

**Detección del Amarillamiento Letal del
Cocotero en híbridos resistentes en la
plantación de Salado Lis lis (Atlántida,
Honduras), comparando sistemas de
detección del fitoplasma en dos tipos de tejido
y con tres "primers" para PCR.**

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

Por:

Andrés Felipe García Zapata

Zamorano, Honduras

Abril, 2002

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

Andrés Felipe García Zapata

Zamorano, Honduras
Abril, 2002

Detección del Amarillamiento Letal del Cocotero en híbridos resistentes en la plantación de Salado Lis lis (Atlántida, Honduras), comparando sistemas de detección del fitoplasma en dos tipos de tejido y con tres "primers" para PCR.

Presentado por:

Andrés Felipe García Zapata

Aprobada por:

Maria Mercedes Doyle, Ph. D.
Asesor Principal

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador de Area Temática

Mario Bustamante, MSc.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A
Coordinador de la Carrera de
Ciencia y Producción

Odilo Duarte, Ph. D.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D
Decano Académico

Pablo Paz, Ph. D
Coordinador PIA fitotecnia

Keith Andrews, Ph. D
Director General

DEDICATORIA

A mi madre, Celina, la culpable de mis éxitos.

A mi familia, la esencia de mi carácter y el apoyo incondicional de mis decisiones

A mi *Alma Mater* por cambiar mi vida con sus enseñanzas.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Celina y a mis hermanos Carolina y Juan Esteban por ser el motivo de cada hora, cada página y cada noche dedicada a este trabajo.

A mi familia por sus oraciones y apoyo.

A mis asesores, M. M. Doyle, M. Bustamante y O. Duarte por sus oportunos consejos, por su tiempo y por tomarse la libertad de orientar este trabajo con tanta entrega.

Al gran equipo del laboratorio de diagnóstico molecular, C. Sabio, E. Aguilar, M. Castillo, E. Bermeo por su amistad y ayuda desinteresada.

A C. Rivas por su amor honesto, desinteresado; por amarme y permitirme amarle.

A mis compañeros y colegas por brindarme su apoyo en los buenos momentos y sobretodo en los malos.

A mis colegas Colombianos, C. Barrera, A. Muñoz, J. Espinoza, M. Londoño, S. Oramas, R. Mejía por compartir estos cuatro años algo conmigo más que el hecho de nacer en el mismo lugar.

A todos mis amigos (as), por su apoyo, su lealtad, consejos y momentos gratos durante estos años. No me atrevo a mencionar ninguno, al hacerlo sé que pasare por alto otros. Les agradezco de todo corazón cada uno de ustedes, amigos míos, por estar hay siempre así llueva o haga sol, así caigan las hojas o salgan las flores, así llore de felicidad o de tristeza.

A mis profesores por sentar las bases académicas sobre las que se construyó este trabajo.

A las familias Rojas, Restrepo y Agudelo por haberme hecho sentir como en casa.

A C. Molina por el apoyo recibido.

A los miembros de la red "Wafaluma" por su apoyo logístico y técnico.

RESUMEN

García, A. 2002. Detección del Amarillamiento Letal del Cocotero en híbridos resistentes en la plantación de Salado Lis lis (Atlántida, Honduras), comparando sistemas de detección del fitoplasma en dos tipos de tejido y con tres "primers" para PCR. Proyecto especial del programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 86 p.

Honduras es el foco de infección de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Centroamérica. Antes de que llegara la enfermedad se producían cerca de 29 millones de nueces en un área de 6,000 ha que generaba 30 millones de lempiras anuales. En la actualidad la producción, que estaba en manos de pequeños productores, ha declinado en 80-90%. El ALC ataca más de 30 especies de palmáceas, es causado por un fitoplasma y transmitido por el homóptero, *Myndus crudus*. Los objetivos fueron continuar con las evaluaciones de la causa de la alta mortalidad de las variedades resistentes a la enfermedad del ALC, en la plantación del Salado Lis lis (SLL) y en otras regiones afectadas por la enfermedad; y optimizar la detección del ADN del fitoplasma utilizando dos tipos de tejido: inflorescencia y tronco y tres "primers". Aparte de SLL se tomaron muestras en otras áreas afectadas por el ALC en Atlántida (Salado Barra, CADESCA y Triunfo de la Cruz) y Colón (San Antonio y Cusuna). Se hicieron seis muestreos y se tomaron 85 muestras de tronco y 57 de inflorescencia. En el laboratorio se hicieron dos tipos de extracción de ADN: una gran escala (5 g) y otra mini extracción (0.5 g); se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar la presencia del ADN del agente causal, usando tres "primers": el universal para los fitoplasmas (P1/P7), el específico para el fitoplasma causante del ALC (LYR1/LYF1) y el grupo específico ("nested" PCR). Se midió el porcentaje de muestras positivas, la evolución de la severidad y las concentraciones de ADN total. Se encontró mayor concentración de ADN total en las muestras de inflorescencia y cuando se extrajo a gran escala. Se obtuvieron más muestras positivas usando P1/P7 y LYF1/LYR1 con tejido de inflorescencia que con el tronco. Usando "nested" PCR se obtuvo mayor porcentaje de detección debido a que "nested" PCR es más sensible. Las plantas PCR positivas con "nested" PCR no presentaron síntomas y las PCR negativas estaban muriendo, esto indica que aunque el fitoplasma estaba presente, las plantas no estaban muriendo de ALC. Se recomienda continuar con las evaluaciones de las muestras de este trabajo y de otros híbridos replantados en Honduras. Para obtener mejores resultados se recomienda usar los tres "primers" y varios tipos de tejido de la misma planta.

Palabras claves: *Cocos nucifera*, PCR, severidad, variedades resistentes.

NOTA DE PRENSA

LOS HÍBRIDOS MAPAN: UNA BUENA OPCION PARA LUCCHAR CONTRA LA TERRIBLE ENFERMEDAD DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCO(ALC).

Actualmente Honduras es el foco de infección del ALC en Centroamérica. Desde que la enfermedad llegó en 1995 ha matado cerca del 70 % de los cocoteros en la costa norte. Esta enfermedad causada por un fitoplasma, es transmitida por una chicharrita (*Myndus crudus*) y mata las palmas en un periodo 3-6 meses después del primer síntoma. Para manejar la enfermedad se han importado variedades e híbridos resistentes.

Uno de los híbridos más importantes por su resistencia al ALC y su productividad, es el híbrido Mapan proveniente de Costa Rica. Al principio se creía que la alta mortalidad de estos híbridos registrada en una de las fincas productoras era debido al ALC, poniendo en duda no sólo su resistencia, sino el éxito de los programas de rehabilitación del cocotero en la costa hondureña.

Según las evaluaciones realizadas la muerte de los híbridos Mapan no es causa del ALC. El estudio realizado en la costa norte reveló que gran parte de las plantas tenían el agente causal de la enfermedad sin embargo no era la causa principal de la mortalidad.

La investigación fue realizada en la finca de Salado Lis-lis propiedad de la Estándar Fruit Company y en el laboratorio de diagnóstico molecular del Zamorano utilizando muestras de flor y tronco y tres pruebas moleculares (PCR) de laboratorio.

Se encontró que el híbrido Mapan contienen cantidades del fitoplasma a concentraciones pequeñas que no afectan el normal funcionamiento de las plantas.

Para el manejo del ALC se recomienda seguir con el programa de replantación masiva con variedades resistentes en Honduras, ya que ha sido la mejor solución hasta el momento. También se recomienda seguir con la investigación en otros vectores de la enfermedad, la variabilidad genética del patógeno y con las evaluaciones de las variedades resistentes en Honduras.

Licda. Sobeyda Álvarez

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen	vi
Nota de prensa.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xii
Índice de anexos.....	xiii
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 HONDURAS: SITUACION ACTUAL	1
1.2 SALADO LIS LIS.....	2
1.3 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD.....	4
1.4 ACCIONES INTERINSTITUCIONALES	6
1.5 OBJETIVOS.....	7
1.5.1 General	7
1.5.2 Específicos.....	7
2 REVISION DE LITERATURA.....	8
2.1 GENERALIDADES DEL COCOTERO	8
2.2 USOS DEL COCO.....	9
2.3 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC).....	9
2.3.1 Agente causal	9
2.3.2 Distribución del fitoplasma en la palma de coco:	10
2.3.3 Vector	10
2.3.4 Síntomas	11
2.3.5 Métodos de manejo para el ALC.....	14
2.3.6 Materiales	15
2.4 RESISTENCIA, TOLERANCIA Y SUSCEPTIBILIDAD.....	19
2.4.1 Resistencia verdadera.....	19
2.4.2 Resistencia aparente	20
2.4.3 Resistencia del cocotero al ALC	20
2.5 IMPACTO SOCIOECONOMICO Y AMBIENTAL	20
2.5.1 Programa de rehabilitación del cocotero en Honduras.....	22
2.5.2 Programas de replantación.....	22
2.6 ANTECEDENTES DE LA FINCA SALADO LIS LIS.....	24
2.7 DIAGNOSTICO.....	25
2.7.1 Toma de muestras.....	26
2.8 Procesamiento de muestras	26
2.8.1 Extracción.....	27
2.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	27

2.8.3	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP's)	28
2.8.4	Electroforesis horizontal	28
3	MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1	UBICACION.....	30
3.2	MUESTREO Y RECOLECCION.....	31
3.2.1	Nomenclatura de las muestras.....	31
3.3	EVALUACION DE INCIDENCIA Y SEVERIDAD Y ESTADO GENERAL DE LA PLANTACION EN CAMPO	31
3.4	METODOLOGIA DE MUESTREO PARA ANALISIS MOLECULAR.....	32
3.5	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	34
3.5.1	Extracción de ADN	34
3.5.2	Cuantificación de ADN.....	34
3.5.3	PCR	34
3.5.4	-Electroforesis horizontal	36
3.6	EVALUACION DE LA MORTALIDAD DE LAS PLANTAS YA MUESTREADAS	37
4	RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
4.1	PRIMER MUESTREO (28 DE ENERO DE 2001).....	38
4.1.1	Observaciones de campo.....	38
4.1.2	Resultados de laboratorio.....	39
4.2	SEGUNDO MUESTREO (MAYO DE 2001).....	42
4.2.1	Observaciones de campo.....	42
4.2.2	Salado Barra	43
4.2.3	Resultados de laboratorio.....	43
4.3	TERCER MUESTREO (JUNIO DE 2001).....	44
4.3.1	Observaciones de campo (Salado Lis lis)	44
4.3.2	Resultados de laboratorio.....	45
4.4	CUARTO MUESTREO (AGOSTO DE 2001).....	45
4.4.1	Observaciones de campo.....	45
4.4.2	Resultados de laboratorio.....	46
4.4.3	La Ensenada	46
4.5	QUINTO MUESTREO (DICIEMBRE DE 2001)	47
4.5.1	Observaciones de campo (Salado Lis lis)	47
4.5.2	Resultados de laboratorio.....	48
4.6	SEXTO MUESTREO (FEBRERO DE 2002).....	49
4.6.1	Observaciones de campo (Salado Lis lis)	49
4.6.2	Resultados de laboratorio.....	50
4.7	CONCENTRACIONES	52
4.8	EVALUACION DE LAS PLANTAS MUESTREADAS ANTERIORMENTE EN SALADO LIS LIS	52
4.9	RESUMEN DE RESULTADOS.....	54
5	CONCLUSIONES.....	56
6	RECOMENDACIONES	57
7	BIBLIOGRAFIA.....	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Dispersión e incidencia Actual del ALC en la costa norte hondureña.....	2
Cuadro 2: Especies de palmas susceptibles al Amarillamiento Letal del Cocotero.....	5
Cuadro 3: Sintomatología de las principales enfermedades del cocotero.....	13
Cuadro 4: Escala de desarrollo de los síntomas en la palma de coco (Mackoy,).....	14
Cuadro 5: Variedades de cocotero	16
Cuadro 6: Análisis comparativo de las variedades existentes en Honduras.	17
Cuadro 7: Comparación de variedades de cocotero del tipo alto.....	18
Cuadro 8: Tipificación de los productores de cocotero en la costa caribe de Honduras antes del ALC.....	21
Cuadro 9: Cantidad de híbridos Mapan resebrados, supervivencia y producción global en la finca SII.....	25
Cuadro 10: Fertilización de los híbridos Mapan en la plantación de Salado lis- lis.	25
Cuadro 11: Iniciadores universales, grupo específicos y específicos para la detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.	36
Cuadro 12: Hoja para el evaluación del avance de los síntomas de ALC.....	37
Cuadro 13: Resultados de laboratorio del primer muestreo realizado en la finca de Salado Lis lis. Jutiapa, Atlántida. Enero 28 de 2001.	41
Cuadro 14: Resultados obtenidos en una misma muestra tomada en dos épocas	42
Cuadro 15: Resultados del segundo muestreo en Salado lis- lis y Salado barra, con tres iniciadores y cuatro tejidos. Mayo de 2001.....	44
Cuadro 16: Resultados del tercer muestreo en Salado Lis lis. Jutiapa, Honduras. Junio de 2001	45
Cuadro 17: Resultados del cuarto muestreo en la finca el Salado Lis lis. Agosto de 2001.	46
Cuadro 18: Resultados del quinto muestreo en la finca del Salado Lis lis y en Cadecsa. Diciembre de 2001.	49
Cuadro 19: resultados del sexto muestreo en la plantación de Salado Lis lis. Febrero de 2002	50

Cuadro 20: Resumen de las muestras tomadas durante todo el estudio en Salado Lis lis. Jutiapa, 2002.....	55
Cuadro 21: Porcentaje de muestras positivas con los tres "primers" a través de los muestreos en salado Lis lis.....	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del ALC en Honduras.....	3
Figura 2. Estado de la plantación de Salado Lis lis.....	4
Figura 3. Síntomas característicos del ALC.....	12
Figura 4. Variedades de cocotero y sus diferencias	18
Figura 5. Programa de rehabilitación del cocotero en la bahía de Tela Prolansate/Zamorano y Programa de replantación Caritas.	23
Figura 6. Sitios de muestreo del estudio.	30
Figura /. Tipos de tejido para muestreo de cocotero.....	33
Figura 8. Pasos y equipo necesarios para la extracción de ADN total de tejido de coco usados en el laboratorio de diagnóstico molecular del Zamorano.....	35
Figura 9: Estado de los híbridos Mapan en Salado Lis lis.....	39
Figura 10. Gel de agarosa al 1% de electroforesis mostrando la amplificación por PCR de los tres "primers"	40
Figura 11. Gel al 1% de electroforesis mostrando los resultados de la amplificación por PCR usando nested PCR.....	40
Figura 12. Palmas con síntomas diferentes al ALC clásico.....	48
Figura 13. Otras causas de la alta mortalidad en Salado Lis lis.....	51
Figura 14: Muestras tomadas en anteriores viajes.....	53

INDICE DE ANEXOS

8	ANEXOS.....	62
8.1	Anexo 1 .Protocolos para la extracción de ADN	62
8.1.1	Protocolo para la extracción a gran escala	63
8.1.2	Buffer TAE 50X.....	63
8.2	Anexo 2. Protocolos para Reacción en Cadena de la Polimerasa	64
8.2.1	Programas para el termociclador.....	65
8.2.2	Iniciadores universales P1 y P7, programas en Fort Lauderdale	65
8.3	Anexo 3. Protocolos para la reamplificación (nPCR) de productos de P1/P7, usando los iniciadores grupo específicos LY16s y LY16s/23sr.	66
8.3.1	Mezcla para la reamplificación de producto de PCR.....	66
8.3.2	Programa del termociclador para la reamplificación	66
8.3.3	Rehidratación de las PCR beads.....	66
8.4	Anexo 4. Cuadro de salida del programa Minitab® para la comparación de concentraciones.	67
8.5	Anexo 5. Registro de las muestras evaluadas.	67
8.6	Anexo 6. Detalle de las muestras tomadas.	71
8.7	Anexo 7. Salida del programa estadístico SAS®.....	79
8.8	Anexo 8. Resumen de los resultados por muestreo.....	83

1 INTRODUCCION

1.1 HONDURAS: SITUACION ACTUAL.

Honduras se presenta como el foco de infección de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Centroamérica. Esta enfermedad se reportó inicialmente a finales de 1995 en la isla de Roatán y posteriormente en tierra firme (1996) . Actualmente la enfermedad está en casi toda la costa caribe hondureña, incluyendo Roatán; está presente en los límites entre el departamento Colón y el de Gracias a Dios por el este y hasta Guatemala por el oeste (Comunicación personal¹) (Figura 1). Se estima que la enfermedad ha avanzado a una tasa aproximada de 12 km por año en Honduras (Doyle *et al.*, 2001). La mayoría de la costa hondureña ha sido afectada por la enfermedad, algunas comunidades están libres y otras esta moderada o fuertemente afectadas (Cuadro 1).

