

Caracterización de un posible agente causal de la pudrición de cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras

Gerardo Eladio Suazo Tejada

Zamorano Honduras
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Caracterización de un posible agente causal de la pudrición de cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras

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

Presentado por:

Gerardo Eladio Suazo Tejada

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

Caracterización de un posible agente causal de la pudrición de cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras

Presentado por:

Gerardo Eladio Suazo Tejada

Aprobado:

María Mercedes Roca, Ph.D.
Asesora Principal

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

Estela Aguilar, M.Sc.
Asesora

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

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

RESUMEN

Suazo Tejada, G E. 2008. Caracterización de un posible agente causal de la pudrición de cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras. Proyecto especial Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 21 p.

Honduras atravesó por una epidemia de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en la década de los noventa, que se agudizó después del Huracán Mitch en 1998. Entre 2001 y 2003 se establecieron programas de replantación con variedades tolerantes al ALC (híbridos Maypan, Enanos Malayos y Altos del Pacífico) que años después han sucumbido a nuevos ataques de lo que se consideraba ALC, poniendo en duda la tolerancia de estos materiales. Estudios recientes realizados por la Universidad Zamorano, establecieron que estas replantaciones de cocoteros no solo estaban muriendo a causa del ALC, sino por una nueva enfermedad: la Pudrición del Cogollo (PC) de etiología desconocida, que también afecta a la palma de aceite en Honduras, Ecuador y Colombia. Debido a que los síntomas de la PC, sobre todo en etapas tempranas de la infección, se confunden con el ALC. En Honduras no existen programas de manejo para ésta nueva enfermedad y todos los esfuerzos son enfocados al ALC. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar los posibles agentes causales de la pudrición de cogollo (PC) en palma de coco en la costa norte de Honduras. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano. Se tomaron muestras representativas de palmas con síntomas clásicos de PC a lo largo de la costa norte de Honduras (Departamentos de Cortés, Atlántida y Colón). Para evitar contaminación los primeros aislamientos de posibles patógenos se realizaron directamente en el campo, inoculando frascos con Agar Nutriente (AN), a partir de diferentes tejidos, caracterizados para este fin. Se seleccionaron 24 aislamientos que fueron caracterizados sistemáticamente por microscopía, análisis bioquímicos, pruebas inmunológicas y pruebas de patogenicidad, en plantas de crisantemos. Las pruebas de patogenicidad y los análisis bioquímicos sugieren dos posibles aislamientos de bacterias como candidatos para agentes causales de la PC en Honduras : una bacteria con características clásicas del género *Erwinia* (denominada en este estudio como BCTE) y otra bacteria de coloración rojo intenso (denominada BR) también con las características bioquímicas del género *Erwinia*, excepto por el color. No se encontró en la literatura una bacteria patógena con esta coloración, por lo que es imperativo continuar con la caracterización de este aislamiento.

Palabras clave: Análisis bioquímicos, *Erwinia*, primers, postulados de Koch, reacción de hipersensibilidad.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Descripción de la escala de severidad para la Pudrición de Cogollo..	4
2. Primers utilizados para la reacción PCR.....	10
3. Composición del Master mix para PCR.....	10
4. Caracterización de bacterias de diferentes tipos de tejido infectado...	12
5. Caracterización de aislamientos.....	13
6. Pruebas de patogenicidad en hojas inoculadas.....	16
7. Análisis bioquímicos, pruebas de patogenicidad y pruebas moleculares (PCR) de aislamientos de bacterias seleccionadas.....	18

Figura

1. Mapa de Honduras indicando las localidades del estudio.....	3
2. Escala de severidad para ALC y PC.....	4
3. Método de toma de muestras.....	5
4. Tipos de tejido para la toma de muestras.....	6
5. Esquema de identificación para bacterias fitopatógenas.....	8
6. Sistema de nomenclatura de tipo de bacterias aisladas de diferentes tejidos.....	11
7. Sistema de nomenclatura para aislamientos.....	12
8. Pruebas rápidas (tiras inmunológicas para <i>Ralstonia</i> sp.).....	14
9. Pruebas de patogenicidad.....	17

Anexo

1.	Uso de FTA Cards®.....	23
2.	Postulados de Koch.....	24

INTRODUCCIÓN

El cocotero es la palma más importante de las áreas costeras de los trópicos húmedos, se cultiva en 85 países de la zona intertropical donde cubre una superficie de 10.49 millones de hectáreas (Franqueville 2001). En la actualidad, la producción de cocotero cobra cada vez más importancia ya que su aceite puede utilizarse para la producción de biocombustible bajo condiciones artesanales en áreas donde una agricultura industrial no es posible. Como las áreas de playa de la costa norte de Honduras e islas de la Bahía.

Se estima que antes de la llegada del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) a Honduras (a mediados de la década de los noventa), existían alrededor de 6 000 ha de palmas de coco, con una población de unos 660 000 cocotereros, que producían aproximadamente 29 millones de frutos por año; lo que representaba un monto de 30 millones de lempiras anuales (equivalentes a aproximadamente 1.8 millones de dólares). En la actualidad, se estima que esta producción ha declinado un 95% y que el precio de un fruto de coco es de 10 a 15 veces más de lo que fue antes del ALC (Roca *et al.* 2006).

Para apoyar a las comunidades afectadas por el ALC, se establecieron entre 2001 y 2003, programas de replantación con variedades tolerantes al ALC (híbridos Maypan, Enanos Malayos y Altos del Pacífico) que años después han sucumbido a nuevos ataques de ALC, poniendo en duda la tolerancia de estos materiales. Estudios detallados recientes realizados por la Universidad Zamorano, establecieron que estas replantaciones de cocotereros no solo estaban muriendo a causa del ALC, sino por una nueva enfermedad: la Pudrición de Cogollo (PC) de etiología desconocida, que también afecta a la palma de aceite en Honduras, Brasil, Ecuador y Colombia (Franqueville 2001). Debido a que los síntomas de la PC, sobre todo en etapas tempranas de la infección, se confunden en gran medida con el ALC, en Honduras no existen programas de manejo para esta nueva enfermedad y todos los esfuerzos son enfocados al ALC.

Actualmente la mortalidad de las palmas en Honduras es causada por tres enfermedades principales: Pudrición de Cogollo (PC) con una incidencia del 40 – 50%, seguida de muerte de palmas por ALC (20 – 30%) y el Anillo Rojo (10-20%) (Roca 2008).

