlántida y Colón, Honduras. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 45p.

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, VE). 2002. Dirección General de desarrollo agrícola departamento de cultivos. El Cocotero y su cultivo. En línea. Visitado el 15 mayo de 2008. Disponible en: [http://webmail.radiomaranon.org.pe/radiomaranon.org.pe/redmaranon/archivos/coco\\_cultivo.pdf](http://webmail.radiomaranon.org.pe/radiomaranon.org.pe/redmaranon/archivos/coco_cultivo.pdf)

Rivera Vega, L. 2007. Identificación y caracterización de hongos y bacterias asociados con la pudrición de cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 17 p.

Roca, M.M. 2007. Reporte de progreso Proyecto TCP/hon 3002 FAO Honduras. 41 p.



Roca, M.M. 2008. Progress report CFC, Project on sustainable coconut production through control of Coconut Lethal Yellowing. Kingston, Jamaica.

Rocha, P. 2007. Sanidad de la palma de aceite en Colombia. XXXV Congreso Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite. En línea. Visitado el 14 de agosto de 2008. Disponible en: <http://www.fedepalma.org/document/2007/7PRocha.pdf>

Suazo Tejada, G. 2008. Confirmación de un posible agente causal de la pudrición del cogollo en Honduras. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 20 p.

## ANEXOS

### Anexo 1. Palma 11 (a la raíz).- Muerta por Pudrición de Cogollo



La palma número 11 (a la raíz), al 12/02/2008 presentó grado de severidad número uno (daño leve), luego de tres meses el 08/07/2008, se puede observar que terminó con una grado cuatro (muerta), dentro de la escala de severidad.

**Anexo2. Palma 8 (testigo).- Muerta por infección mixta entre ALC Y PC**

La palma número 8 , al 12/02/2008 presento grado cero (palma sana) y luego de tres meses el 08/07/2008, termino con una grado cuatro (muerta), dentro de la escala de severidad. Presento infección mixta por ALC y PC.

### **Anexo 3. Preparación de reactivos**

#### **Reactivos**

##### **Buffer CTAB 1**

2% CTAB

1.4M NaCl

20mM EDTA pH8

100 mM Tris – HCl pH8

1% PVP-40

0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol

Disolver los reactivos excepto el  $\beta$ -mercaptoetanol, en aproximadamente 500ml de agua destilada aplicando calor. Enfriar y ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado. Aforar a 1 L. Esterilizar en el autoclave durante 20 min. a 120 °C 15 psi. Dejar enfriar y adicionar el  $\beta$ -mercaptoetanol antes de usar, mezclar y almacenar a 65 °C.

##### **Buffer CTAB 2**

10% CTAB

0.7 M NaCl

##### **Cloroformo: Alcohol isoamilico 24: 1**

96 ml de cloroformo

4 ml de alcohol isoamilico

##### **Buffer TE alto en sal**

1mM EDTA

1M NaCl

10mM Tris-HCl pH 8

Esterilizar en el autoclave durante 20 min. a 120 °C 15 psi 53

##### **Isopropanol**

Etanol al 95 %

65

Etanol al 70%

70 ml etanol

30 ml agua destilada

### **Anexo 4. Protocolo para extracción de ADN**

1. Colocar en un mortero aproximadamente 1 g del tejido a extraer y agregar 600  $\mu$ l de CTAB 1.
2. Agregar 0.1 g de arena de cuarzo ultrapura y macerar el tejido con un pistilo.
3. Transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
4. Incubar a 65 C por 30 min.
5. Añadir (igual volumen )600  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, mezclar bien.
6. Centrifugar por 5 min. a 12,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga, evitando la interfase.
8. Añadir 1/10 del volumen de CTAB 2

9. Repetir pasos 5, 6 y 7.
10. Añadir 2/3 del volumen de isopropanol frío, mezclar bien.
11. Centrifugar por 10 min. a 12,000 rpm.
12. Decantar el líquido cuidando de no botar el precipitado de ADN.
13. Secar al aire o en una incubadora.
14. Resuspender el precipitado en 100  $\mu$ l de buffer TE alto en sal.
15. Añadir 250  $\mu$ l de etanol frío al 95% (se puede dejar a 4 °C toda la noche para obtener una mejor precipitación del ADN).
16. Centrifugar 10 min. a 12,000 rpm.
17. Repetir paso 12.
18. Agregar 500  $\mu$ l de etanol al 70% frío.
19. Centrifugar 10 minutos a 12,000 rpm.
20. Repetir pasos 12 y 13.
21. Resuspender el precipitado en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril.
22. Almacenar a 4 °C.