Honduras producía, antes de la enfermedad del ALC, cerca de 29 millones de nueces en un área aproximada de 6,000 ha, que generaba 30 millones de lempiras anuales. En la actualidad la producción ha declinado en un 80-90% y el precio por nuez se ha incrementado 10-15 veces (Ardón *et. al.*, 2001).

El cocotero era el eje para diversificación de los ingresos en las comunidades de la costa norte hondureña, especialmente para los grupos más vulnerables como las madres viudas o solteras, cabezas de familia. El turismo también depende, en parte de la presencia del cocotero, aportando a la belleza escénica de las playas, estabilización de los sitios de recreación y el desarrollo de industrias relacionadas (venta de golosinas, agua de coco, aceite bronceador y comidas típicas basadas en coco). Ambientalmente, el cocotero hace parte del ecosistema de las playas, crea un microclima fresco, retiene los arenales y sirve como barrera rompevientos (Ardón *et. al.*, 2001).

¹ Lazo, N. 2001. Distribución del ALC en Honduras. La Ceiba, Honduras. DICTA. (Entrevista)

Cuadro 1: Dispersión e incidencia Actual del ALC en la costa norte hondureña.

I. (20 comunidades)	II (9 comunidades)	III. (4 comunidades)	IV. (54 comunidades)
No presencia de ALC. 0% de incidencia	Amenazadas, en los límites del avance 0% de incidencia	Moderadamente afectadas. De 10-20% de incidencia	Fuertemente afectadas. De 70-100% de incidencia
Gracias a Dios: Brus Laguna, Kauquira, Ushbila, Pramnitara, Patuca, Uhi, Ibantiwan, Yululabia, Tusidaksa, Pakwi, Puerto Lempira, Barra de Plátano, Tusicocal, Benk, Ratlaya, Krata, Pusawaia, Raya.	Gracias a Dios: Ibans Nueva Jerusalén, Belén, Betalia, Kuri, Buena Vista, Pueblo Nuevo, Plaplaya, Coco Vila	Colón: San Isidro de Tocamacho, San Pedro de Tocamacho, Punta Piedra, Cabo Camarón.	Atlántida: Tornabé, La Ensenada, Tulián, San Juan, Miami, Rosita, Corozal, Zambo Creek, Nueva Armenia, San Antonio, Perú, El porvenir, Nueva Go, Cayo Venado, Barranco Blanco. Islas de la Bahía: Guanaja, Roatan, Utila. Colón: Ciriboya, Piedra Pintada, Cocalito, Sangrelaya, Iriona, Puerto, San José, Iriona Viejo, Falla, Limón, Santa Rosa de Aguan, Balfate, Río Esteban, Saragayna, Río Tinto, Cayos Cochinos. Cortés: Masca, Pueblo Nuevo, Cortes, Brisas de Chamalecón, Barra del Chamalecón, Bajamar, Puerto Cortes, Cieneguita, Cuyamel, Tegucigalpa, Travesía, Omoa.

Fuente: Ardón *et. al.* (2001).

1.2 SALADO LIS LIS

En 1993 la Standard Fruit Co. previendo la llegada de la enfermedad, realizó una importación de híbridos Mapan de Costa Rica, que fueron plantados en la Finca del Salado Lis lis, en Jutiapa, Atlántida. En 1998 el huracán Mitch causó que las plantas estuvieran sometidas a un exceso de agua durante aproximadamente seis meses. Posteriormente los híbridos presentaron un alto porcentaje de mortalidad que alertó a los encargados de los principales programas de replantación en Honduras sobre la conveniencia de seguir o no importando los híbridos de Costa Rica ya que, la alta mortalidad se la atribuían al ALC. No hay evidencias que afirmen que la resistencia de los híbridos Mapan (Maypan) se vea afectada por condiciones fisiológicas pobres, aunque por sí solas las condiciones abióticas adversas pueden causar necrosis de las inflorescencias, amarillamiento de las hojas e infertilidad.

En 1999 después del Mitch se registraron alta mortalidad en los híbridos Mapan, preocupando a la compañía. R. Illinworth (Hacienda Victoria, Costa Rica) envió unas muestras a la Universidad de la Florida para ser analizadas por N. Harrison con resultados inconclusos, por ser muestras de follaje. A principios de 2000 El Zamorano organizó una

evaluación preliminar con el apoyo de M. Dollet (CIRAD, Francia) para establecer las causas de la alta mortalidad. Se sospechaba de ALC y otras enfermedades de sintomatología parecida como pudrición del cogollo, "Hartrot" (causado por un tripanosoma conocido como fitomonas) y anillo rojo (comunicación personal²). En la plantación había una incidencia de 50 % de palmas muertas y con síntomas avanzados de amarillamientos (Figura 2). En esta visita se evaluaron enfermedades como Hartrot, anillo rojo, y ALC. Se concluyó que la causa más evidente de la muerte de los híbridos eran factores abióticos especialmente exceso de agua (Dollet, 2000). Harrison (2000) encontró 19 % de muestras positivas en tejido de floema de tronco en esta plantación, llegando a las mismas conclusiones de Dollet (2000), de que el porcentaje de ALC estaba dentro de los límites permisibles.

El presente estudio es una evaluación que incorpora elementos que no se habían tomado en cuenta en los estudios anteriores. 1. se han tomado un mayor número de muestras de plantas sintomáticas; 2. se están comparando dos tipos de tejido (inflorescencia y floema de tronco) y 3. se está haciendo una evaluación a través del tiempo

Dollet (2000) recomendó hacer evaluaciones de las plantaciones en donde están estos híbridos, con la respectiva identificación de todos los síntomas relacionados por un espacio de 3-5 años.

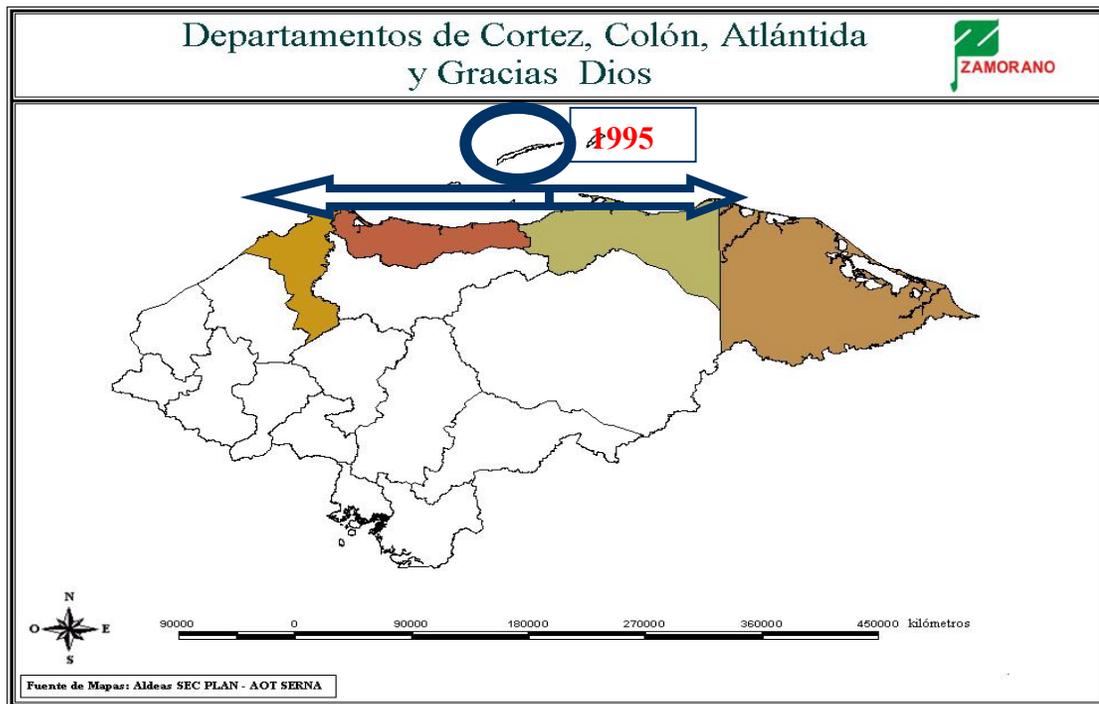


Figura 1: Distribución del ALC en Honduras.

² Doyle, M. 2002. Primeras evaluaciones de la mortalidad de los híbridos Mapan en Honduras. Zamorano, Honduras. Zamorano. (Entrevista)



Figura 2: Estado de la plantación de Salado Lis lis. Fuente: M. M. Doyle.

1.3 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

Esta enfermedad ataca unas 30 especies de palmas, entre ellas el cocotero y otras palmas ornamentales de gran importancia (Cuadro 2). La planta muere 6-9 meses después de haber adquirido la enfermedad. La enfermedad se ha reportado desde el siglo XIX, pero despertó el interés internacional cuando fue la causa de una terrible epidemia en Jamaica, en donde murieron aproximadamente 8 millones de palmeras desde 1965 hasta el día de hoy. La enfermedad también ha sido reportada en Cuba, Haití, las islas del Gran Caimán, República Dominicana, Bahamas y La Florida. En el año 1979 llegó a México por la península de Yucatán y fue reportada en Belice en 1993 (Doyle, 2001). En Centroamérica se ha reportado en Guatemala (Doyle, sin publicar) pero no se ha reportado en Nicaragua, Costa Rica ni El Salvador.

Cuadro 2: Especies de palmas reportadas como susceptibles al Amarillamiento Letal del Cocotero

Especie	Especie
<i>Aiphanes lindeniana</i> (H. Wendland)	<i>Neodypsis decaryi</i> Jumelle
<i>Allagoptera arenaria</i> (Gomes) O. Kuntze, P. Costera	<i>Phoenix canariensis</i> Hort. ex Chabaud
<i>Arenga engleri</i> Beccari	<i>Phoenix dactylifera</i> L., Datil
<i>Borassus flabellifer</i> L., P. Palmira	<i>Phoenix reclinata</i> Jacquin
<i>Caryota mitis</i> Loureiro, P. Cola de pescado	<i>Phoenix rupicola</i>
<i>Caryota rumphiana</i> Martius	<i>Phoenix sylvestris</i> (L.) Roxburgh
<i>Chelyocarpus chuco</i> (Martius) H. E. Moore	<i>Pritchardia affinis</i> Beccari
<i>Chrysalidocarpus cabadae</i> H. E. Moore, P. Cabada	<i>Pritchardia pacifica</i> Seeman & Wendland
<i>Cocos nucifera</i> L., Cocotero	<i>Pritchardia thurstonii</i> F. J. Mueller
<i>Corypha elata</i> Roxburgh, P. Talipot	<i>Pritchardia remota</i> Beccari
<i>Dictyosperma album</i> (Bory) H. Wendland & Drude ex Scheffer, P. Huracán	<i>Ravenea hildebrandtii</i> H. Wendland ex Bouche
<i>Gaussia attenuata</i> (O. F. Cook) Beccari, P. Puerto Rico	<i>Syagrus schizophylla</i> (Martius)
<i>Howea belmoreana</i> (C. Moore & F. J. Mueller) Beccari, P. Belmore	<i>Trachycarpus fortunei</i> (Hooker) H. Wendland
<i>Hyophorbe verschaffeltii</i> H. Wendland, P. Huso	<i>Veitchia arecina</i> Beccari
<i>Latania spp.</i> , P. Lantan.	<i>Veitchia merrillii</i> (Beccari) H. E. Moore
<i>Livistona chinensis</i> (Jacquin) R. Br. ex Martius, P. Abanico chino	<i>Veitchia mcdanielsi</i> H. E. Moore, P. Sun shine
<i>Livistona rotundifolia</i>	<i>Veitchia montgomeryana</i> H. E. Moore, P. Montgomery
<i>Nannorrhops ritchiana</i> (W. Griffith) J. E. T. Aitch. P. Mazari	<i>Roystonea regia</i> (H.B.K) O.F. Cook, P. Real

Fuente: Howard y Harrison (1999), OIRSA (2000)

Las variedades de coco más susceptibles a ésta enfermedad son las altas, del grupo Alto del Atlántico (AA), llamado también Criollo o Indio. En Honduras ha destruido cerca del 90 % de la población total de cocoteros. De continuar la epidemia en algunos años estará presente en los demás países de Centro América antes de llegar a Suramérica. Las enfermedades letales no están confinadas a las Américas, existen también otros agentes infecciosos cercanamente relacionados con el ALC en África y Asia (Doyle, 2001).

Además del ALC existen otras enfermedades de sintomatología parecida como la marchitez súbita (causado por un hongo), el hartrot (causado por fitomonas) y el anillo rojo (causado por un nematodo), además de factores abióticos como salinidad, exceso o falta de agua; razón por lo que un diagnóstico visual no es apropiado para detectar la enfermedad.

Jamaica ha tenido un programa de replantación exitoso con híbridos Alto del Pacífico (AP) * Malayo Enano (ME) desde los años 70's cuando ocurrió una gran epidemia (Been, 1995). Sin embargo, Harries (2000) y Doyle (2002) ponen en duda este éxito en vista del reciente brote de ALC en Jamaica, que ha afectado a variedades del Enano Malayo y a los híbridos resistentes. Esto ha traído una serie de inquietudes, como:

- ¿Existe una nueva cepa más virulenta del patógeno?
- ¿Existen otros vectores diferentes al *Myndus crudus*?
- ¿Existen factores ambientales que estén contribuyendo al problema?
- ¿Qué pueden hacer las instituciones y productores involucrados en los programas de rehabilitación?
- ¿Cuál debe ser la orientación de un programa para dar soluciones al problema.

1.4 ACCIONES INTERINSTITUCIONALES

Siendo este un problema nacional, que se está convirtiendo en regional y que afecta otros países dentro de la cuenca del Caribe, cualquier esfuerzo individual sería infructuoso. En junio de 1999 se agruparon varias instituciones y organismos para formar una red de colaboración bajo el nombre de Red nacional del coco "Wafaluma" (en Garífuna, "Salvemos el Coco"). A esta red pertenecen instituciones de investigación como: El Zamorano y FHIA; DICTA (gobierno); ONG's como: CARITAS, PROLANSTATE, ODECO y la empresa privada Standard Fruit Company (SFC.). Todos han trabajado en equipo para desarrollar un programa coherente para la rehabilitación del cocotero en la costa norte hondureña (Doyle, 2001). Además existe una red de información y cooperación sobre ALC a la cual pertenecen investigadores y organizaciones relacionadas de Europa, Estados Unidos, Asia, África y América Latina. La sede está en Mérida, México (Centro Investigación y Científico del Yucatán, CICY) y opera bajo el nombre de CICY (Center for Information on Lethal Yelwing") (Doyle, 2001).

Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo del proyecto USAID/Zamorano y Cosude, a los integrantes de la "Red Wafaluma", al equipo ALC del Zamorano y a la Standard Fruit Company (SFC). Sin ellos no hubiera sido posible el cumplimiento de los objetivos, primero por el alto costo de los viajes de muestreo, los reactivos de laboratorio y el personal de apoyo; segundo por la distancia entre El Zamorano y la costa norte, el difícil acceso a los sitios de muestreo y el transporte de las herramientas para el muestreo.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 General

Comparar dos tipos de tejido inicial y tres "primers" para la detección de fitoplasmas para la evaluación de los híbridos Mapan resistentes al ALC en Atlántida, Honduras.

1.5.2 Específicos

- Continuar con las evaluaciones de las causas de la alta mortalidad de las variedades resistentes a la enfermedad del ALC, en la plantación del Salado Lis-Lis y en otras regiones afectadas y evaluar las causas de esas mortalidades.
- Optimizar el proceso de toma de muestras para diagnóstico molecular del ALC, utilizando dos tipos de tejido: inflorescencia inmadura y floema de tronco.
- Estudiar los métodos de detección del fitoplasma utilizando 3 "primers", uno específico para el fitoplasma causante del ALC, otro universal para los fitoplasmas y un último que es la reamplificación del "primer" universal.

2 REVISION DE LITERATURA.

El cocotero (*Cocos nucifera*) es una planta de gran importancia a escala mundial. Su importancia se sustenta en el hecho de que crece en áreas en donde otras plantas no pueden hacerlo y por la gran cantidad de usos de todas sus partes.