Por muchos años se atribuyó la pudrición observada en palmas en Honduras a una infección por hongos del género *Phytophthora* (ya que ha sido ampliamente reportada en Jamaica)(Roca 2008). Estudios exhaustivos realizados en Zamorano con colaboración del CABI y del Central Science Laboratory de Inglaterra, descartaron a *Phytophthora* como el agente causal de la PC en Honduras. En Ecuador, desde hace una década se ha tratado de aislar *Phytophthora*, en palmas de aceite sin éxito¹.

¹Roca, MM. 2008. Pudrición de cogollo (PC) en Honduras (entrevista). Universidad Zamorano, Honduras.

Es posible que la PC en palma de coco y palma de aceite estén asociadas, por lo que se considera de interés económico establecer la etiología de las enfermedades en ambas especies (Roca 2008).

En investigaciones recientes en Zamorano se han identificado bacterias y hongos asociados a la pudrición de cogollo. Estos patógenos incluyen: *Erwinia amylovora*, *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Fusarium solani* y *F. proliferatum* (Rivera Vega 2007).

Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre la PC, se desarrolló paralelamente a este estudio, una investigación para establecer si la PC es una enfermedad independiente del ALC en Honduras y para evaluar aplicaciones de antibióticos como estrategia de manejo en una plantación comercial de Lean, Depto. Atlántida (Jaramillo Echenique 2008)

La investigación paralela busca establecer si la PC se puede manejar con aplicaciones de antibióticos (Tetraciclina) para retardar los síntomas o como una práctica preventiva. Si se logra retardar los síntomas de PC con el uso del antibiótico, es una confirmación indirecta que el patógeno primario de la PC puede ser una bacteria o un fitoplasma (Roca 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Selección de localidades para el muestreo

Para el estudio se hicieron recolecciones a lo largo de la costa Atlántica de Honduras que incluye Cuero y Salado, Lean (Depto. Atlántida), Ciriboya (Depto. Colón), y en La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) (Depto. Cortés) (Figura 1). En todos los sitios se encontraron cocoteros con sintomatología de PC. Se procedió a la descripción de los síntomas, toma de muestras y a establecer un record de fotografías electrónicas.



Figura 1. Mapa de Honduras indicando localidades donde se realizaron los muestreos para el estudio.

Para la selección de los cocoteros muestreados se elaboró una escala de severidad de la enfermedad de 0 a 4, siendo 0 una planta sana y 4 una planta muerta (Cuadro 1, Figura 2).

Cuadro 1. Escala de severidad para la Pudrición de Cogollo (PC).

Escala	Severidad	Sintomatología
0	Planta sana	Sin síntomas
1	Daño leve	Hoja flecha caída, clorosis de las hojas jóvenes, hojas bajas caídas en un 25%.
2	Daño moderado	Clorosis avanzada hojas bajas en un 50%, aborto de nueces.
3	Daño severo	Clorosis y necrosis combinada, defoliación en un 75%.
4	Muerte	95% hojas caídas y necróticas, tronco flácido.

MM Roca, 2008.

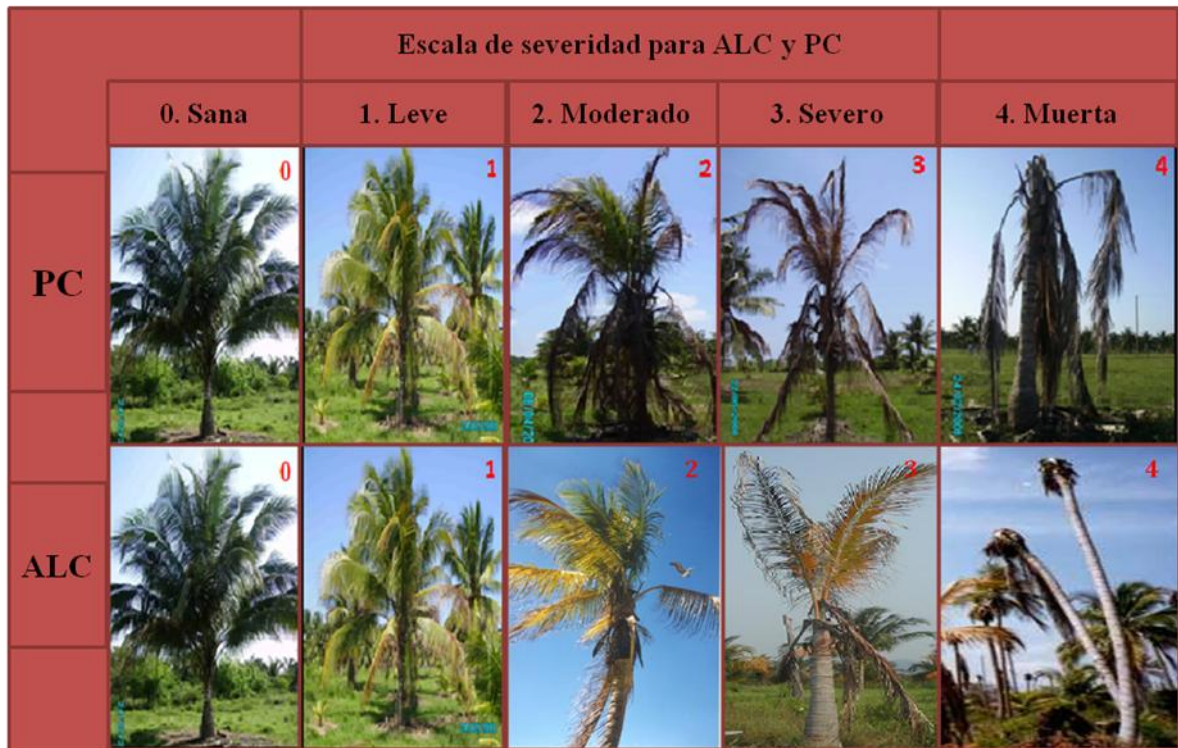


Figura 2. Escala de severidad para PC y ALC

II. Metodología de muestreo

Toma de muestra para PC

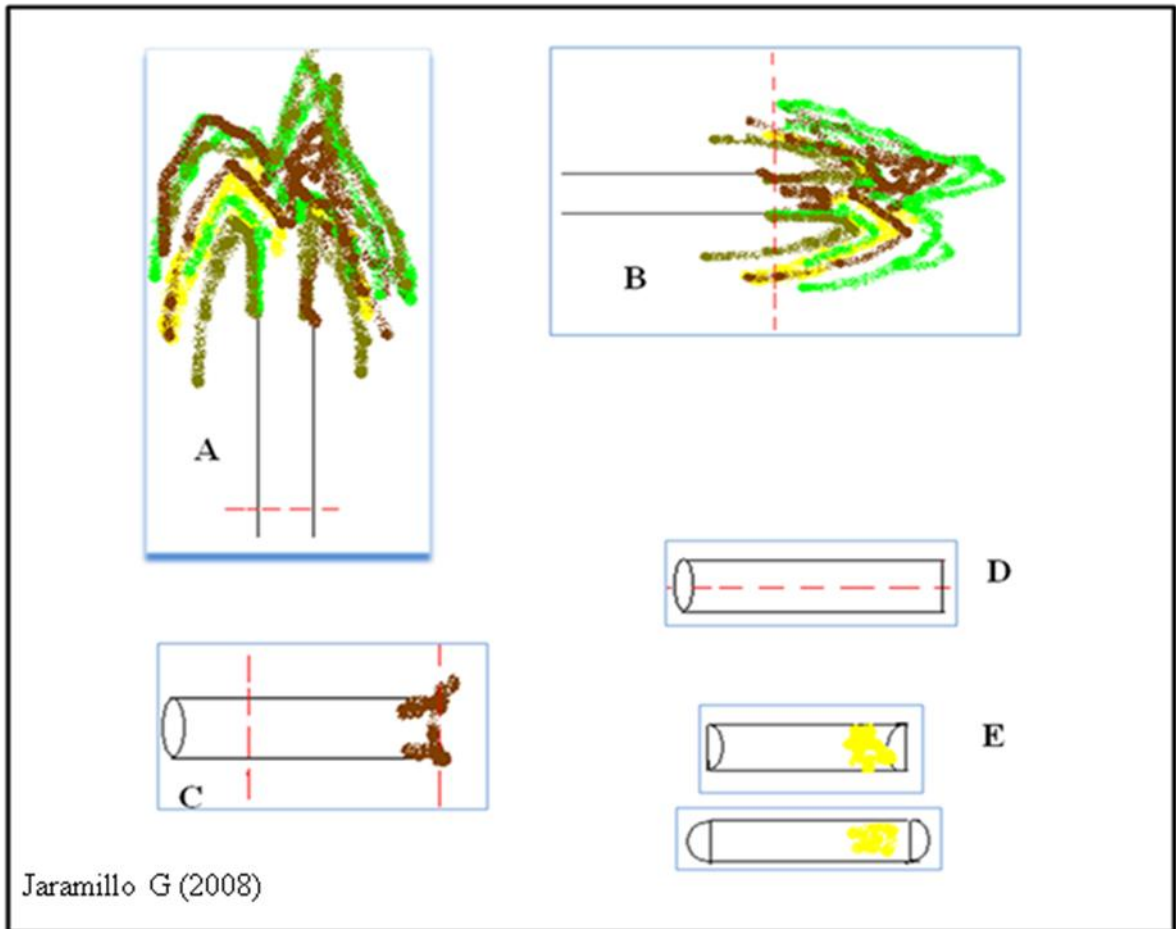


Figura 3. Método de toma de muestras para PC, A. Primer corte, B. Se talan las hojas, C. Corte transversal a la altura del meristema apical, D. Corte longitudinal para exponer el tejido con pudrición, E. Tejido donde se obtiene la muestra.

III. Selección del tejido infectado, pruebas bioquímicas y pruebas de patogenicidad

Se desarrolló un sistema para caracterizar:

- El tejido adecuado para la toma de muestras para aislar bacterias patógenas y evitar saprófitos
- Las colonias aisladas de acuerdo a su morfología y color
- Las bacterias de cada aislamiento de acuerdo a sus reacciones bioquímicas y pruebas de patogenicidad

Para la toma de muestras de cocotero con síntomas de PC, se procedió al corte de cada una de las palmas enfermas. Posteriormente se hizo un corte longitudinal para exponer el tejido degradado debido a las enzimas pectolíticas del sistema apical.

Selección del tejido infectado

La toma de la muestra se hizo en el área del meristema apical (palmito) en la interfase, tejido necrótico, tejido con pudrición líquida y olor fétido (Figura 4).

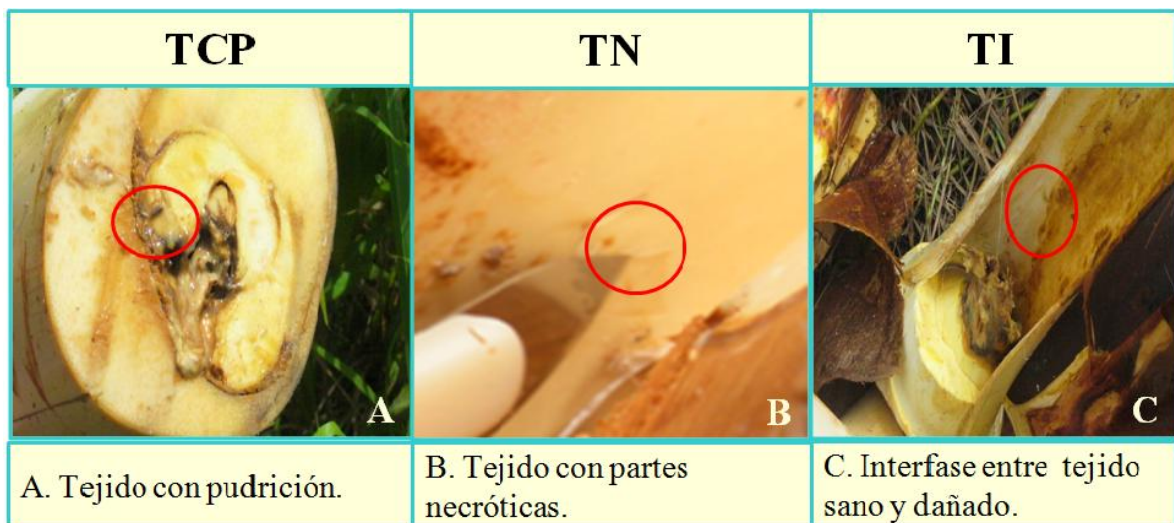


Figura 4. Tejido del meristema apical utilizado para el aislamiento del posible agente causal de la PC, A. tejidos con pudrición líquida y olor fétido (TCP); B. tejidos con partes necróticas (TN); C. interfase entre tejido sano y necrótico (TI).