La enfermedad del ALC ha causado grandes daños en las áreas en donde el cocotero es cultivado o crece de manera silvestre. En estas áreas generalmente es parte del sustento de millones de familias. En Honduras las comunidades costeras, los garifunas, basan su dieta y gran parte de su economía en el coco (Ardon *et al*, 2001).

2.1 GENERALIDADES DEL COCOTERO

Familia: Arecaceae (Palmae)

Nombre común: Cocotero

Nombre científico: *Cocos nucifera* L.

Lugar de origen: Nativa de las Islas del Pacífico, pero hoy en día es hallada a través de los trópicos húmedos, desde la costa hasta las colinas en cultivo y de manera silvestre (Harries, 2000)

Etimología: *Cocos*, proviene del portugués *coco* = máscara. *Nucifera*, del latín *nucifer-a-um* = que emite nueces (Sánchez de Lorenzo, 1998).

Descripción: Palmera monoica de tronco único, con frecuencia inclinado, de 10-20 m. de altura y de hasta 50 cm de grueso en la base, estrechándose hacia la parte superior. Anillos espaciados irregularmente y fisuras verticales. Hojas pinnadas, de 1.5-4 m de longitud, con folíolos coriáceos de 50-70 cm de longitud, de color verde-amarillento. Inflorescencia que nace de las axilas de las hojas inferiores, cubierta al principio por una espata de hasta 70 cm de longitud. Fruto cubierto de fibras, de 20-30 cm de longitud, ovoide, con la pulpa comestible (Sánchez de Lorenzo, 1998).

El mayor productor y exportador a escala mundial es Indonesia seguido por las Filipinas e India; en Latinoamérica los mayores productores son México y Brasil (Oropeza, 2001).

El cocotero puede crecer en suelos salinos y arenosos donde muy pocos cultivos pueden hacerlo (Urbina, 1997.).

2.2 USOS DEL COCO

El cocotero es considerado el árbol de la vida por sus múltiples usos; se pueden extraer productos desde sus raíces hasta sus frutos, este último es el principal producto del cocotero (Oropeza, 2001). Los principales usos del cocotero, parte por parte, son:

Madera: Ranghage (2001) aconseja talar los cocoterios de más de 50 años y de baja productividad, para aprovechar su madera para muebles decorativos, mangos de herramientas, postes eléctricos, combustibles y construcción en general.

Corazón: se puede vender como palmito de alta calidad para ensaladas (Harries, 2000; Oropeza, 2001).

Agua: la cantidad de electrolitos del agua de coco es equivalente a la de la sangre, este producto tiene un gran mercado como bebida deportiva (FAO, 2001).

Aceite: lubricante, combustible, glicerina (Harries, 2000), jabones, champú, cosméticos y plastificantes (Urbina, 1997; Harries, 2000).

Otros usos: medio de crecimiento y relleno de asientos (mesocarpio); carbón activado y artesanías (endocarpio); alimentos balanceados (endoespermo) y la fabricación de sombreros y techos (hojas) (Oropeza, 2001).

En Honduras el cocotero es usado como ingrediente en muchas comidas diarias de los habitantes de la costa norte y para materiales de construcción (Caritas, 2000).

2.3 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)

El ALC es una enfermedad que infecta y mata al cocotero y a una amplia gama de palmas. Probablemente la enfermedad se reportó por primera vez en el oeste del Caribe en el siglo XIX (Harrison y Howard, 1999). En Honduras se reportó la enfermedad en 1995 en la isla de Roatán; fue confirmado durante la visita del Dr. Roger Ashburner en diciembre de 1995. Las plantas sospechosas fueron analizadas en el laboratorio de la Universidad de la Florida con resultados positivos para ALC (Alvarado, s.f.).

2.3.1 Agente causal

El agente causal del ALC es un fitoplasma, organismos más relacionados filogenéticamente con otros mollicotes que con una bacteria con pared celular (Seemüller *et. al.*, 1998, Castaño-Zapata, 1994). Los fitoplasmas son los procariotes autoreplicables más pequeños que se conocen hasta ahora y su genoma varía en tamaño de 500 a 1180 Kilobases (Kb), carecen de los genes para reparar su ADN, producir paredes celulares y

algunos aminoácidos. Se han podido diferenciar cerca de 75 fitoplasmas que son caracterizados como mollicotes fitopatógenos (Seemüller *et al.*, 1995, Agrios 1995). Según Howard y Harrison (1999) los fitoplasmas se conocían como Organismos Similares a Micoplasmas (OSM), debido a que comparten muchas características con los micoplasmas, que son un grupo de protozoarios cultivables que causan enfermedades en animales; la primera similitud es que son de igual tamaño o un poco más grandes que un virus; la segunda es que no presentan pared celular, lo que los hace inmunes a las penicilinas y la tercera es que son susceptibles a las tetraciclinas. Además los fitoplasmas son parásitos obligados del floema de sus hospederos y de la hemolinfa de sus vectores (Agrios,1995).

El rango de hospederos de los fitoplasmas depende de la interacción de las plantas con los insectos vectores (Seemüller *et al.*, 1995). Existen cerca de 35 especies que son hospederos alternos del ALC (Cuadro 2).

2.3.2 Distribución del fitoplasma en la palma de coco:

Córdova Lara (2000) demostró que el fitoplasma del ALC esta prácticamente distribuido en todos los órganos de la palma, aún cuando ésta todavía no manifiesta los síntomas iniciales de la enfermedad. Los porcentajes más altos de detección (100%) del fitoplasma se obtuvieron en los tejidos del tronco, las hojas inmaduras, las inflorescencias, el ápice de las raíces y el ápice del tallo (en severidades 1, 2 y 3 de acuerdo al sistema de R. McCoy) y los más bajos en las hojas intermedias, y las raíces sin ápice. El fitoplasma no se detectó en las hojas maduras ni aún cuando se utilizó "nested" PCR. El fitoplasma se moviliza siguiendo la dirección del flujo del contenido del floema, es decir desde los sitios de producción como las hojas maduras e intermedias (donde ocurriría la adquisición) hacia los sitios de consumo como serían hojas inmaduras, frutos, ápice del tallo y ápices de las raíces.(Córdova Lara, 2000). Sin embargo, el fitoplasma no esta uniformemente distribuido en la planta de cocotero y por esto resulta mejor tomar muestras de varios tejidos o en su defecto tomar muestras de varias partes de un mismo tejido (Comunicación personal³).

2.3.3 Vector

Myndus crudus Van Duzee es el vector confirmado por un sólo estudio en Florida, pero no necesariamente el único, de la enfermedad del ALC en palmas de coco (*Cocos nucifera*), palmas de Manila (*Veitchia meriili*) y *P.thurstonii* (Howard et al, 1983). Según Howard (1995), el *Myndus crudus* Van Duzee parece ser el principal vector del ALC en Florida. Este insecto se desarrolla en las raíces de las gramíneas en su estado larval y de adulto vive en especies arborescentes presentando un comportamiento inusual dentro de

³ Oropeza, C. 2001. Distribución del fitoplasma del ALC en la planta de coco. La Ceiba, Honduras. CICY (Entrevista)

su orden (Howard, 1995). *M. crudus* parece estar exclusivamente asociado a plantas monocotiledóneas (Howard, 1995).

Actualmente se cree que existen otros vectores aparte del *M. crudus* que no se conocen todavía (Mariau, *et al.* s.f.). En Honduras se encontró otra especie de *Myndus* (*M. simplicatus*) asociado con las palmas de cocotero; por esta razón se debería considerar como uno de los candidatos para vector alternativo del ALC (Comunicación personal⁴).

El conocimiento acerca del vector es muy rudimentario en áreas diferentes a la Florida. Se debería seguir el modelo de investigación de la Florida en los demás países de América que tienen la enfermedad (Howard, 1995). El trabajo con vectores es difícil y lleva varios años para tener resultados concluyentes; las principales limitantes que se han tenido en Florida son: el tamaño de las plantas para el ensayo, el tiempo de incubación del patógeno de 114-450 días que implica que el experimento toma más de un año y la gran cantidad de insectos necesarios para obtener resultados confiables (Howard, 1995). La investigación relacionada con las especies hospedadoras y su relación con *M. crudus* daría las bases para el manejo de este vector en plantaciones; seleccionando plantas herbáceas que son deseables como cobertura y probando su relación con el insecto vector (Howard, 1995).

2.3.4 Síntomas

Los síntomas del ALC tienen un orden que va desde la caída de los cocoteros de todos los tamaños hasta la muerte de la planta, estos síntomas pueden durar de tres a seis meses (Howard y Harrison, 1999) (Figura 3)

⁴ Doyle, M. 2001. Estudio sobre posibles vectores del ALC en Honduras. El Zamorano, Honduras. El Zamorano. (Entrevista)

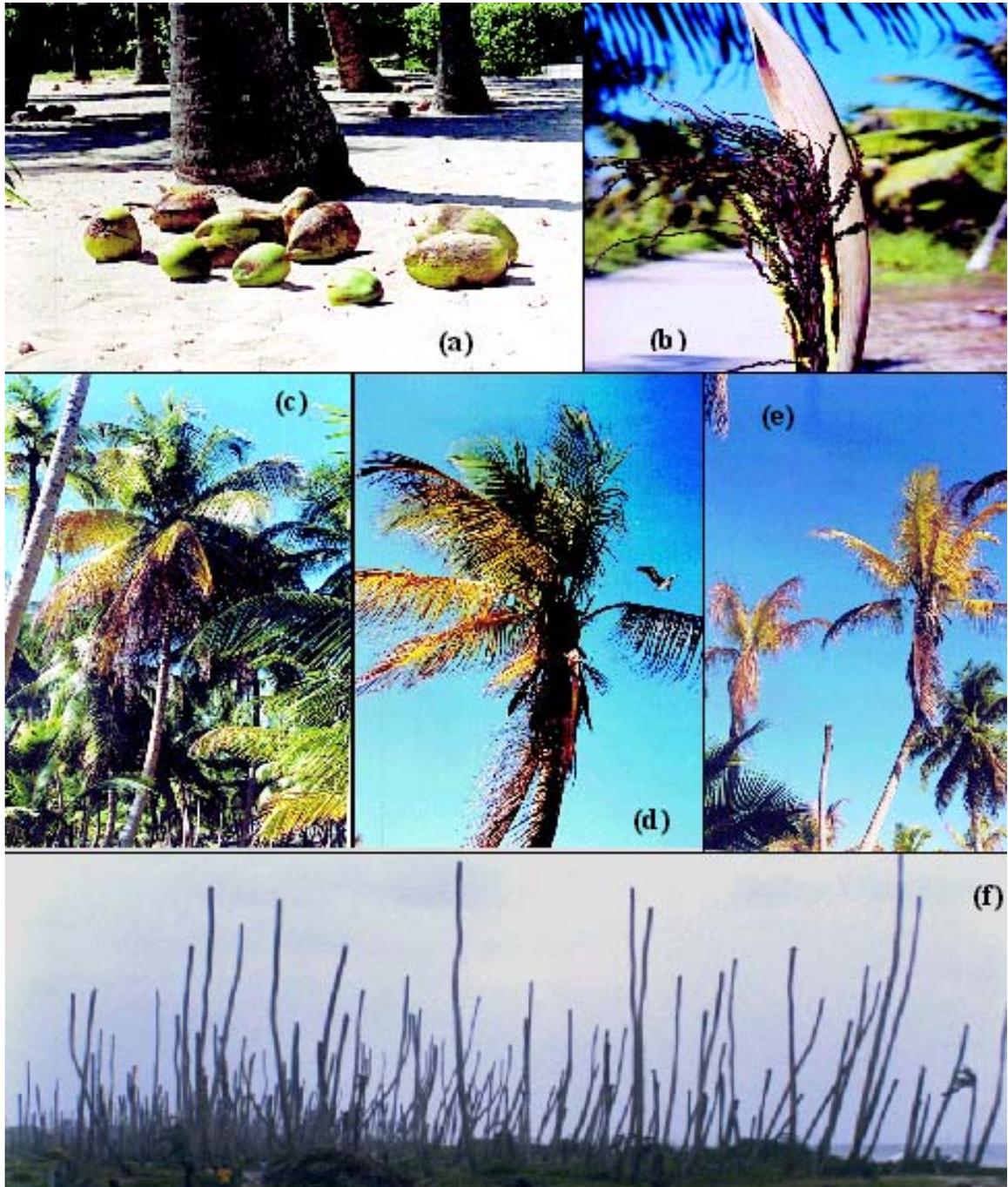


Figura 3: Síntomas característicos del ALC: a) Caída de cocos de todos los tamaños; b) Necrosis de las inflorescencias; c), d) y e) Amarillamiento foliar ascendente; f) Muerte de la planta (poste telefónico). Fuente: M. M. Doyle.

Se ha determinado que en plantas estresadas por factores abióticos (sequía, salinidad, inundación), el factor principal que regula el cierre de los estomas es el ácido abscísico (ABA) (Martínez Aguirre, 2000). Cuando el fitoplasma que causa el ALC está presente es posible que esté presente el ABA y promueva el cierre los estomas. Cuando se cierran los estomas la planta no puede intercambiar gases ni nutrientes con el medio externo. La interferencia que ocasionen los patógenos sobre el intercambio de agua y de nutrientes o sobre el movimiento de los metabolitos ocasionará síntomas de la enfermedad (por deficiencia) de las partes de la planta que carezcan de estos nutrientes (Agrios, 1995)

Algunas enfermedades del cocotero se pueden confundir entre sí por que presentan síntomas muy parecidos, ya que todas se caracterizan por un amarillamiento de las hojas. Todas estas enfermedades requieren diferentes medidas de control y por lo tanto es necesario diagnosticarlas por métodos confiables que permitan un manejo eficiente de cada una de ellas (Cuadro 3).

Según Arellano y Oropeza (1995), Eden-Green y Mackoy desarrollaron un sistema de clasificación de síntomas que es el más usado actualmente para evaluar la severidad con base en el patrón de aparición de síntomas, esta escala se puede apreciar en el Cuadro 4.

Cuadro 3: Sintomatología de las principales enfermedades del cocotero

ANILLO ROJO (<i>Rhadinaphelenchus cocophilus</i>)	PUDRICIÓN DEL COGOLLO (<i>Phytophthora</i> spp)	HARTROT (<i>Phytomonas</i>)	FACTORES ABIOTICOS	ALC
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Caída de frutos. ▪ Oscurecimiento de las inflorescencias. ▪ Tono amarillo y castaño en las hojas. ▪ Caída de hojas. ▪ Muerte del cogollo. ▪ Un anillo rojo en corte transversal del tallo. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clorosis y marchitez de la hoja bandera. ▪ Las hojas que no se han desplegado pueden presentar lesiones de color café oscuro, que producen un olor particular. ▪ Doblamiento de la hoja bandera. ▪ El tejido infectado tiene una apariencia aceitosa de color café claro a amarillento ▪ Amarillamiento descendente. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necrosis de las inflorescencias ▪ Amarillamiento ascendente ▪ Caída de las hojas ▪ Apariencia de poste telefónico 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amarillamiento de todo el follaje. ▪ Necrosis de las inflorescencias. ▪ Marchitez y clorosis. ▪ Hojas secas en la punta o en general. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Caída de frutos. ▪ Necrosis de las inflorescencias. ▪ Amarillamiento progresivo desde las hojas basales. ▪ Caída de las hojas. ▪ Apariencia de poste telefónico.

Fuente: Castillo, 2001. Modificado por el autor.

Cuadro 4: Escala de desarrollo de los síntomas en la palma de coco (Eden-Green y Mackoy,)

Categoría	Escala	Síntomas
Asintomático	0	Planta sana o en proceso de incubación
Primarios	1	Solo caída de nueces
	2	Una inflorescencia necrótica
	3	Dos o más inflorescencias necróticas
Intermedios (Amarillamiento)	4	1/3 de la hojas amarilleando
	5	2/3 de las hojas amarilleando
	6	Todas las hojas amarilleando, hoja bandera bien
Avanzados (muriendo)	7	Hoja bandera muerta, algunas hojas verdes aún
	8	Hoja bandera muerta, todas las hojas amarillas
	9	Palma muerta (poste telefónico)

Fuente: Arellano y Oropeza, 1995; adaptado por el autor.

2.3.5 Métodos de manejo para el ALC

2.3.5.1 Control del vector

Se ha demostrado que el control del vector por medio de insecticidas reduce la dispersión del ALC. Sin embargo la implementación de esta medida a gran escala sería extremadamente costosa, insegura para la salud de la población, ambientalmente cuestionable y podría causar resistencia a los insecticidas (Howard y Harrison, 1999). Después de conocerse que había variedades resistentes a la enfermedad el manejo de los vectores se dejó a un lado por ser más difícil, pero ahora con los problemas de Jamaica y Honduras con las variedades resistentes esta área de investigación se esta retomando.