Aislamiento de bacterias y pruebas bioquímicas

En el campo, se inocularon segmentos de diferentes tejidos de la planta (tejido de interfase, tejido necrótico, tejido con pudrición) en frascos con medio AN, utilizando la mejor técnica aséptica posible (todos los instrumentos utilizados como bisturís o jeringas eran estériles y desechables). En el laboratorio, con el objetivo de obtener aislamientos puros a partir del crecimiento en AN, se prepararon suspensiones de bacterias a una concentración de 0.5 standard de McFarland (medida de turbidez de las suspensiones). Estas suspensiones se subcultivaron por duplicado nuevamente en medio AN. Un tercer subcultivo fue realizado, seleccionando una colonia, que fue luego inoculada en AN mediante el método de rayado Frobisher.

Se seleccionaron 24 aislamientos puros que se sometieron a análisis bioquímicos que incluyeron:

- tinción de Gram.
- crecimiento anaeróbico y aeróbico en medio oxidación/fermentación (OF).
- prueba de oxidasa.
- producción de pigmento en medio Yeast extract-dextrose-calcium carbonate (YDC).
- pruebas rápida para *Ralstonia* (tiras inmunológicas).

Para la caracterización de bacterias, se siguió la Clave de Identificación de Bacterias de Schaad (Schaad 2001) (Figura 5).

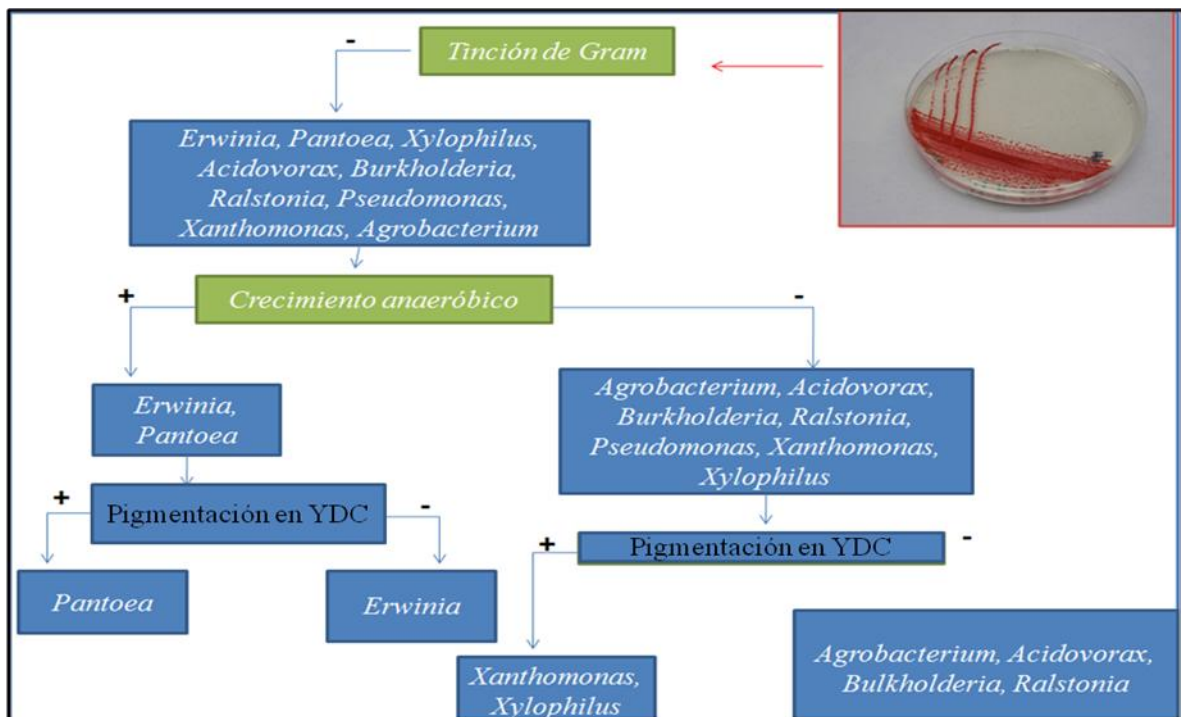


Figura 5. Esquema para identificación de bacterias fitopatógenas (Shaad *et al.* 2001).

Pruebas inmunológicas

Se utilizaron pruebas rápidas con tiras inmunológicas con un anticuerpo monoclonal específico a *Ralstonia* de la compañía Agdia®.

Pruebas de patogenicidad

Se estableció una metodología que permitiera realizar pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch) en un modelo de planta (crisantemos) fáciles de manejar en la casa malla de Zamorano.

De los 24 aislamientos sometidos a las pruebas bioquímicas se seleccionaron 10 aislamientos representativos utilizando los siguientes criterios de selección:

- Los resultados de las pruebas bioquímicas (Cuadro 7)
- Los aislamientos que presentaron un color crema brillante ya que son características clásicas asociadas con el género *Erwinia* y que coinciden con bacterias aisladas en 2007 de cocoteros con síntomas clásicos de PC. A estos aislamientos se los denominó “Bacteria Crema Tipo *Erwinia*” (BCTE).
- Aislamientos de color rojo intenso, denominado “Bacteria Roja” (BR), aislados consistentemente de tejido con pudrición líquida y olor fétido. Esta bacteria tiene un crecimiento muy agresivo comparado con otras bacterias.
- Aislamiento proveniente de la palma aceitera, para establecer si el mismo tipo de bacterias que produce síntomas en palma aceitera, afecta cocotero.

Los aislamientos seleccionados fueron: CS1-16-BCTE, CS1-17-BB1, F121-BC, F122-BCTE, L323C-BR, L325B-BR, L326A-BR, L330A-BN, L331-BB1, C1PA34-BB2.

De cada aislamiento se preparó una suspensión y se inoculó por triplicado en plantas de crisantemo. Los testigos fueron inoculados con agua destilada estéril. Se inocularon un total de 33 plantas (10 × 3 más el testigo). Las inoculaciones se llevaron a cabo en la casa malla de la unidad de Fitopatología de Zamorano. No se usaron plantas de cocoteros porque no se adaptan muy bien a las condiciones de Zamorano.

A partir de las plantas que mostraron una reacción de hipersensibilidad se realizaron aislamientos utilizando tejido de interfase (sano y enfermo) de las hojas inoculadas, para confirmar el tercer Postulado de Koch (reaislar el patógeno inoculado) y confirmar la patogenicidad de los aislamientos inoculados.