2.3.5.2 Control químico

Un método eficiente para tratar con antibióticos las palmas infectadas con el fitoplasma causante del ALC fue desarrollado en la universidad de Florida (Howard y Harrison, 1999). La dosis recomendada es de 0.5 a 20 g de hidrocloreuro de oxitetraciclina, la cual debe ser aplicada cada 4 meses mediante métodos de flujo por gravedad o inyección presurizada en el tronco (Agrios, 1995; Berlín, 2001). Según Berlín (2001) se pueden combinar esta solución y la primera para mantener vivas las palmas mientras que crecen las nuevas. Los programas de aplicación de antibióticos no pueden mantenerse indefinidamente ni utilizarse en plantaciones comerciales; su uso es relegado para palmas ornamentales, preventivamente y durante poco tiempo (Howard y Harrison, 1999 y Mariau *et. al.*, s. f.).

2.3.5.3 Control cultural

También existen una serie de practicas preventivas como cuarentenas que permiten que un país no afectado por la enfermedad esté en riesgo de una epidemia de ALC. Las cuarentenas no solo incluyen el germoplasma de cocotero u otras palmas, sino también, gramas y pastos que puedan alojar larvas o pupas de *M. crudus* (Urbina, 1997). El derribe, remoción o quema de palmas infectadas no es un método de manejo muy eficiente, aunque es muy usado para disminuir la cantidad de inoculo inicial (Agrios, 1995).

2.3.5.4 Resistencia genética

Hasta la fecha la solución más viable ha sido la replantación de las zonas afectadas con variedades resistentes a la enfermedad (Urbina, 1997; Howard y Harrison, 1999;). Dentro de las variedades resistentes se encuentran las del tipo Malayo Enano y los híbridos de estas con el Alto del Pacifico o de Panamá. Estos híbridos son producidos en jardines semilleros y son conocidos como Mapan (Costa Rica) y Maypan (Jamaica) (Berlín, 2001) (Cuadro 5). Sin embargo, la actual epidemia de Jamaica y la posible epidemia en Honduras hace poner en duda esta alternativa.

Been (1995) recomienda buscar otros materiales resistentes diferentes a los que hay actualmente; buscar herramientas que permitan un mejor control de vector o posibles vectores.

2.3.6 Materiales

Actualmente se siembran variedades Altas de Pacifico (AP), enanas e híbridos en Honduras para manejar el ALC (Cuadros 6 y 7; Figura 4).

2.3.6.1 Variedades Enanas

El Enano Malayo (EM) tiene dos características muy útiles: son excelentes madres para los híbridos F1 (Maypan, Mapan, Maren) y son altamente resistentes a las enfermedades letales (Harries,1999). Además de alta productividad y precocidad, son resistentes a suelos salinos pobres o pedregosos (Colantico, 2001). Harries (1999) afirma que los EM (rojo, amarillo y verde) son altamente resistentes al ALC según evaluaciones realizadas en Jamaica, aunque no se ha demostrado que sean resistentes a otras enfermedades.

Cuadro 5: Variedades de cocotero

Resistencia natural de algunos tipos e híbridos	
Alto del Atlántico	2%
Alto del Pacífico	40%
MayPan	80%
MayJam	??%
Enano Amarillo	90%
Enano verde	70%
Enano Rojo	60%

Fuente: Berlín, 2001

De los EM existe una alta disponibilidad de semilla. Los híbridos, por el contrario, tienen una menor disponibilidad (Illingworth, 1999), debido a que toma un año producir la semilla y unos cuantos meses para ser seleccionadas (Harries, 1999) lo que eleva enormemente los costos de producción.

2.3.6.2 Híbridos

Cuando se crea un híbrido entre EM y un AP hay una alta resistencia debido a que existen homocigotas dominantes y heterocigotas dentro de la población (Harries, 2001). En un inicio los híbridos Mapan fueron desarrollados como una solución comercial para los productores de copra en Jamaica durante la epidemia de los 70's (Berlín, 2000). Illingworth (2000) afirma que el híbrido Mapan presenta ventajas respecto a sus dos padres (EM y AP): precocidad, resistencia al ALC, uniformidad y alto rendimiento, aunque el ritmo de producción de algunas plantas hace pensar que su vida útil será mucho más corta (comunicación personal⁵). En Jamaica con los híbridos Maypan (el equivalente al híbrido Mapan costarricense) la resistencia varía entre 4-21% de plantas muertas, con un promedio de 10% (Dollet, 2000). Aunque ambos híbridos tienen padres iguales, los técnicos de Caritas afirman que los híbridos costarricenses están en desventaja con los jamaicanos por que estos últimos ya han sido plantados donde hay ALC y se ha probado su resistencia (Caritas, 2000).

La calidad del proceso de producción de semilla Costa Rica ha sido confirmada por una visita de los técnicos del Proyecto Nacional del Coco (PNC) durante el año de 1999. Los requisitos de garantía, tales como supervisión de la apertura de flores, recolección oportuna del polen y distancia mínima de otras plantaciones, eran cumplidos (Caritas, 2000).

Los híbridos se desarrollaron después de la primera epidemia en Jamaica (1965). Primero se intentó introducir variedades que mostraran resistencia y buenas características productivas. El EM mostró muy buena resistencia, precocidad y altos rendimientos

⁵ Molina, C. Producción de cocoteros híbridos. Jutiapa, Honduras. 2001. SFC (entrevista).

cuando estaba en buenas condiciones. Se siguieron introduciendo variedades, pero ninguna superaba al EM. En este momento (década del 70) comenzó un programa de hibridación combinando la alta resistencia del EM con el tamaño de nuez y la rusticidad de las variedades altas. Afortunadamente un cruce temprano de EM*AP fue productivo y resistente, desarrollándose así un sistema para producir comercialmente los híbridos (Been, 1995).

Para producir un híbrido se necesita primero tener una plantación madre de EM en producción (4-5 años); antes de que abra la espata de la inflorescencia se realiza la emasculación, removiendo la parte superior de la inflorescencia donde se encuentran las flores masculinas. Con el polen recolectado de padres Altos del Pacífico (AP) seleccionados se polinizan las inflorescencias y se cubren. Se recolecta la semilla híbrida más o menos al año de la polinización (Comunicación personal⁶).

Cuadro 6: Análisis comparativo de las variedades existentes en Honduras.

Variedad	% fruto		Copra	Altura	Productividad	Tolerancia
	Aceite	Agua	Kg/nuez	m	Nueces/año	%
<i>Alto del Atlántico</i>	71	25.4	0.25	25	91-94	10
<i>Amarillo</i>	60	30-35	0.2	11	88-89	95
<i>Enano Malayo</i>	60	24.7	0.17	10	90-100	95
<i>Verde</i>	60	30	0.16	11	85	95
<i>Alto de Panamá</i>	70	35.9	0.27	20-30	90-100	56
<i>Mapan, Maypan</i>	65	33.3	0.25	10	100-150	86-96

Fuente: Caritas, 2000, adaptado por el autor.

⁶ Sabio, C. Producción de semilla híbrida de cocotero. Zamorano, Honduras. 2002. Zamorano. (Seminario libre).



Figura 4: Variedades de cocotero y sus diferencias. Alto del Pacífico (arr. izq), Enano Malayo Verde, Rojo y Amarillo (abajo) y el híbrido de los dos (arr. der.). Diferencias en forma del tronco y número y tamaño de nueces.

Cuadro 7: Comparación de variedades de cocotero del tipo alto. Fuente: Harries, 1999 adaptado por el autor.

Origen	Silvestre	Domesticado	Introgresión
Variedades	Alto del Atlántico, Caribe, africano y asiático	Alto del Pacífico americano y algunos asiáticos	Altos de Pacífico asiáticos
Dónde se encuentran	Playas inhabitadas y aisladas	Comunidades aisladas	Asia y en el Pacífico
Tallo	Inclinado y curvo, con cicatrices irregulares	Robusto, erecto. Base ancha	Intermedio
Hojas	Largas	No tan largas	Intermedio
Patrón de fertilización	Cruzada, no absoluta	Cruzada, pero frecuente auto	Intermedio
Fruta	Larga, angular, cáscara ancha	Esferica, cáscara delgada	Varias combinaciones
Germinación	Lenta	Rápida	Intermedio
Tasa de crecimiento	Lenta	Rápida	Intermedio
Resistencia a fitoplasmas	Muy susceptible	Buena resistencia	Más susceptible
Tolerancia a vientos.	Susceptible	Tolerante	Intermedio

2.4 RESISTENCIA, TOLERANCIA Y SUSCEPTIBILIDAD.

Mientras más **resistente** sea una planta menos **susceptible** es y viceversa. Resistencia, también implica que una planta es susceptible, pero que es menos severamente atacada que otras variedades. Una planta es susceptible cuando es severamente atacada por una enfermedad (Castaño-Zapata, 1994).

2.4.1 Resistencia verdadera

La resistencia verdadera a un patógeno está controlada por la presencia de uno, pocos o muchos genes para la resistencia en la planta. En este tipo de resistencia el patógeno y el hospedero son más o menos compatibles uno con otro, ya sea por el nivel de reconocimiento químico o por la manera en que el hospedero de se defiende del patógeno mediante los mecanismos de protección (Agrios, 1995).

La resistencia verdadera se divide en resistencia horizontal y resistencia vertical. La primera está controlada por muchos genes y actúa en numerosos pasos de la fisiología de la planta para proveer mecanismos de defensa. La resistencia vertical está controlada por uno o varios genes y actúa, generalmente, evitando el establecimiento del patógeno o su reproducción (Agrios, 1995).

2.4.2 Resistencia aparente

Esta resistencia se observa cuando un hospedero susceptible no es afectado por el patógeno. Este tipo de resistencia se da bajo ciertas condiciones o circunstancias. La resistencia aparente se puede dar por escape, tolerancia o klenducidad (Agrios, 1995).

El **escape** ocurre cuando una planta genéticamente susceptible no es infectada en el campo a causa del azar, falta de inoculo, alguna característica en la planta diferente a resistencia o klenducidad, o debido a que condiciones ambientales no fueron apropiadas para el proceso de infección (Castaño-Zapata, 1994).

Tolerancia es la habilidad de la planta para producir una buena cosecha aún cuando está infectada por el patógeno. Es más un concepto referido al rendimiento que a la reacción a la enfermedad (Agrios, 1995).

Klenducidad es cuando una planta genéticamente susceptible muestra resistencia aparente o falta de enfermedad debido al efecto sobre algo diferente al patógeno, generalmente sobre un vector (Castaño-Zapata, 1994).

2.4.3 Resistencia del cocotero al ALC

El mecanismo de resistencia del ALC no se conoce hasta el momento. Hay una hipótesis que plantea la existencia de una resistencia incompleta en donde los homólogos dominantes para el gen que gobierna este mecanismo son resistentes y los homólogos recesivos susceptibles (Harries, 2001). Las variedades enanas son altamente resistentes, su autogamia hace que contengan estos homólogos dominantes; el Alto del Pacífico es medianamente resistente ya que existe un porcentaje de autopolinización en la población. En los Altos del Atlántico existe un gran porcentaje de polinización cruzada lo que los hace muy susceptibles. Cuando se crea un híbrido entre un enano y el Alto del Pacífico, la resistencia es de media alta a alta debido a que en la población hay homocigotos dominantes y heterocigotos (Harries, 2001).

2.5 Impacto socioeconómico y ambiental

El cocotero es esencial para la subsistencia, la dieta y recreación de los múltiples grupos étnicos de diferentes estratos sociales de las comunidades del litoral, islas y cayos de la costa caribe de Honduras (Ardón *et. al.*, 2001). Para Morales (1994), el coco es un ingrediente de la mayoría de alimentos consumidos por las familias garífunas de la costa norte de Honduras, se utiliza en sopas, arroz, para hacer aceite y como bebida, además es un componente principal en la elaboración de pan y dulces. El coco es un elemento que está presente en todas las parcelas, solares, a la orilla de la playa en asocio con una gran

cantidad de cultivos agronómicos, frutales, maderables y animales domésticos (Ardón *et. al.*, 2001).

En el contexto ambiental el cocotero cumple con funciones de retención del suelo, barrera rompevientos, conservación de la biodiversidad, establecimiento de un microclima que permite el desarrollo de otras plantas y alivio de la presión sobre otros recursos (Ardon *et. al.*, 2001).

En la dimensión social del problema, el cocotero es la base de la alimentación de los pobladores de la costa norte. El cocotero tiene más de 50 aplicaciones dentro de una sola comunidad, que van desde agua de coco hasta elaboración de artesanías (comunicación personal⁷). Las principales consecuencias de la pérdida del cocotero desde un enfoque social son, según Ardon *et. al.* (2001):

- Reducción de un ingrediente fundamental en la dieta de las comunidades costeras.
- Pérdida de un recurso que era accesible a toda la comunidad.
- Cambio en la calidad nutritiva de los platos.
- Migración de la población que dependía del coco para vivir.
- Mayores esfuerzos para conseguir el sustento diario.
- Incertidumbre frente al futuro del cultivo del coco en las comunidades.

En cuanto a la dimensión económica de la coyuntura, debido a la escasez del cocotero el precio se ha elevado hasta 10 veces o más en algunas comunidades. Honduras producía cerca de 29 millones de nueces en un área aproximada de 6,000 ha, que generaban un monto de 30 millones de lempiras anuales; lo más importante de este dato es que la mayoría de la producción estaba en manos de pequeños y medianos productores, en el país sólo hay un gran productor-comercializador que es la SFC (Cuadro 8). En la actualidad la producción ha declinado en un 80-90% y el precio ha subido de 10-15 veces (Ardón *et. al.*, 2001).

Cuadro 8: Tipificación de los productores de cocotero en la costa caribe de Honduras antes del ALC.

Rango (Cantidad de plantas)	Porcentaje de productores
5 – 10	35 %
11- 50	25%
51-200	20%
201-500	10%
501- 1000	5%
1000->	5%

Fuente: Ardon *et. al.* (2001)

⁷ Figueroa, A. Importancia del cocotero en las comunidades Garifunas. Limón, Honduras. 2001. Caritas. (Seminario).

2.5.1 Programa de rehabilitación del cocotero en Honduras

El programa de manejo del ALC en Honduras es diferente al de otros países como: México, Jamaica o Estados Unidos (Florida), ya que el impacto socioeconómico en la población es bastante fuerte y por que la población meta es diferente en el caso de Honduras. Los componentes de este programa desarrollado en conjunto por varias instituciones nacionales y extranjeras coordinado por la Red Wafaluma son los siguientes (Doyle, 2002):

- Establecimiento de plantaciones madre con germoplasma resistente importado principalmente de Jamaica y Costa Rica.
- Capacitación y divulgación.
- Investigación.
- Replantación.

2.5.2 Programas de replantación.

Los programas de replantación se desarrollan por organismos del gobierno y organismos no gubernamentales (ONG's), así como también por instituciones de investigación y educación; a continuación se presentan los programas de replantación más importantes en Honduras (Figura 5):

- **Caritas**

Han distribuido 27,000 nueces y 13,500 plantones en los departamentos de Gracias a Dios y Colón, obtuvieron perdidas de 20% de 12,500 nueces provenientes de Costa Rica. Además se realizaron actividades como el establecimiento de 21 viveros, 24 comités locales del coco y contactos para adquirir más semilla (Ardon *et. al.*, 2001).

- **Prolansate/ Zamorano**

Han distribuido 13,796 plantas de los programas apoyados por COSUDE (Cooperación Suiza para el Desarrollo), Cristian Aid y el Proyecto Nacional del Coco en 14 comunidades de la bahía de Tela. Además se han establecido 2 viveros de 1,500 nueces cada uno de Altos del Pacífico de Choluteca, Honduras y se han organizado 11 comités locales del coco (Morales, 2001).

- **Proyecto Nacional del Coco (PNC)**

Hasta diciembre de 2000 se habían sembrado 40,246 plantas, para le año 2001 se tenía presupuestado la siembra de 24,000 plantas más en los Departamentos de Cortés, Islas de la Bahía y comunidades de los municipios de Esparta y Colón (Red Nacional del coco Wafaluma, 2001).



Figura 5: Programa de rehabilitación del cocotero en la bahía de Tela
 Prolansate/Zamorano (A, C, E Y F). Programa de replantación Caritas (B, D) Fuentes:
 Prolansate, M. Ardon, A. García, M. Castillo.