IV. Establecimiento de pruebas moleculares (PCR) para el diagnóstico de *Erwinia* sp.

Extracción de ADN para PCR para bacterias. La extracción de ADN se hizo por el método de Ausubel *et al.* (1990). Las células bacterianas (1.5 ml de cultivo) se precipitaron a 5000 rpm durante 2 minutos empleando una microcentrífuga. Las bacterias precipitadas se lisaron por incubación (1 h a 37°C) con proteínas K y SDA (Sodio duodecil sulfato), a concentraciones de 100 µg/ml y 0.5%, respectivamente. Se agregaron 100 µl de Na CL 5 M y seguidamente 80 µl de solución CTAB/NaCL Hexadeciltrimetil bromuro de etidio (CTAB). Luego de la incubación por 10 min a 65 °C, los complejos CTAB/proteínas/polisacáridos se removieron con igual volumen (0.8 ml) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Las muestras se centrifugaron a 14000 r.p.m durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga para precipitar el ADN con 0.6 vol de isopropanol frío. El ADN precipitado se lavó con etanol (70%). Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado resultante se secó, se resuspendió a 100 µl de amortiguador TE (Tris-EDTA), se cuantificó y las soluciones de trabajo se prepararon a una concentración de 50 ng/µl.

Amplificación de ADN por PCR

Para la amplificación de ADN por PCR se usaron tres set de primers para *Erwinia amylovora*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

Cuadro 2. Primers utilizados para la reacción PCR.

Primers	Tamaño banda (bp)	Secuencia	Referencia
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	420	ADE1 5'-GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT-3' ADE2 5'-CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC-3'	Nassar <i>et al.</i> 1996.
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Atroseptica</i>	389	Erwfor 5'-ACGCATGAAATCGGCCATGC-3' Atrorev 5'-ATCGATAATTTGATTGTCCT-3'	Smid <i>et al.</i> 1995
<i>Erwinia amylovora</i>	900	Eamy 1 5'-CGGTTTTTAACGCTGGG3' Eamy 2 5'-GGGCAAATACTCGGATT-3'	Bereswill <i>et al.</i> 1992

Cuadro 3. Composición del Master mix para la reacción del PCR.

Patógeno	Volumen Reacción	DNTPs (mM)	Primers	Buffer ^{&} Gotaq® Flexi	MgCL2 (mM)	Polimerasa Gotaq® (U)
<i>Erwinia Chrysanthemi</i>	25	0.2	1µM	1X	1.5	1.5
<i>Erwinia amylovora</i>	50	0.2	25pmol	1X	1.5	0.5
<i>Erwinia carotovora</i> Subsp. <i>atroseptica</i>	50	0.2	20µM	1X	1.5	1.5

[&]Promega, USA

Gel de electroforesis

Todos los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa (Agarose LE Analytical Grade PROMEGA) al 1 % en un tanque de electroforesis (FBSB 2025 Fisher Scientific), a 85 voltios por una hora. Luego las geles se tiñeron por 10 minutos en bromuro de etídio al 10%, se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Caracterización del tejido muestreado

Se escogieron tres tipos de tejido infectado del meristemo apical de palmas con síntomas clásicos de PC para la toma de muestras (Figura 6): tejido de interfase (TI) donde se observa tejido sano y enfermo, tejido con pudrición líquida y olor fétido (TCP) (las enzimas pectolíticas de la bacteria han degradado completamente el tejido el cual tiene mal olor), tejido necrótico (TN) (manchas irregulares).





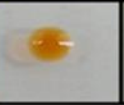
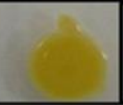
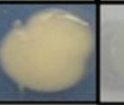


Sitio	Abreviación	Tipo de tejido					
		Tejido de la interfase		Tejido con pudrición		Tejido necrótico	
Cuero Salado Lean FHIA Ciriboya	CS						
	L F C	TI		TCP		TN	
Tipo de bacteria		BR	BN	BA	BCTE	BB1	BB2
Morfología de aislamiento							

Figura 6. Sistema de nomenclatura de tipo de bacterias aisladas de diferentes tejidos

II. Caracterización de bacterias

Se aislaron colonias con varios pigmentos y características y se les asignó una nomenclatura correspondiente (Cuadro 4 y Figura 7).

Cuadro 4. Características morfológicas de las bacterias.

Sitio	Aislamiento	Abreviación	Características morfológicas de las bacterias					
			Forma	Borde	Elevación	Textura	Reflejo de luz	Color
Cuero Salado FHIA, Lean Ciriboya	Bacteria crema 1 tipo <i>Erwinia</i>	BCTE	Circular	Entero	Convexa	Suave	Brillante	Crema
Lean	Bacteria Roja	BR	Circular	Entero	Convexa	Suave	Brillante	Roja
Cuero Salado Lean, y Ciriboya	Bacteria blanca 1	BB1	Circular	Entero	Convexa	Suave	Brillante	Blanca
Cuero Salado	Bacteria blanca 2	BB2	Irregular	Lobular	Plana	Rugosa	Opaca	Blanca
Lean	Bacteria Naranja	BN	Circular	Entero	Convexa	Suave	Brillante	Naranja
Lean	Bacteria amarilla	BA	Circular	Entero	Convexa	Suave	Brillante	Amarilla

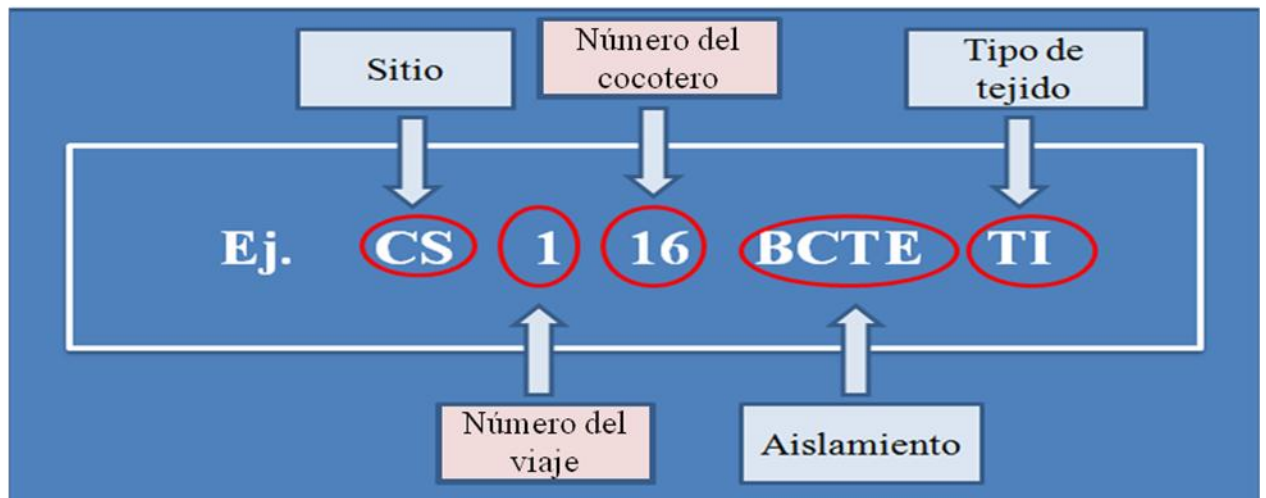


Figura 7. Sistema de nomenclatura de los aislamientos

Luego de haber caracterizado el tipo de bacterias (ej. Bacterias crema tipo *Erwinia*, Bacteria roja) se prosiguió a la caracterización de los aislamientos con relación a sus orígenes, síntomas, y tipo de tejido (Cuadro 5).

Cuadro 5. Caracterización de los aislamientos

Número	Sitio	Aislamiento	Síntomas (Severidad)	Tipo de Tejido
1	Cuero Salado	CS1-16-BCTE	PC2	€ TI
2	Cuero Salado	CS1-17-BB1	PC2	TI
3	Cuero Salado	CS1-18-BCTE	PC3	TI
4	Cuero Salado	CS1-19 BCTE	PC2	TI
5	Cuero Salado	CS1-20-BCTE	PC2	TI
6	FHIA	F1-21-BCTE	ALC	TI
7	FHIA	F1-22-BCTE	ALC	TI
8	Lean	L3-23A-BCTE	PC2	§ TCP
9	Lean	L3-23B-BN	PC2	TCP
10	Lean	L3-23C-BR	PC2	TCP
11	Lean	L3-24-BC	ALC	TCP
12	Lean	L3-25B-BR	PC4	TCP
13	Lean	L3-26A-BR	PC2	TCP
14	Lean	L3-26B-BCTE	PC2	TCP
15	Lean	L3-27-BCTE	PC2	¥ TN
16	Lean	L3-28-BCTE	PC2	TCP
17	Lean	L3-29A-BCTE	PC3	TCP
18	Lean	L3-29B-BA	PC3	TCP
19	Lean	PA3-30A-BN	PC2	TCP
20	Lean	PA-30B-BC	PC2	TCP
21	FHIA	F3-31-BB1	PC	TCP
22	Ciriboya	CI-32-BB1	PC3	TCP
23	Ciriboya	CI-33-BB1	PC3	TCP
24	Ciriboya	CI-34-BB2	PC2	TN

€ TI: Área del meristemo interfase.

§ TCP: Tejido con pudrición y mal olor.

¥ TN: Tejido necrótico.

II. Análisis bioquímico

De los 24 aislamientos analizados, se encontraron 19 aislamientos con características similares al género *Erwnia*. Tres de estos 19 aislamientos fueron del tipo “Bacteria Roja”. También se encontraron cinco aislamientos con características del “Grupo de Bacterias Aeróbicas” (GBA) que incluyen los siguientes géneros:

- *Agrobacterium*
- *Acidovorax*
- *Bolkhoderia*
- *Ralstonia*

Se descartó el género *Agrobacterium* ya que la literatura no reporta el cocotero como hospedero. También se descartó *Ralstonia*, ya que las pruebas inmunológicas fueron negativas (Figura 8) para los aislamientos analizados. No se descarta la posibilidad de que *Acidovorax* o *Bulkhoderia* sean patogénicas al cocotero, aunque esto es poco probable.

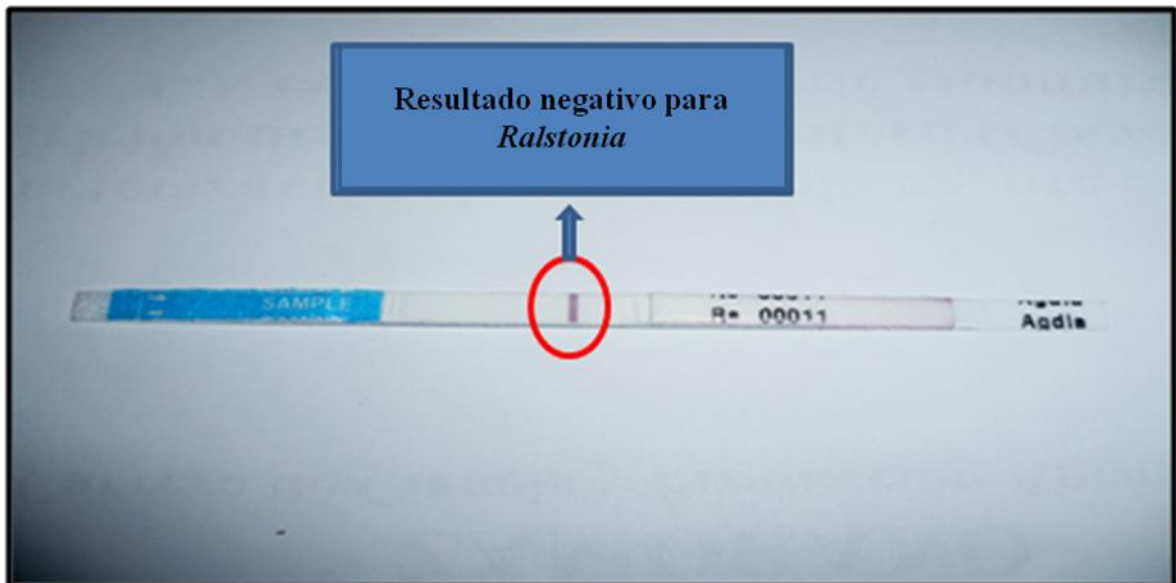


Figura 8. Pruebas rápidas (tiras inmunológicas para *Ralstonia* sp)

IV. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)

Se utilizaron diez aislamientos que comprendieron los siguientes grupos de bacterias caracterizadas en el estudio:

- BCTE
- BR
- BB1
- BB2
- BN
- BA

De los diez aislamientos utilizados (Cuadro 6) sólo dos grupos de bacterias mostraron una reacción de hipersensibilidad en las plantas inoculadas: BCTE y BR.