- **FHIA**

La FHIA tiene un programa de producción de germoplasma. En el año 2000 vendieron 42,000 plantas de Enanos Malayos y de Maypan de Jamaica; estas plantas se produjeron a un costo de 4 \$U.S., pero se vendieron, subsidiadas a 2 \$U.S., gracias a un proyecto de ayuda post- Mitch. En este mismo año mejoraron la eficiencia en vivero gracias a la asesoría de Jamaica, se paso de 40% de germinación a 75%. Además se replantó un huerto madre de Enano Malayo de 5 ha para reducir las importaciones de semilla; se espera producir 200, 000 nueces de material resistente para la venta para el año 2004 (Red Nacional del coco Wafaluma, 2001).

2.6 ANTECEDENTES DE LA FINCA SALADO LIS LIS.

Inicialmente la plantación tenía 647 ha de cocotero AA; antes de la venida del huracán Mitch (1995-1997) ya había muerto casi la totalidad de los AA y posterior a este fenómeno natural el avance de la mortalidad fue más rápido en los híbridos Mapan (Bustamante, 2000). Es muy posible que el huracán Mitch haya acelerado la tasa de dispersión de la enfermedad vía exposición de las plantas a estrés abiótico y mecánico, haciéndolos más susceptibles. Es posible, también, que haya aumentado la dispersión del vector debido a los fuertes vientos (Doyle, 2002).

Con la amenaza del ALC a Honduras la SFC decidió cambiar su variedad AA por los híbridos Mapan y así adelantarse a la posible epidemia. Cuando la enfermedad mató a los cocoteros criollos en los años 1997-1998, se pensó que los híbridos Mapan iban a estar en producción; sin embargo, los híbridos también empezaron a tener alta mortalidad y su producción apenas fue el 5% de lo que era antes de la llegada de la enfermedad (comunicación personal⁸). Hubo una mortalidad de 29 % del total de plantas en el campo. Sin embargo las nueces plantadas en los años de 1993-1995 presentan mortalidades alarmantes (30-70 %) en comparación con el resto de replantación (20%). Antes del huracán Mitch hubo un declive pronunciado en la producción (años 1996-1997) que no pudo solventarse con la producción de los híbridos (Cuadro 9).

El manejo de la plantación de híbridos es diferente a la de los Altos del Atlántico. Antes solo se hacían cuatro ciclos de chapia y dos de deshierba de la proyección de la copa. Los híbridos Mapan además de la limpieza se fertilizaban (hasta el año 2000) una vez al final del invierno y otra al inicio de este (comunicación personal³) (Cuadro 10).

⁸ Molina, C. 2001. Historia productiva de la finca el Salado Lis lis. Jutiapa, Honduras. 2001. SFC (entrevista).

Cuadro 9: Cantidad de híbridos Mapan resembrados, supervivencia y producción global en la finca SII.

Año	Replantación (Mapan)	Supervivencia (%)	Plantas muertas	Producción (nueces* 4 semanas)
1993	6550	30	4585	80000
1994	10000	60	4000	80000
1995	8000	70	1600	80000
1996	11000	80	2200	-
1997	5000	80	1000	40000
1998	5000	80	1600	5000
1999	8000	80	1600	4000
2000	1000	80	200	5000
2001	0		0	3000
Total	57550	71%	16785	

Fuente: El autor

Cuadro 10: Fertilización de los híbridos Mapan en la plantación de Salado lis- lis.

Edad	Nitrogeno	KCl	MAP*
	gr/planta		
1 a 2 años	500	700	450
3 a 4 Años	700	1000	450
> 5 años	1000	1500	500

Fuente: El autor. * fosfato mono amónico.

2.7 DIAGNOSTICO

Para el diagnóstico del ALC existen métodos directos e indirectos. El método directo más usado es la microscopía electrónica. Los indirectos incluyen la observación de los síntomas visualmente, inyecciones de oxitetraciclina y el diagnóstico molecular. El primero de los indirectos es el más ampliamente utilizado y el último es el más confiable (Oropeza, 2001). Las pruebas moleculares, además de constituir un método de diagnóstico muy preciso, permiten el estudio de la epidemiología de la enfermedad y la caracterización del patógeno, pasos indispensables en el manejo apropiado de la enfermedad (Harrison, 1999).

Phil Jones (Rothamsted Experimental Station, Inglaterra) en colaboración con el CICY detectaron el fitoplasma del ALC en embriones de coco de plantas enfermas pero no en sanas en México, utilizando una técnica llamada *in situ* PCR. Esto sugiere que el fitoplasma se puede mover al embrión. Sin embargo esto no significa que la enfermedad pueda ser transmitida por semilla; se deben complementar estas pruebas con detecciones tempranas de ALC en plantas germinadas (Jones, *et al*, 2001).

2.7.1 Toma de muestras.

Las concentraciones del fitoplasma en coco han sido bajas en comparación con otras especies de palmas; las densidades más altas han sido encontradas en los vasos del floema del tronco, en la base de las hojas nuevas, en los ápices de la raíz y en las inflorescencias en desarrollo (Eden-Green, 1997, Oropeza *et. al.*, 2000). Estos fitoplasmas han sido encontrados muy pocas veces en muestras de sitios accesibles al vector como hojas viejas u hojas con los folíolos abiertos (Eden-Green, 1997). Las muestras de Floema de tronco presentan una detección cercana al 100% (en severidades de 1 a 3) y son fáciles de tomar y conservar (Oropeza *et. al.*, 2000).

Para la toma de muestras se puede usar: floema de tronco, ápice, inflorescencias y hojas inmaduras (Oropeza *et al*, 2000), También se puede usar el embrión de la nuez madura o raíces (OIRSA, 2000).

Al almacenar las muestras en un "buffer" con antioxidante y desinfectando la superficie del tronco, la muestra de floema de tronco constituye una forma viable de hacer un diagnóstico sin necesidad de destruir la planta (Harrison, 2000). Castillo (2001) encontró, en contraste con Córdova Lara (2000), que en híbridos Mapan existe un mayor porcentaje de detección del fitoplasma causante del ALC en muestras de inflorescencia que en las de floema de tronco. Harrison (2000) detectó la presencia de fitoplasmas en muestras de tronco y ápice del tallo, pero no encontró en el raquis de la hoja.

Harrison (2000) afirma que las muestras de tronco deben ser tomadas por personal especializado, mientras que las muestras destructivas (ápice y hoja inmadura) y las de inflorescencias pueden ser tomadas por cualquier persona ya que no se necesita de equipo especializado. Para solventar esto Castillo (2001) adaptó un manual que permite que los técnicos pertenecientes a la red Wafaluma envíen muestras al laboratorio de diagnóstico molecular del Zamorano, de tejido de inflorescencia y tronco.

Las actividades de muestreo para evaluar la evolución y/o detección de la enfermedad deben realizarse en la totalidad de las plantaciones, durante todo el año, por vía aérea y terrestre, intensificándose cuando se presenten ambientes favorables para el desarrollo de la enfermedad (OIRSA, 2000).

2.8 Procesamiento de muestras

El procesamiento de muestras se divide en tres principales pasos: la extracción del ADN total, la amplificación del ADN por medio de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** por sus siglas en inglés) y la visualización de las bandas de ADN amplificado por medio de la electroforesis.

2.8.1 Extracción

La extracción de ADN se realiza siguiendo el protocolo para su extracción plantas leñosas, herbáceas e insectos de Doyle y Doyle, (1990; citado por Kirkpatrick *et. al.*, 1995); Este método fue optimizado por Harrison (2000) para su implementación en el diagnóstico del ALC, en el laboratorio de diagnóstico molecular del Zamorano.

La extracción de ADN esta basada en centrifugación diferencial y en la utilización de compuestos químicos capaces de romper las paredes celulares (detergentes) y precipitadores del ADN (sales y alcoholes). Primero se maceran las muestras para liberar el contenido celular, luego el extracto se somete a varios pasos de centrifugación y lavado, para formar un precipitado de ADN que se resuspende en agua destilada estéril (Kirkpatrick *et. al.*, 1995; Micklos y Freyer, 1990). Este ADN contiene el material genético de la planta y de los microorganismos que viven dentro de ella. En este caso solo interesa el ADN del fitoplasma causante del ALC. El bromuro hexadeciltrimetilamonio (CTAB) se une fuertemente al ADN, desplaza las proteínas y evita su degradación. El CTAB se remueve mediante lavados con cloroformo y el ADN permanece en la fase acuosa listo para ser precipitado con etanol.

La cuantificación del ADN se puede realizar mediante electroforesis en geles de agarosa o mediante un fluorómetro. Esto permite medir cuantitativa y cualitativamente la calidad del ADN antes de hacer el PCR. La estimación puede hacerse ya que la intensidad de la fluorescencia generada por el bromuro de etidio, cuando está mezclado con los ácidos nucleicos, a través de lamparas de rayos ultravioletas, es directamente proporcional al total de la masa de ADN o ARN (Kahl y Valadez, 2000).

2.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una tecnología que permite la síntesis de segmentos de ADN *in vitro*, con la finalidad de detectar una secuencia de interés en el genoma de un individuo. Esta se ha convertido en la herramienta clave de la investigación biológica y la biotecnología aplicada (Kreuzer y Massey, 1996). Desde que fue patentada, en 1985, se ha utilizado con éxito en diferentes campos del conocimiento como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalista y en fitopatología (Kahl y Valadez, 2000). La PCR permite sintetizar una gran cantidad de cadenas de ADN, partiendo tan sólo de una cadena modelo, dos iniciadores, ADN polimerasa y nucleótidos libres (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Kreuzer y Massey, 1996, Kahl y Valadez, 2000). En una reacción de 30-35 ciclos se pueden sintetizar alrededor de 10^6 a 10^8 moléculas de ADN; estas secuencias amplificadas pueden verse en una gel de agarosa (Kahl y Valadez,

2000). Las fases del PCR son desnaturalización (95 °C), hibridación de iniciadores (55 °C) y síntesis de la nueva cadena (72 °C) (Micklos y Freyer, 1990).

Usando PCR anidado ("nested" PCR), se puede mejorar la sensibilidad y especificidad de la amplificación. El "nested" PCR es una herramienta útil para la detección del ALC en plantas de cocotero cuando la muestra es tomada de tronco, ya que Jackson *et al.*, 1991 ha encontrado problemas con la sensibilidad del PCR cuando se trata de hospederos leñosos de fitoplasmas, que contienen bajas concentraciones del ADN del fitoplasma en la muestra.

El hecho de que puedan haber contaminantes internos o externos en la amplificación, tiene serias implicaciones para su aplicación en la investigación y el diagnóstico de enfermedades (Kahl y Valadez, 2000).

2.8.3 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP's)

Las variaciones en el arreglo de los fragmentos, generados por la digestión de un producto de amplificación, por una enzima específica se llaman Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's); estas variaciones pueden ser causadas por cambios en la secuencia, inserciones o desapariciones de segmentos de ADN o sustituciones de bases en el sitio de restricción de la enzima (Razin y Yogevev, 1995; Moctezuma y Kahl, 2000).

El análisis por RFLP's, es una herramienta muy importante en la clasificación e identificación de aislamientos de fitoplasmas, además de evaluar la diversidad genética de las razas dentro de los grupos establecidos (Razin y Yogevev, 1995). A pesar de que con RFLP's, sólo se evalúa un tipo de polimorfismo por ensayo, los resultados son muy precisos (Moctezuma y Kahl, 2000).

La técnica de RFLP's puede ser aplicada para realizar el primer paso de la caracterización molecular de microorganismos con los que se trabaja en el laboratorio de diagnóstico molecular del Zamorano (Castillo, 2001). Por ejemplo (Castillo 2001) encontró, usando RFLP's un fitoplasma proveniente de La Ensenada, Honduras que difiere de los aislados de Jamaica, el Pacífico mexicano y el ALC clásico de Florida. Sin embargo las implicaciones en cuanto a la resistencia varietal, severidad de la enfermedad, rango de posibles hospederos y diversidad de vectores, no pueden ser determinadas directamente.

2.8.4 Electroforesis horizontal

La electroforesis horizontal es una técnica que separa los fragmentos de ADN de acuerdo a su tamaño y peso molecular, a través de la aplicación de electricidad en una matriz

porosa (agarosa) (Kahl y Valadez, 2000). El tamaño de los poros está determinado por la concentración de la agarosa en la reacción, a mayor concentración de agarosa los poros son más pequeños. La distancia de migración de un fragmento de ADN en el gel de agarosa es inversamente proporcional a su peso molecular (Kreuzer y Massey, 1996), las moléculas viajan de acuerdo a su carga negativa hacia el polo positivo del tanque de electroforesis. La velocidad de la migración depende de la concentración de agarosa y de la intensidad de la carga (Kreuzer y Massey, 1996). Este método es sencillo y eficiente y permite la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN de varias longitudes, la agarosa generalmente separa fragmentos que van desde 200 pb hasta 30 kb (Kahl y Valadez, 2000).

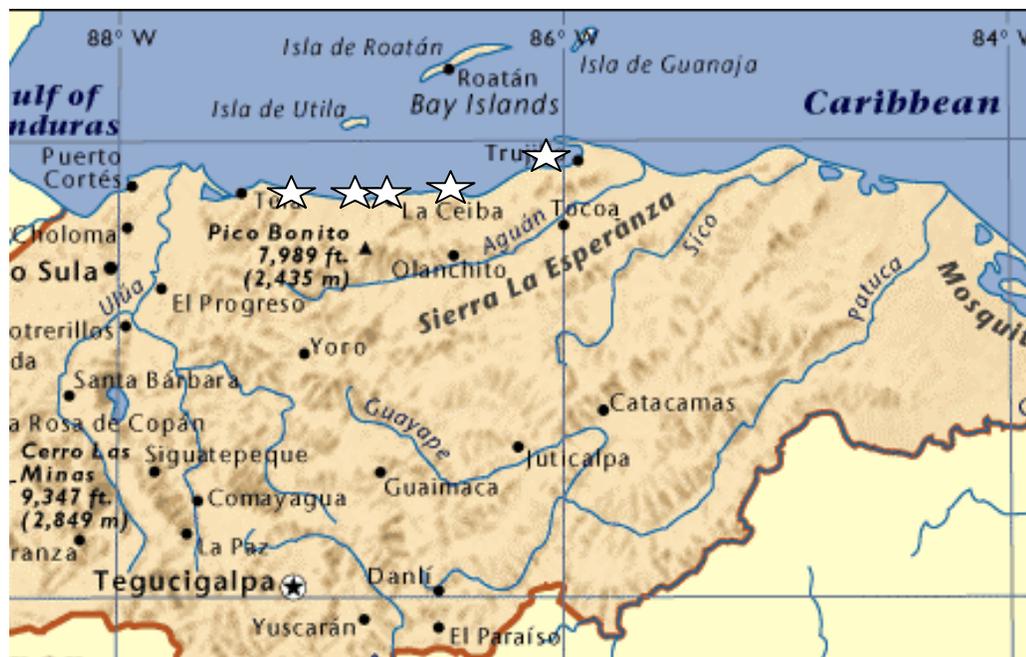
3 MATERIALES Y METODOS

3.1 UBICACION

Este estudio se llevó a cabo en la costa norte de Honduras en el departamento de Atlántida desde enero del 2001 hasta febrero del 2002. La mayor parte del estudio se hizo en la plantación de Salado Lis lis propiedad de la Standard Fruit Company. Esta plantación está ubicada en el municipio de Jutiapa a 40 minutos de la Ceiba en la carretera que conduce a Trujillo. La plantación está rodeada por uno de sus lados por el mar y dentro de ella hay varios esteros por lo que hay un movimiento de agua superficial y subterráneo constante.

Se tomaron muestras aisladas en lugares donde se sabía que se había replantado con híbridos Mapan desde hace aproximadamente ocho años. Estos lugares fueron: Salado Barra, Cadecca y Triunfo de la Cruz (Atlántida) y San Antonio y Cusuna (Colón) (Figura 6).

Figura 6: sitios de muestreo del estudio.



3.2 MUESTREO Y RECOLECCION

3.2.1 Nomenclatura de las muestras

Se usaron dos tipos de nomenclatura, uno para la identificación de las plantas en el campo y otro para la identificación del ADN en el laboratorio.

En campo se siguió la siguiente nomenclatura:

Por ejemplo **10 SII 100 F** equivale a decir que esta muestra (# 100) se tomó en el viaje 10 del sitio Salado Lis lis (SLL), de la inflorescencia de la palma (F).

Los sitios muestreados en este estudio fueron:

- **SII:** Finca Salado Lis lis. Viajes del 6-11 muestras de la 61-134 y I- VII. Durante: enero-2001, mayo-2001, julio-2001, agosto-2001, noviembre-2001 y enero-2002.
- **Cas:** Cadecsa. Viaje 1 muestras de la 1-5. En noviembre-2001.
- **Sb:** finca salado Barra. Viaje 3. Muestra 1. Mayo 2001.
- **Sa:** San Antonio. Viaje 1. Muestra 1. Mayo 2001.
- **Tc.** Triunfo de la Cruz. Viaje 1. muestra 1. Noviembre-2001.
- **Cu:** Cusuna. Junio-2001.

Para cumplir con uno de los objetivos del estudio se tomaron muestras de los siguientes tipos de tejido. Los dos primeros, floema de tronco de tallo e inflorescencia, se tomaron en la mayoría de las muestras ya que no se tenía que hacer un muestreo destructivo:

- **A:** Floema de tronco (tronco).
- **F:** Inflorescencia (inmadura).
- **P:** Palmito.
- **H:** Hoja.
- **E:** Embrión.

En el laboratorio se siguió la nomenclatura de las muestras que entran aquí. Esta nomenclatura fue igual a la anterior, sólo que esta el número de muestra fue la continuación de las demás muestras tomadas en campo (Figura 7).

3.3 EVALUACION DE INCIDENCIA Y SEVERIDAD Y ESTADO GENERAL DE LA PLANTACION EN CAMPO

La severidad se midió según la escala internacional (Mackoy) que va de 0-9 siendo 0 planta sana o asintomática y 9 totalmente muerto (poste telefónico). Para medir la incidencia se contaron las plantas con síntomas en cada zona y se relacionó con el número de plantas totales; este conteo se hizo de manera subjetiva. También se hicieron

observaciones agronómicas y del ambiente en general en que se encontraban las plantas para poder relacionarlas con la sintomatología. Se uso SIG (sistema de Información Geografica) en el segundo muestreo para ubicar las muestras en el futuro; no se siguió usando por que el error mínimo del equipo era de 10 mt y la plantación estaba sembrada a 7*7 mt. Por está razón este sistema no fue útil para este estudio.

3.4 METODOLOGIA DE MUESTREO PARA ANALISIS MOLECULAR.

El muestreo se realizó siguiendo el Manual de Muestreo para la Toma Muestras de Cocotero (Castillo, 2001), según los siguientes criterios:

- Plantas con síntomas de amarillamiento (no necesariamente ALC).
- Plantas de 3 años en adelante, que ya estuvieran en estado reproductivo o próximas a él.
- Plantas entre 1-5 en la escala internacional (Mackoy) de síntomas. En la medida de lo posible se tomaron muestras de tejidos de inflorescencia inmadura y Floema de tronco.
- Plantas con síntomas atípicos de Amarillamiento o con síntomas de ALC pero con diferente patrón.
- Plantas sanas o asintomáticas en sitios con fuerte mortalidad.
- Plantas representativas de una zona, o de un tipo de síntomas.
- Plantas Híbridos Mapan y también se tomaron algunas muestras de Enanos Malayos.

Se hicieron las siguientes modificaciones:

1. Se hicieron más de dos agujeros en el tronco de los cocoteros para tener una muestra más representativa (esto se hizo luego del segundo muestreo) y por que el fitoplasma no está distribuído uniformemente en la planta (Córdova-Lara, 2000).
2. Se intensificó la desinfección del equipo, evitando la contaminación cruzada.



Figura 7: tipos de tejido para muestreo de cocotero. Inflorescencia no adecuada, palmito, inflorescencia adecuada, floema de tronco.

3.5 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.5.1 Extracción de ADN

Las muestras fueron extraídas según el método de Doyle y Doyle modificado por Harrison. Las condiciones, los reactivos y el procedimiento de extracción fueron constantes para todos los tipos de tejido y en todas las extracciones. En el último muestreo se realizaron extracciones a gran escala (5 g de tejido); el protocolo fue igual a partir del paso 5 del protocolo de Doyle y Doyle (Anexo 2, Figura 8).

3.5.2 Cuantificación de ADN

Se corrió una gel de agarosa al 0.75% en todos los casos, para comprobar la calidad del ADN extraído. En el caso de que la cantidad de ADN no fue suficiente o que no hubo ADN en la muestra se volvieron a extraer. También se utilizó el fluorómetro para cuantificar el ADN y hacer una prueba para saber en qué tejido (inflorescencia y floema de tronco) y con qué cantidades de tejido de floema de tronco inicial (con 5 g y 0.5 g de tejido) se obtenía mayor concentración de ADN. Los datos fueron analizados en el programa estadístico Minitab®.

3.5.3 PCR

Todas las muestras fueron evaluadas con tres "primers". Uno era el universal para los fitoplasmas (P1, P7), otro era el grupo específico ("nested"-PCR) y un último específico para ALC clásico (LY, LY) (Cuadro 11). En los dos primeros muestreos sólo las muestras positivas con los "primers" generales se analizaron mediante PCR con los "primers" específicos (LYF1/LYR1). En el PCR se incluyeron dos controles un positivo (palma (+) en varios ensayos) y un negativo (agua destilada o palma asintomática o de fuera de las áreas afectadas).

Se utilizaron "Ready to go PCR Beads" (Amersham Pharmacia Biotech, inc. Piscataway, NJ, USA) Cada perla se disolvió en 24µl de agua destilada estéril y se mezcló con cada uno de los "primers" (0.5µl de cada uno). Este volumen (25µl) se dividió en dos reacciones y se le adicionó el ADN de cada una de las muestras (1µl). Esta mezcla fue puesta en el termociclador Perkin Elmer 480® (Norwalk, CT, USA) y se amplificó con los siguientes archivos (Cuadro 11):

- LYR1, LYF1 archivo # 41
- P1, P7 archivo # 22
- LY16s/23sr archivo # 25

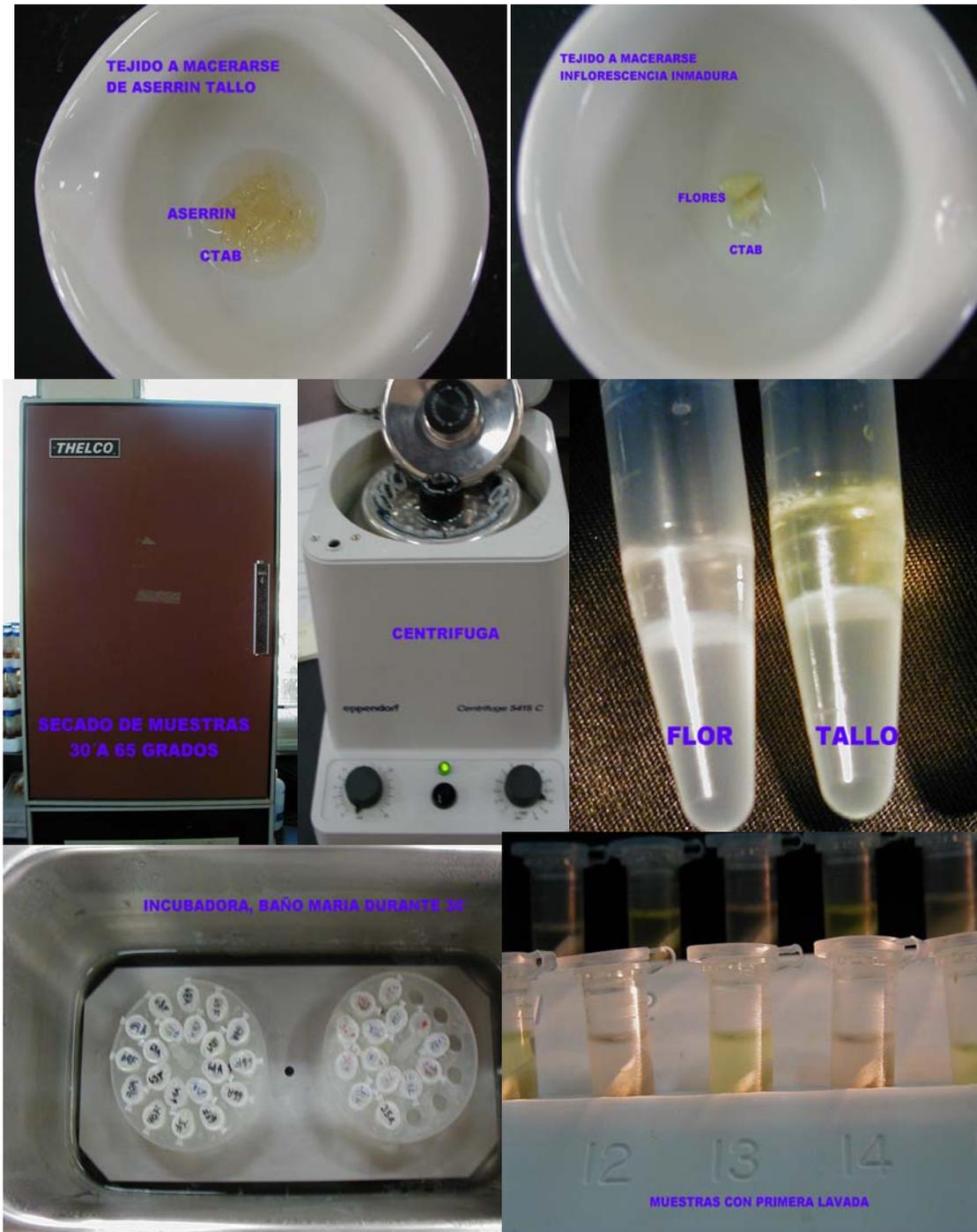


Figura 8: Pasos y equipo necesarios para la extracción de ADN total de tejido de coco usados en el laboratorio de diagnóstico molecular del Zamorano.

Cuadro 11: "Primers" universales, grupo específicos y específicos para la detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del producto de PCR (Kb)	Autores
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	1.8	Deng y Hiruki
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	1.8	Schneider <i>et. al.</i>
LY16s	CAT GCA AGT CGA ACG GAA ATC	1.7	Harrison
LY16s/23sr	TTG AGA ATT TAC GTT GTT TAT CTA C	1.7	Harrison
LYR1	TCG TTT TGA TAA TCT TTC ATT TGA C	1.0	Harrison
LYF1	CAT ATT TAT TTC CTT TGC AAT CTG	1.0	Harrison

Fuente: Seemüller *et al.*(1995), Harrison y Oropeza (1997) y Castillo (2000)

Se realizó un ANDEVA comparando los porcentajes de detección usando los "primers" universales para fitoplasmas y específicos para el fitoplasma causante del ALC, con cada uno de los tejidos: floema del tronco e inflorescencia inmadura. Posteriormente se realizó una separación de medias con la prueba SNK

Se realizó un ANDEVA y separación de Medias con la prueba SNK igual a la anterior pero incluyendo "nested" PCR con ambos tejidos. Los datos se analizaron en el programa estadístico SAS®.

3.5.4 -Electroforesis horizontal

Se visualizó el ADN resultante del PCR en un gel de agarosa (0.75 %). Una mezcla de "buffer" de carga (2µl) y de la muestra, los controles y el escalera molecular (1 kb) (5µl) fue puesta en cada uno de los pozuelos dejados por el peine al enfriarse el gel de agarosa. Alimentado por una fuente de poder 1000/5000® (Richarmond, CA, USA), se corrió por espacio de 50-120 minutos a 75 voltios en un tanque de electroforesis Hoefer HE33.

Una vez terminada la corrida se tiñó el gel con bromuro de etidio a una concentración de 1mg/ml por espacio de 10 minutos y se lavó con agua por 10 minutos; luego se visualizó en un transluminador ultravioleta UVP® (Upland, CA, USA) y se documentó con una cámara Polaroid DS34® con filtro naranja.

3.6 EVALUACION DE LA MORTALIDAD DE LAS PLANTAS YA MUESTREADAS

Se intentó, en lo posible, evaluar las plantas ya muestreadas a través del tiempo para saber como habían evolucionado sus síntomas. Si la planta era positiva se esperaba que muriera después de 3-6 meses; si era negativa se esperaba que los síntomas hubieran desaparecido o en su defecto que la muerte de la planta se retrasara unos meses más. Se realizaron evaluaciones durante los meses de: julio-2001, agosto-2001, noviembre-2001 y enero-2002. Se usó una hoja para anotar los síntomas y clasificarlos dentro de la escala internacional (Cuadro 13). En algunos casos se volvió a muestrear las plantas, o las plantas de muestreos anteriores a este estudio.

Se tuvieron grandes dificultades para encontrar de nuevo las plantas muestreadas. Aunque se marcaban debidamente, muchas de estas cambiaban de hojas; en algunos lugares el pasto era demasiado alto para ver los números; las plantas no tenían suficiente tallo para marcarlas; o simplemente había muerto la planta y su tronco había caído.

Cuadro 12: Hoja para la evaluación del avance de los síntomas de ALC

Escala	Muestra	Cocos	Inflorescencias	Hojas	Observaciones
2	7 SII 62	Pocos	Necróticas	Verdes	Sólo se observó síntomas. Mapan.
3	7 SII 63	Caídos	Necróticas	Verdes	Sólo se observó síntomas. Mapan.
4	7 SII 64	Caídos	Secas	1/3 caídas y secas	Sólo se observó síntomas. Mapan.
2	7 SII 65	Caídos	Secas	Normal	Sólo se observó síntomas. Mapan.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

En esta sección se describen los resultados de manera cronológica desde el primer muestro (6 SLL en la nomenclatura de las muestras) hasta el sexto muestreo (11 SLL en la nomenclatura de las muestras). Las plantas que fueron tomadas fuera de la finca de Salado Lis lis se unieron al muestreo más próximo a la fecha de recolección de dichas muestras. Al final se hizo un resumen con el fin de ofrecer una visión global de los resultados y poder emitir conclusiones más generalizadas y puntuales del estudio. Cada muestreo se separó en observaciones de campo y resultados de laboratorio.

4.1 PRIMER MUESTREO (28 DE ENERO DE 2001)

4.1.1 Observaciones de campo

La finca de Salado Lis-lis presentaba una acumulación de agua por encima del suelo en la mayoría del área, en algunos lugares la tabla de agua estaba varios centímetros por encima de la superficie y formaba drenajes naturales; estas observaciones concuerdan con las hechas por Dollet (2000) y Bustamante (2000) en esta misma plantación. Se observaron diferencias en crecimiento de las palmas, en algunas zonas las plantas presentaban un desarrollo y crecimiento normal; en otras, las plantas habían crecido poco y el desarrollo era pobre, no florecían y por consiguiente no había producción o no alcanzaba a cargar las suficientes nueces (Figura 9). Dollet (2000) observó plantas con crecimiento vigoroso y buena producción cerca de plantas en pésimas condiciones (Figura 9). Por el exceso de humedad también había síntomas de *Phytophthora palmivora* e incluso la compañía estaba aplicando Fosetil de aluminio para manejar la enfermedad (Figura 12).

En la finca se estaban construyendo drenajes para desalojar el agua presente (hasta nivel 3°) en la plantación. El ingeniero Molina, encargado de la plantación, indicó que es la parte que podrían resolver ellos. El problema de acumulación excesiva de agua en la finca es reciente y es causado por el incremento de invasiones en el sector y la acumulación de basura en los drenajes naturales (comunicación personal⁹).

⁹ Molina, C. Situación actual de los drenajes en la finca Salado Lis lis. Jutiapa, Honduras. 2002. SFC. (Entrevista)



Figura 9: Estado de los híbridos Mapan en Salado Lis lis.

Durante este muestreo se observaron trampas para picudo del coco (*Rynchophorus palmarum* L.) con gran cantidad de individuos en cada trampa. Es posible que muchas de las palmas estuvieran muriendo de la enfermedad del anillo rojo, transmitida por el picudo y los síntomas se confunden con los del ALC (Cuadro 3) o por causa de los picudos hembras ya que estas ponen sus huevos en las heridas y sus larvas barrenan las palmeras hasta el punto de crecimiento apical, en donde causan la muerte del cocotero. No fue posible derribar palmeras para la búsqueda del nemátodo y su correspondiente anillo (Figura 12).

En la plantación se observó durante este muestreo una incidencia media de síntomas de amarillamientos y muerte de los híbridos Mapan; sobre todo en los lugares con alta humedad de suelo.

4.1.2 Resultados de laboratorio

En las muestras tomadas de inflorescencias se encontró mayor cantidad de muestras positivas, con los "primers" universales para fitoplasmas (P1/P7), que en las de floema de tronco (40% frente a 9%). En cuanto a los "primers" específicos para el fitoplasma causante del ALC (LYF1/LYR1) también se encontraron más muestras positivas en

inflorescencia que en tronco (30% frente a 0%). Con "nested" PCR se encontró un 83% de palmas positivas en floema de tronco y un 80% de palmas positivas en inflorescencia (Cuadro 13, Figura 11).