La bacteria roja (BR) se caracteriza por producir una reacción de hipersensibilidad en 24 horas, mientras que la bacteria crema tipo *Erwinia* (BCTE) tardó aproximadamente una semana en presentar síntomas.

Una vez que se describieron los síntomas en las plantas inoculadas, se hicieron los reaislamientos de los patógenos que causaron necrosis en los crisantemos, obteniéndose las bacterias con las mismas características de las que fueron inoculadas (Figura 8).

Cuadro 6. Pruebas de patogenicidad en hojas inoculadas

Muestra/ aislamiento	Tipo de tejido	Aislamiento	Plantas de crisantemos		
			1	2	3
CSI-16	TI	BCTE	£+++	€++	++
CSI-17	TI	BB1	&-	-	-
F1-21	TI	BCTE	-	-	-
F1-22	TI	BCTE	-	-	-
L3-23C	TCP	BR	+++	+++	+++
L3-25B	TCP	BR	+++	++	++
L3-26A	TCP	BR	+++	+++	+++
L3-30A	TCP	BN	-	-	-
L3-31	TCP	BB1	-	-	-
C1-PA34	TCP	BB2	-	-	-
Testigo			-	-	-

£+++ : Severa La reacción de hipersensibilidad se presentó en cada una de las hojas inoculadas

€++ : Moderada La reacción de hipersensibilidad se presentó en algunas de las hojas inoculadas.

&- : Sin síntomas

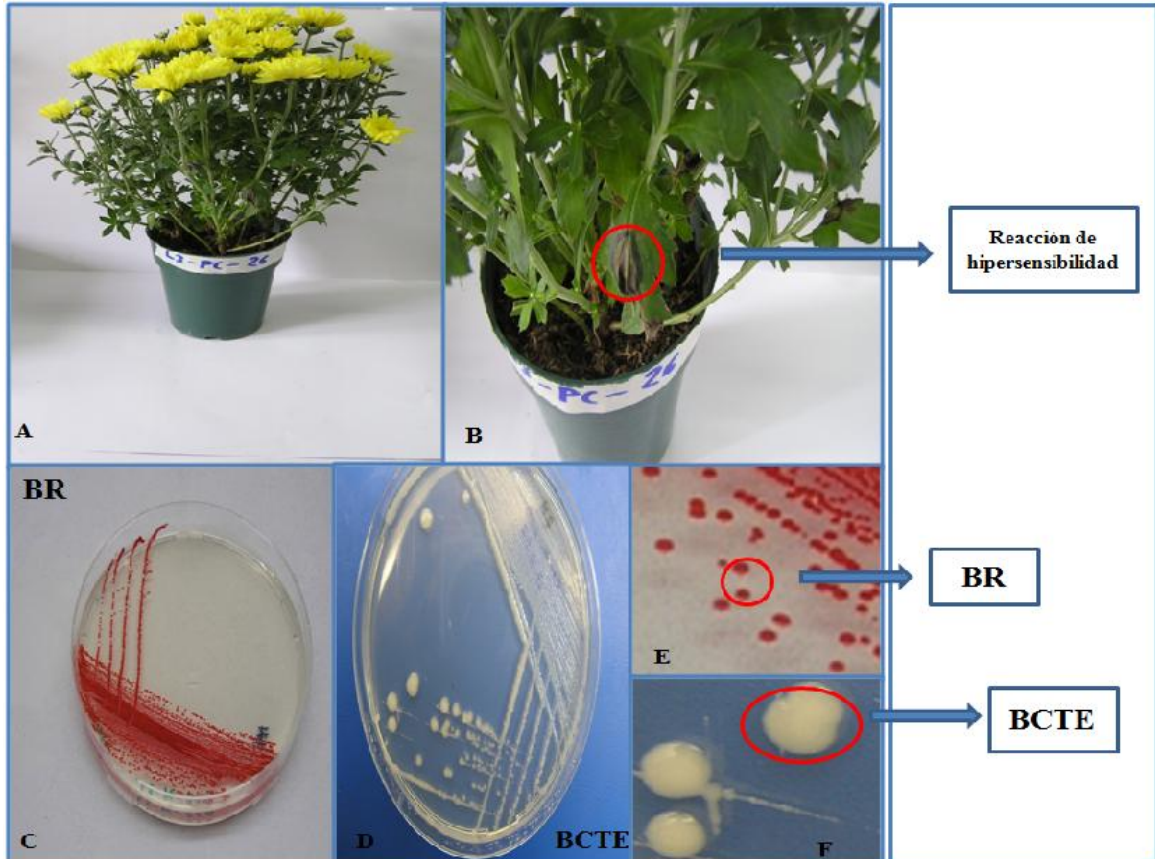


Figura 9. Pruebas de patogenicidad en crisantemos. A: planta inoculada con aislamiento puro de la BR, B: hoja con síntomas de hipersensibilidad, C: BR aislada apartir de hoja inoculada, D: BCTE aislada apartir de hoja inoculada, E: características morfológicas de la BR, F: características morfológicas de la BCTE.

IV. Pruebas moleculares (PCR)

No se amplificó ninguna banda de ADN de las colonias extraídas con los diferentes primers usados para identificación de especies de *Erwinia*, indicando posiblemente la presencia de otra especie del género *Erwinia*.

Cuadro 7. Análisis bioquímicos, pruebas de patogenicidad y pruebas moleculares (PCR) de aislamientos de bacterias seleccionadas.

Aislamiento	Tipo de tejido	Aislamiento bacteriano	Análisis bioquímico						Pruebas de Patogenicidad crisantemos	PCR	Posible etiología del aislamiento
			Gram	Crecimiento	Crecimiento	Oxidasa	Bioensayo	YDC			
				Anaeróbico	Aeróbico		en papa				
CS1-16	TI	BCTE	-	-	+	+	-	-	+	-	GBA
CS1-17	TI	BB1	-	-	+	+	-	-	-	-	GBA
CS1-18	TI	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
CS1-19	TI	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
CS1-20	TI	BCTE	-	-	+	+	-	-	-	-	GBA
F1-21	TI	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
F1-22	TI	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-23 ^a	TCP	BCTE	-	-	+	+	-	-	-	-	GBA
L3-23B	TCP	BN	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-23C	TCP	BR	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-24	TCP	BCTE	-	-	+	+	-	-	-	-	GBA
L3-25B	TCP	BR	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-26 ^a	TCP	BR	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-26B	TCP	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-27	TN	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-28	TCP	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-29 ^a	TCP	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-29B	TCP	BA	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
PA-30 ^a	TCP	BN	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
PA-30B	TCP	BCTE	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
L3-31	TCP	BB1	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
CI-32	TCP	BB1	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
CI-33	TCP	BB1	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.
CI-PA-34	TN	BB2	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Erwinia</i> sp.