Figura 10. Gel de electroforesis mostrando productos de PCR utilizando tres tipos de "primers" Escalera molecular (1,2). Control positivo "nested" PCR (2), control negativo nested PCR (3), control positivo LYR1/LYF1 (4), control negativo LYR1/LYF1 (5), control positivo P1/P7 (6), control negativo P1/P7 (7). 106 F "nested" PCR (8), 106 F-LYR1/LYF1 (9), 106 F-P1/P7.



Figura 11. Resultados usando "nested" PCR. En muestras de inflorescencias y floema del tronco.

Las diferencias encontradas entre inflorescencia y floema de tronco se podrían atribuir a que el tejido de la inflorescencia es más suave y permite una mejor maceración. Otra explicación para estos resultados radica en el hecho de que la inflorescencia está en crecimiento activo y puede contener una mayor concentración del fitoplasma, por lo tanto es más sensible que el floema de tronco, sin embargo Cordova Lara (2000) no encontró diferencias en el porcentaje de detección del fitoplasma causante del ALC entre tejidos de palmas AA. También se especula que la diferencia puede explicarse por que en este muestreo las palmas sólo fueron perforadas una sola vez, lo que puede dar falsos negativos ya que el fitoplasma no está distribuido uniformemente en el tronco (comunicación personal¹⁰). Cuando se usó "nested" PCR las diferencias se hicieron menos aparentes sólo hubo una diferencia de 3 %. Los porcentajes difirieron un poco por que se tomó diferente número de muestras de los tejidos (10 de inflorescencia frente a 12 de floema de tronco).

Los distintos resultados utilizando diferentes "primers" pueden ser debidos a la existencia de microorganismos contaminantes de superficie que pueden ser amplificados con P1/P7 ("primers" universal de la secuencia 16sRNA) y no con LYF1/LYR1 que es más específico para el patógeno. Las grandes diferencias entre "nested" PCR y los otros "primers" (P1/P7, LYF1/LYR1) se explican porque el "nested" PCR es más sensible que los otros "primers", lo que hizo que los porcentajes de detección, que en un principio eran mayores en inflorescencia que en floema de tronco, se acercaran.

La muestra 6 SLL 1 resultó positiva usando inflorescencia y negativa usando Floema de tronco, con ambos "primers". Esta muestra se tomó a los de 3 meses de ser tomada por Castillo y Aguilar, obteniendo los mismos resultados. Sin embargo hubo un retraso en la aparición de los síntomas ya que las dos veces la muestra cayó en la misma clasificación (6 en la escala internacional, Mckoy) y según Howard y Harries (1999) desde la aparición del primer síntoma hasta la muerte de la palma pasan de tres a nueve meses, Cuando el tiempo es mayor a este, se puede sospechar que es otra causa la muerte de la palma (Cuadro 14).

Cuadro 13: Resultados de laboratorio del primer muestreo realizado en la finca de Salado Lis lis. Jutiapa, Atlántida. Enero 28 de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	Nested-PCR
Floema de tronco	12	1	0	10
Inflorescencia	10	4	3	8

¹⁰ Oropeza, C. 2001. Distribución del fitoplasma del ALC en la planta de coco. La Ceiba, Honduras. CICY (entrevista)

Cuadro 14: Resultados obtenidos en una misma muestra tomada en dos épocas

<i>30 de octubre del 2000</i>							
Escala	Identificación	Síntomas			Observaciones	Resultados	
		Cocos	Inflorescencias	Hojas		P1/P7	LYR1/LYF1
6	5 SII 1 F	No hay	Necróticas	2/3 amarillas	Mapan	+	+
	5 SII 1 H					+	+
	5 SII 1 A					-	-
<i>28 de enero del 2001</i>							
6	6 SLL 1 F	Caídos	Secas	2-/3	7 años	+	+
	6 SLL 1 A			caídas	(5 SLL 1)	-	-

4.2 SEGUNDO MUESTREO (MAYO DE 2001)

4.2.1 Observaciones de campo

4.2.1.1 Salado Lis lis,

En esta visita se observó que la incidencia de los síntomas de amarillamiento y muerte de los híbridos fue más moderada con respecto a la visita anterior. Había mas plantas con amarillamientos que muertas. Esto pudo atribuirse a la llegada de la estación seca y la bajada del nivel freático, que ya no se encontraba por encima de la superficie. Según el ingeniero Molina los drenajes desalojaron gran cantidad del agua superficial y redujeron el porcentaje de plantas con síntomas y recuperándose la plantación en el periodo comprendido entre el primer muestreo y este. Cuando el nivel freático está en la superficie o cerca de ella causa el mismo efecto que los fitoplasmas pues no hay intercambio de fluidos por el cierre del floema, y la planta empieza a presentar un amarillamiento progresivo, se caen los cocos, se mueren las inflorescencias y al final la planta perezca por asfixia de las raíces.

En la plantación de Salado Lis lis la replantación se había hecho en la misma cuadrícula de la plantación de Alto de Atlántico. Si los cocoteros viejos murieron debido a otra causa biótica diferente al ALC, como hongos o bacterias, es muy posible que los troncos en descomposición sirvieran de inóculo de dichas enfermedades afectando a los híbridos (comunicación personal¹¹). Se debería profundizar en este aspecto investigando otros organismos fitopatógenos que puedan estar afectando una proporción de los híbridos.

¹¹ Harries, H. 2001. Causas de las altas mortalidades de los híbridos Mapan en Salado Lis lis. Jutiapa, Honduras. CYCI. (Entrevista).

4.2.2 Salado Barra

El ingeniero Ucles (encargado de la plantación) indicó que los híbridos Mapan presentaban alta mortalidad poco antes de entrar a la etapa reproductiva. Durante esta visita se encontró picudo del coco (*Rynchophorus palmarum*) y también al derribar algunas palmeras se encontró un anillo rojo circundando la parte interna del tronco del coco, se puede sospechar de nemátodos que son causa de una enfermedad de síntomas similares a los del ALC (Cuadro 3). Sin embargo no se puede afirmar que este problema sea causado por nematodo ya que en la visita realizada por Dollet (2000) no se encontró evidencia suficiente de la presencia del anillo rojo (*Rhadenaphelencus cocophilus*) en esta plantación. En general la plantación no estaba en muy buenas condiciones de manejo, incluso algunas plantas habían sido quemadas.

Durante este muestreo también se tomó una muestra del municipio de San Antonio la cual presentaba síntomas clásicos de ALC.

4.2.3 Resultados de laboratorio

En la plantación de Salado Lis lis se encontró un 18% de muestras positivas con los "primers" universales en tejido de inflorescencia inmadura y 0% usando tejido de floema de tronco. Para los "primers" específicos se encontró un 11% en inflorescencia y 0% en floema de tronco de muestras positivas. En cuanto al "nested" PCR se encontró un 59% de muestras positivas usando floema de tronco y 59% en inflorescencia inmadura (Cuadro 15).

La muestra 7 SII 35, en que además de tronco y flor se tomó hoja y palmito, resultó negativa para todos los tejidos muestreados con los "primers" universales para fitoplasmas (P1/P7) y específico para ALC (LYR1/LYF1), pero dió positivo para inflorescencia y palmito con estos mismos "primers". En la muestra 7 SII 61 se pudo recolectar el embrión y hacerle PCR; en esta muestra sólo el Floema de tronco salió positivo con "nested" PCR (Cuadro 15). Se recomienda evaluar los embriones con la técnica de *in situ* PCR, que ha detectado el fitoplasma causante del ALC en México (Jones, *et al*, 2001). En la enfermedad de la hoja pequeña de *Gliricidia* se ha encontrado ADN del fitoplasmas en las semillas (Campaña, 2000) es necesario conocer si esto ocurre también con la semilla de cocotero, para no traer material infectado de lugares con la epidemia a aquellos que están libres de ella.

Cuadro 15: Resultados del segundo muestreo en Salado lis- lis y Salado barra, con tres "primers" y cuatro tejidos. Mayo de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested"-PCR

Floema de tronco	18	0	0	11
Flor	17	3	2	11
Embrión	1	0	0	0
Hoja	2	0	0	1
Palmito	2	0	0	1

La muestra de Salado Barra no dió positivos para ningún tejido con los "primers" universal (P1/P7) y específico (LYR1/LYF1); con "nested"-PCR salieron positivas las muestras de hoja, floema de tronco y flor y negativa la de palmito. Es posible que por la alta concentración de ADN en la muestra del palmito se inhibió la amplificación del ADN del fitoplasma.

La diferencias entre los resultados con "nested" PCR y los demás iniciadores se debe a que el "nested" PCR es más sensible a bajas concentraciones del fitoplasma en la muestra que P1/P/ o LYF1/LYR1.

En la muestra de San Antonio se obtuvieron resultados positivos para ambos tejidos (inflorescencia y tronco), con P1/P7, pero negativos con LYF1/LYR1. Esta diferencia en los resultados podría deberse a que se trate de una variante del ALC clásico o a una contaminación de las muestras cuando se procesaron con P1/P7 como *Leuconostoc* (comunicación personal¹²).

4.3 TERCER MUESTREO (JUNIO DE 2001)

4.3.1 Observaciones de campo (Salado Lis lis)

En este muestreo se observó una incidencia igual que en el muestreo anterior de síntomas de amarillamiento y muerte de los híbridos. Así como el muestreo anterior éste se realizó durante la época seca, por consiguiente en la plantación había menos agua y las plantas en general se mostraban más recuperadas. Es por esto que las muestras recolectadas fueron 14 (7 por cada tejido) en 7 plantas que eran las más representativas de los sitios de muestreo.

Durante este muestreo se tomaron dos muestras de híbridos Mapan de Cosuna, Colón; estos híbridos estaban en la playa sin cuidado alguno. Uno de ellos se encontraba con síntomas avanzados y todavía no había entrado en producción; el otro estaba más desarrollado y mostraba síntomas medios.

¹² Harrison, N. Amplificación de secuencias no deseadas con los "primers" P1/P7. 2000. Florida, USA. Universidad de la Florida. (Correo electrónico).

4.3.2 Resultados de laboratorio

Se encontró un 28% de muestras positivas en tejido de inflorescencia para ambos iniciadores (P1/P7 y LYR1/LYF1) y 0% con floema de tronco, siguiendo con la tendencia de los muestreos anteriores (Cuadro 16). Esto puede explicarse por una baja concentración del fitoplasma en el tejido de tallo, insuficiente para ser amplificada. Una de las muestras positivas tenía inflorescencias normales pero nueces caídas lo que indica que los síntomas apenas comenzaban. Usando "nested" PCR se encontró positivo un 86% en floema de tronco y 58% en inflorescencia.

En Cosuna, Colón, una muestra resultó positiva con P1/P7 y ambas salieron negativas con los "primers" específicos para ALC. También pudo haber algún organismo contaminante que amplificara esta secuencia como *Leuconostoc sp*, el cual presenta una similitud con un fitoplasma del 99.2 % (comunicación personal¹³). Sin embargo, ambas muestras resultaron positivas con "nested" PCR, lo que pudo haber ocurrido es que la concentración del fitoplasma era demasiado baja en una de las muestras y no pudo ser amplificada con los "primers" universales, ni los específicos.

Cuadro 16: Resultados del tercer muestreo en Salado Lis lis. Jutiapa, Honduras. Junio de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested" PCR
Inflorescencia	7	2	2	6
Floema del tronco	7	0	0	4

4.4 CUARTO MUESTREO (AGOSTO DE 2001)

4.4.1 Observaciones de campo

¹³ Harrison, N. Amplificación de secuencias no deseadas con los "primers" P1/P7. 2000. Florida, USA. Universidad de la Florida. (Correo electrónico).

Se registró una incidencia de síntomas de amarillamiento y muerte un tanto menor en la plantación que en los muestreos anteriores, con severidades varias. Este muestreo se hizo en época lluviosa, aunque en la plantación no se registraron muchas inundaciones, lo que podría explicar el mejor estado de las plantas.

Durante este muestreo se presencié el proceso de cosecha y empaque de nueces de cocotero híbrido para la exportación. Durante este año se cosecharon 3,000 nueces por periodo (cuatro semanas), un 40% menos que en el año 2000. Esto pudo haberse debido al abandono de las prácticas de fertilización a partir del 2001.

4.4.2 Resultados de laboratorio

En este muestreo se registró un 18% de plantas con P1/P7 en tejido de inflorescencia y 20% en floema de tronco de tronco, un tanto menor que en muestreos anteriores. Con los "primers" específicos para el fitoplasma del ALC se encontró un 9 % con inflorescencia y un 6% en floema de tronco de tronco (Cuadro 17). Esta diferencia se puede explicar por la presencia de algún contaminante como en la muestra que se amplificó con P1/P7 y no con LYF1/LYR1 o por la presencia de una variante del ALC clásico. Se deberían analizar estas muestras con RFLP's y comparar los perfiles de restricción de estas con el ALC clásico y las variantes de los demás países. Se encontraron 54% en inflorescencia y 53% en floema de tronco de muestras positivas con "nested" PCR durante este muestreo. Una vez más la sensibilidad de "nested" PCR fue mayor que la de los otros dos "primers" (Cuadro 17).

Cuadro 17: Resultados del cuarto muestreo en la finca el Salado Lis lis. Agosto de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested" PCR
Inflorescencia	11	2	1	6
Floema de tronco	15	3	1	8

4.4.3 La Ensenada

Estas muestras se tomaron con el fin de seguir los estudios de Castillo (2001) y el equipo de ALC del Zamorano donde se encontró una variante al fitoplasma que causa el Amarillamiento Letal clásico. Las palmas muestreadas mostraban una combinación de síntomas diferente a los que originalmente se presentan en el Amarillamiento Letal clásico; presentaban un amarillamiento generalizado de las hojas y retenían las nueces

secas en la palma, contrario a la caída temprana de las nueces del Amarillamiento Letal clásico. Sólo una de las tres muestras (una sana y dos sintomáticas) fue positiva con los tres "primers" (P1/P7, "nested" PCR y LYR1/LYF1). Estas muestras se deben analizar con RFLP's y comparar sus perfiles de restricción con los obtenidos por Castillo y Aguilar (2001) en la muestra 2 ALC En 6, para ver si la variante del fitoplasma está activa en la población (Figura 12).

4.5 QUINTO MUESTREO (DICIEMBRE DE 2001)

4.5.1 Observaciones de campo (Salado Lis lis)

Se tomaron plantas con síntomas atípicos y que representaban una área con síntomas similares. La incidencia de amarillamiento y muerte de los híbridos fue moderada. Este muestreo se hizo en plena estación lluviosa y en algunos lugares la tabla de agua estaba cerca de la superficie o por encima de ésta (Figura 13).

Durante este muestreo también se viajó al Triunfo de la Cruz, Atlántida para evaluar y tomar muestras de híbridos Mapan de 2-5 años que mostraban un amarillamiento progresivo de todas sus hojas, con una incidencia de 10-20%.

Por primera vez se visitó una pequeña plantación de la SFC. cerca de Salado Barra, donde habían aproximadamente 600 plantas en 5 ha. Se tomaron 5 muestras de floema de tronco de plantas con síntomas; la incidencia de amarillamientos y muerte de las palmas era baja en comparación a Salado Lis lis. Estos híbridos estaban ubicados en una zona bastante inundable que se formaba a la salida del drenaje de la planta extractora de toronja de la compañía.



Figura 12: Palmas con síntomas diferentes al ALC clásico. Aunque tienen un amarillamiento avanzado todavía retienen las nueces en el árbol. Fuente: el Autor.

4.5.2 Resultados de laboratorio

Dos de las tres muestras resultaron positivas con los "primers" P1/P7 y LYF1/LYR1, mientras que con "nested" PCR las tres muestras fueron positivas. Una de las muestras (10 sll 100) tenía todavía un coco cuando las inflorescencias estaban ya necróticas y las hojas ya estaban empezándose a amarillear; a pesar de esta discrepancia en los síntomas esta muestra fue positiva con todos los "primers". En este caso puede que la planta muestre enfermedad a raíz de otra causa y que, aunque el fitoplasma este presente, la planta no está muriendo de ALC. También es posible que en la planta exista una variante del fitoplasma causante del ALC y su sintomatología sea atípica; esta muestra se debe analizar con RFLP's para comparar sus perfiles de restricción con los de los demás países y con los de las demás variantes del ALC clásico.