+: Positivo

-: Negativo

GBA: Grupo de bacterias aeróbicas (*Agrobacterium*, *Bulkhoderia*, *Acidovorax*, *Ralstonia*)

CONCLUSIONES

- Este estudio contribuyó a entender mejor la etiología de uno de los posibles agentes causales de la enfermedad en cocotero en Honduras.
- Se desarrolló un sistema para realizar pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch) en Zamorano que permitió establecer que dos bacterias con potencial patogénico (BCTE y BR) pueden provocar una reacción de hipersensibilidad en plantas de crisantemos.
- A través de análisis bioquímicos y pruebas de patogenicidad se pudieron aislar bacterias del género *Erwinia* en palmas con síntomas de PC. La bacteria roja no ha sido reportada en la literatura y no se conocen bacterias patogénicas con esta coloración.
- Estos aislamientos de bacterias (BCTE y BR) son candidatos importantes para ser inoculadas en palmas de cocotero sanas para establecer la etiología del agente causal del PC.

RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas de patogenicidad inoculando las bacterias BR y BCTE en palmas de cocotero sanas (preferiblemente en la costa norte donde las condiciones para el desarrollo del cocotero son óptimas).
- Continuar con la caracterización de las bacterias BR y BCTE enviándolas al laboratorio del CABI en Inglaterra. Ya que es uno de los mejores laboratorios dedicados a proporcionar información científica en el campo agrícola y ambiental.
- Para agilizar un diagnóstico rápido y confiable de una posible *Erwinia*, causante de la PC, se recomienda establecer una prueba molecular para PCR. Las FTA® Cards (que consisten en papel filtro impregnado con buffer que protege el ADN) (Anexo 1) donde se impregna directamente el ADN de una muestra de planta enferma, para ser procesada por PCR.
- Estudiar la posible relación entre la pudrición de cogollo observada en palma de aceite y en palma de coco, realizando el mismo estudio con aislamiento de palma de aceite con síntomas de PC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology University of Florida, United States. 35p.
- Ausebel, F; Brent, R; Kinkston, R; Moore, D. 1990. Short protocols in molecular biology. 5ta, ed. Wiley, United States. 387p.
- Berewill S, Burget P, Bruchmuller I, Geider K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. Appl Environ Microbial. 61:2636-2642.
- Chávez F. 1986. Enfermedades de Palma Africana en Ecuador y su combate. Santo Domingo, Ecuador. 19 p.
- Franqueville H. 2001. La Pudrición del Cogollo de la palma aceitera en América Latina, revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. CIRAD. 35 p.
- Jaramillo Echenique, 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. Tesis Lic. Ing. Agr. Honduras, Universidad Zamorano. 33p.
- Kelemu A, Collmer A. 1993. *Erwinia chrysanthemi* EC16 Produces a Second Set of Plant Inducible Pectate Lyase Isozymes. Appl. Environ Microbiol. 59: 1756-1761.
- Nassar, A, A. Darrasse, M. Lemattre, A. Kotoujansky, C. Dervin, R. Vedel, Y. Bertheau. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified fragments of *pel* genes. Appl. Environ. Microbiol.62:2228-2235.
- Ploetz R, Harrison N y Jones J. 1999. Diseases of coconut palm (*Cocos nucifera* L.). (en línea). Consultado 10 de mayo de 2008. Disponible en: <http://www.aspnet.org/online/common/names/coconut.asp>
- Rivera Vega, L. 2007. Identificación y caracterización de hongos y bacterias asociadas con la pudrición de cogollo en cocotero(*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras. 26p.
- Roca M M. Castillo M. Harrison N. y Oropeza C. 2006. First report of 16SrIV group of phytoplasma associated with declining coyol palms in Honduras. Plant Disease 90:526-533.
- Roca M M. 2007. Reporte de Progreso de Proyecto TCP/hon 3002 FAO Honduras. 41p.
- Roca MM. 2008. Progress Report for the CFC- Funded Project "Sustainable Coconut Production Through Control, of Coconut Lethal Yellowing". Kingston, Jamaica, February, 2008.
- Shaad, N; Jones, J; Chum, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3 ed. St. Paul, Minnesota. 373p.

Singh, U., Trevors, C. M., De Boer, S. H., and Janse, J.D. 2000. Fimbral-specific monoclonal antibody-based ELISA for European potato strains of *Erwinia Chrysanthemi* and comparison to PCR. *Plant Dis.* 84: 443 – 448.

Smid, E. J., A. H. J. Jansen, and L.G.M. Gorris. 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subs. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathol* 44:1058-1069.

Yung L, Cheng Y. 2004. A differential medium for the isolation and rapid identification of plant soft rot pathogen, *Erwinia Chrysanthemi*. *Journal of Microbiological Methods.* 64:200-206.

ANEXOS

1. FTA® Cards

Las FTA Cards consiste en un papel filtro que le permite al investigador recolectar el ADN de una muestra de una manera fácil sin tener que tener a disposición una amplia gama de herramientas de laboratorio. Una de las grandes ventajas de las FTA Cards es la conservación del ADN listo para su procesamiento en el PCR (Polimerase Chain Reaction), evitando de esta manera hacer toda la bacteriología clásica.

Durante el desarrollo de este estudio no se pudo emplear esta tecnología por razones de tiempo y logística.



Muestra de tejido de palmas infectadas (que poseen el ADN del agente causal) son impregnadas directamente al papel filtro.

2. Postulados de Koch

1. Debe haber una asociación constante entre el organismo y el hospedero enfermo.



2. Se debe aislar el patógeno sospechoso del hospedero enfermo y obtenerlo en cultivo puro.



3. Se debe inocular un hospedero sano con el cultivo puro del organismo sospechoso y reproducir los síntomas típicos de la enfermedad.



4. Se debe reaislar el patógeno en cultivo puro a partir del hospedero inoculado y enfermo y sus características deben ser exactamente iguales a las observadas en el cultivo.