La muestra de Triunfo de la Cruz resultó negativa con "nested" PCR, P1/P7 y LYF1/LYR1. La enfermedad de estos híbridos puede deberse a otro factor biótico o abiótico como estrés nutricional o hídrico, pudrición del cogollo o anillo rojo.

Ninguna muestra resultó positiva con P1/P7, sólo una con LYF1/LYR1 y tres con "nested" PCR, la mortalidad en esta plantación puede deberse, en parte, a la alta humedad generada por el drenaje de la planta extractora y no al ALC. La presencia de una muestra positiva con LYF1/LYR1 y negativa con P1/P7 puede deberse a que la concentración del fitoplasma era muy baja y no se amplificó con P1/P7, los resultados de "nested" PCR confirman esta apreciación (Cuadro 18).

4.6 SEXTO MUESTREO (FEBRERO DE 2002)

4.6.1 Observaciones de campo (Salado Lis lis)

Durante este muestreo se apreció una incidencia media de amarillamientos y muerte de palmas. Se hizo con el fin de hacer una evaluación anual de los híbridos Mapan en esta plantación. Estaba terminando la época lluviosa, por lo que la plantación en general tenía gran cantidad de agua, aunque los drenajes construidos durante el año 2001 estaban funcionando bien.

Cuadro 18: Resultados del quinto muestreo en la finca del Salado Lis lis y en Cadecsa usando floema de tronco. Diciembre de 2001.

Lugar	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested" PCR
Salado Lis lis	3	2	3	3
Cadecsa	5	1	1	3

4.6.2 Resultados de laboratorio

En floema de tronco se encontró 0 % de muestras positivas usando P1/P7 y 3 % con LYF1/LYR1. En inflorescencia, con los "primers" universales y específicos, se encontró un 22% de muestras positivas. Con los "primers" Grupo-específicos ("nested" *PCR*) se encontró un 53 % con floema de tronco y 44 % con inflorescencia inmadura (Cuadro 19). Como el "nested" *PCR* es más sensible que los otros iniciadores, los porcentajes de detección, que en un principio eran mayores en flor que en floema de tronco, se acercaron. Los porcentajes difieren por que se tomaron diferente numero de muestras de los tejidos (9 de flor y 30 de tronco).

Se tomaron, además muestras en Triunfo de la Cruz de plantas con síntomas clásicos de ALC para comparar dos métodos de extracción a gran escala y la usada actualmente en el laboratorio. De estas muestras, ambas sintomáticas, la tomada en Enano Malayo Amarillo (EMA) fue positiva y la tomada en Alto del Atlántico fue negativa con los "primers" P1/P7 y LYR1/LYF1, pero ambas plantas fueron positivas usando "nested" *PCR*.

Con todos los iniciadores se presentaron diferencias en el porcentaje de detección dependiendo del tejido. Con P1/P7 y LYR1/LYF1 se encontró un positivo en inflorescencia y negativo en tronco dentro de una misma planta. Usando "nested" *PCR* en dos plantas se detectó el fitoplasma sólo en inflorescencia y en sólo una en floema de tronco de tronco (Cuadro 19).

Cuadro 19: Resultados del sexto muestreo en la plantación de Salado Lis lis. Febrero de 2002.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested"- <i>PCR</i>
Inflorescencia	9	1	1	4
Floema tronco	30	1	2	16
Con Ambos	9	0	0	2



Figura 13: Otras causas de la alta mortalidad en Salado Lis lis. Picudo del coco vector del anillo rojo (arr. izq), síntomas típicos de *P. palmivora* (abajo izq.) y exceso de humedad (der.).

4.7 CONCENTRACIONES

Cuando se compararon las concentraciones de ADN total en las muestras de inflorescencias versus las de tronco se encontró que estas fueron mayores estadísticamente en inflorescencias (379 ng/ml de diferencia en promedio) que en floema de tronco (94 % de confianza) (Anexo). Esta diferencia podría explicar porqué es mayor el porcentaje de detección en inflorescencia que en floema de tronco con los "primers" universales (P1/P7) y específicos (LYF1/LYR1). Hay que recordar que del ADN total solo una pequeña porción corresponde al ADN del fitoplasma, por esta razón la concentración inicial sí es importante.

Para solucionar esto se puede hacer extracciones a gran escala partiendo de 5 g de muestra en vez de 0.5 g aumentando la cantidad de ADN de la muestra. En este estudio se encontró, con un 93 % de confianza, que con la extracción a gran escala hubo mayor cantidad de ADN total (117 ng/ml más en promedio) que con la que normalmente se hace (1 g). Este estudio se realizó sólo en floema de tronco ya que en inflorescencia la concentración de ADN total no es un problema.

4.8 EVALUACION DE LAS PLANTAS MUESTREADAS ANTERIORMENTE EN SALADO LIS LIS

En la evaluación realizada en el tercer muestreo se encontraron ocho plantas que ya habían sido muestreadas, con los siguientes resultados :

- Dos muertas (en la Ensenada) (PCR positivas usando "nested" PCR)
- Una sana (PCR positiva usando "nested" PCR)
- Dos empezando síntomas (una PCR positiva y otra PCR negativa usando "nested" PCR)
- Dos con síntomas intermedios (ambas PCR positivas usando "nested" PCR)
- Una con síntomas avanzados (PCR positiva usando "nested" PCR)

En la evaluación realizada en el cuarto muestreo se encontraron 15 plantas que ya habían sido muestreadas. Con los siguientes resultados:

- Una muerta (PCR positiva usando "nested" PCR)
- Cinco sanas (tres PCR positivas y una PCR negativa usando "nested" PCR; una sin registro)
- Seis con síntomas avanzados (una PCR negativa y cinco PCR positivas usando "nested" PCR)
- Dos con síntomas intermedios (una PCR positiva y otra PCR negativa usando "nested" PCR)
- Una comenzando síntomas (PCR positiva usando "nested" PCR)

En la evaluación realizada en el quinto muestreo se encontraron 31 plantas que ya habían sido muestreadas obteniendo los siguientes resultados.

- 10 plantas muertas (4 habían sido PCR positivas usando "nested" PCR en otros muestreos).
- Cuatro plantas sanas (dos PCR negativas y dos PCR negativas usando "nested" PCR).
- Nueve plantas con síntomas avanzados (7-8, en la escala Mackoy). (Dos PCR negativas y siete PCR positivas usando "nested" PCR)
- Dos plantas con síntomas leves (PCR positivas usando "nested" PCR).
- Cuatro plantas con síntomas intermedios (tres PCR positivas y una negativa usando "nested" PCR)
- Dos plantas con síntomas atípicos.

A pesar de ser PCR positivas muchas plantas se mostraban asintomáticas, esto quiere decir que aunque esté el fitoplasma presente en la planta esta no manifiesta los síntomas o no es afectada; algunas de estas plantas habían mostrado síntomas de ALC en el pasado. También hubo plantas con síntomas avanzados o muertas que eran PCR negativas, esto puede ser debido a que hay otra causa afectando la planta, diferente al ALC (Anexo 5, figura 14).

Durante el sexto muestreo se realizó una visita al Triunfo de la Cruz para evaluar los híbridos que estaban muriendo hacía tres meses. La planta a la cual se le había tomado la muestra (negativa para ALC) estaba casi muerta. En su ápice tenía una pudrición avanzada, síntoma de *Phytophthora palmivora*. Los otros híbridos que estaban a su alrededor presentaban síntomas parecidos, registrándose un amarillamiento generalizado y una pudrición en el punto de crecimiento. La incidencia de estos síntomas era cercana al 90 % en severidades entre media y alta en plantas de 2-4 años. No se tomaron muestras para su diagnóstico en laboratorio por que tenían pudriciones muy avanzadas y no existían las condiciones para transportar las muestras.



Figura 14: muestras tomadas en anteriores viajes. "Nested" PCR positiva sana (izquierda), nested PCR positiva con síntomas primarios (derecha).

4.9 RESUMEN DE RESULTADOS

Haciendo un resumen se puede decir que a lo largo del estudio se obtuvo un 7.0 % de muestras positivas en Floema de tronco usando el grupo universal de los fitoplasmas (P1/P7), un 4.2% para el fitoplasma del ALC (LYF1/LYR1) y 59 % para el "primer" grupo-específico ("nested" PCR) (Cuadro 21).

Con inflorescencia se presentó un 21 % con los iniciadores universales, 16 % con los específicos para el ALC y 64 % con el iniciador grupo- específico (Cuadro 21).

La muestra de embrión sólo resultó positiva usando tejido de floema de tronco. Se podría apuntar a una transmisión del fitoplasma por medio de semilla de plantas infectadas, se debería diagnosticar los embriones de plantas infectadas con la técnica de PCR *in situ*. En hoja y palmito sólo se registró una muestra positiva, en cada uno, con el grupo general-específico.

Se encontró un porcentaje igual estadísticamente de detección con ambos tejidos cuando se usó "nested" PCR, lo que indica que las discrepancias entre tejido de inflorescencia y floema de tronco sólo se dieron cuando se usó P1/P7 y LYF1/LYR1. Esto es debido a que con "nested" PCR hay más sensibilidad y por tanto puede detectar concentraciones más bajas del fitoplasma en la planta y como las concentraciones de inflorescencia fueron mayores a las de floema de tronco, es muy posible que con los dos primeros "primers" se haya subestimado la cantidad de muestras positivas.

En cuanto incidencia de amarillamiento y muerte, se registró un promedio de 40% durante todo el estudio, siendo moderadamente alta; se puede decir que la incidencia durante el estudio fluctuó entre 35-45% de plantas muertas y con síntomas tipo amarillamiento.

Cuando se relacionó la severidad con el porcentaje de ALC en la plantación del Salado Lis lis con los porcentajes de plantas infectadas con el ALC, se encontró que era mayor con "nested" PCR y menor con P1/P7 y LYF1/LYR1, al reportado para los híbridos de un alto de Panamá con un Enano Malayo (20%) y a la sugerida por Illiworth, (1999). Esto indica que, aunque no todos los híbridos de la plantación de Salado Lis lis se están muriendo de ALC, sí hay un porcentaje mayor al esperado (20 %) de infectados con el fitoplasma según los resultados obtenidos con "nested" PCR (Cuadro 20). Sin embargo no se puede afirmar que esten muriendo a causa del fitoplasma causante del ALC hasta no relacionarlo con el desarrollo de los síntomas.

En estudios preliminares anteriores realizados por Castillo (2001) y Harrison (2000) los porcentajes de muestras positivas encontradas con P1/P7 y LYF1/LYR1 fueron mas bajos de lo esperado para los híbridos (20 %). Con los resultados de este estudio se confirmaron los resultados obtenidos por ellas, sin embargo al utilizar "nested" PCR se encontró que los porcentajes de plantas sintomáticas con fitoplasma eran más altos.

Cuadro 20: Resumen de las muestras tomadas durante todo el estudio en Salado Lis lis. Jutiapa, 2002.

Tejido	# de muestras	P1/P7	LYR1/LYF1	Nested-PCR
		Positivas		
Floema de tronco	85	8	4	54
Flor	57	14	10	33
Embrión	1	0	0	0
Hoja	2	0	0	1
Palmito	2	0	0	1

A través de los muestreos se notó una tendencia a mayor incidencia de amarillamiento y muerte de las palmas cuando las condiciones ambientales eran más adversas (lluvias). En cuanto al porcentaje de plantas positivas no parece haber tendencia alguna, además hay que tener en cuenta el número de muestras en cada uno de los muestreos, ya que las diferencias en el número hacen variar el porcentaje de detección del fitoplasma causante del ALC (Cuadro 21).

Cuadro 21: Porcentaje de muestras positivas con los tres "primers" a través de los muestreos en salado Lis lis.

Muestreo	% de positivos (Número de muestras)											
	P1/P7				LYR1/LYF1				"nested" PCR			
	Tronco		Inflorescencia		Tronco		Inflorescencia		Tronco		Inflorescencia	
Primer	9	(12)	40	(10)	0	(12)	30	(10)	83	(12)	80	(10)
Segundo	0	(18)	18	(17)	0	(18)	11	(17)	59	(18)	59	(17)
Tercero	0	(7)	28	(7)	0	(7)	25	(7)	86	(7)	58	(7)
Cuarto	20	(15)	18	(11)	6	(15)	9	(11)	54	(15)	53	(11)
Quinto	66	(3)		---- ²	100	(3)		---- ²	100	(3)		---- ²
Sexto	0	(30)	22	(9)	3	(30)	22	(9)	53	(30)	44	(9)
Total	7.0 c	(85)	21 b ¹	(57)	4.2 c	(8.5)	16 b	(57)	59 a	(85)	64 a	(57)

¹ Muestras con letras iguales no son significativas para alfa= 0.05.

² no se tomaron muestras.

5 CONCLUSIONES

La alta mortalidad de los híbridos Mapan en la plantación del Salado Lis lis no son debidas, en su totalidad, a la enfermedad del ALC, aunque el fitoplasma causante de esta enfermedad está presente en un porcentaje mayor al que se esperaría de los híbridos entre cocotero Alto de Panamá con Enano Malayo.

Algunas plantas muestran retrasos o anomalías en la aparición de los síntomas clásicos reportados para el ALC, aun cuando está presente el fitoplasma. Las causas de su muerte pueden deberse no sólo al ALC sino a otro factor abiótico o biótico, ya que la presencia del fitoplasma en la palma no significa que la planta este muriendo por su causa.

En muestras de inflorescencia hubo un mayor porcentaje de detección que en tronco cuando se utilizó P1/P7 y LYF1/LYR1. Los porcentajes son iguales cuando se usó "nested" PCR. "nested" PCR tiene más sensibilidad que P1/P7 y LYF1/LYR1 tanto en tejido de inflorescencia como en floema de tronco.

Hay más concentración de ADN total en las muestras de inflorescencia inmadura y en las que se extraen a gran escala.

6 RECOMENDACIONES

1. En lo posible se debe tomar muestras de varios tejidos de los híbridos, y analizarlos con los tres "primers", para obtener resultados más confiables.
2. Extraer ADN total usando extracción a gran escala y tejido de inflorescencia inmadura para aumentar las posibilidades de encontrar concentraciones del patógeno suficientes para el diagnóstico molecular.
3. Hacer una evaluación, anual por lo menos, de la plantación de Salado Lis lis, Salado Barra, Cadecca y demás lugares donde los híbridos están o vayan llegando a su etapa productiva. Esta evaluación deberá incluir: toma de muestras para diagnóstico de ALC y otras plagas y enfermedades del cocotero; evaluación del ambiente agroecológico de la zona y la evaluación del manejo agronómico de estas plantas, a fin de asegurar que el comportamiento de los híbridos sea el esperado.
4. Seguir con los estudios de variabilidad genética realizados por Castillo (2001) y el equipo de investigación ALC del Zamorano en Honduras, con el fin de detectar si hay variantes del fitoplasmas del ALC clásico y su correspondiente epidemiología.
5. Hacer un ensayo formal de resistencia que incluya variedades e híbridos resistentes, y variedades susceptibles al ALC, evaluando no sólo su resistencia al ALC sino también, su adaptación a las condiciones de la costa hondureña y su comportamiento agronómico.
6. Repetir este trabajo ubicando las plantas muestreadas con un método preciso y evaluar la evolución de la severidad en el tiempo; midiendo incidencia de los síntomas de amarillamiento en la plantación; evaluando las otras causas de la muerte y amarillamiento de los cocotereros y estandarizando la concentración inicial del tejido a macerarse.

7 BIBLIOGRAFIA

Agrios, G.N. 1995. Fitopatología. 2 ed. México D.F., Limusa. 838 p.

Ardon, M.; Doyle, M.; Bustamante, M. 2001. Estudio preliminar sobre la percepción del impacto socioeconómico del amarillamiento letal del cocotero en la costa caribe e islas de Honduras. El Zamorano, Honduras. 70 p.

Arellano, J.; Oropeza, C. 1995. Lethal Yellowing. *In* Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects. Ed. por C. Oropeza, F.W. Howard y G. R. Ashburner. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 1-15.

Been, B. 1995. Integrated pest management for the control of lethal yellowing: quarantine, cultural practices and optimal use of hybrids. *In* Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects. Ed. por C. Oropeza, F.W. Howard y G. R. Ashburner. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p.101-108.

Berlin, C. 2001. Coconuts Palms in Belice: Lethal Yellowing (en línea). Belice. Consultada el 3 de septiembre de 2001. Disponible en www.amberiscaye.com/cocopalms/ly.

Bustamante, M. 2000. Informe de la gira y curso sobre amarillamiento letal del coco. s. n. t.

Caritas (Honduras). 2000. Proyecto “ Salvemos el coco”, Replantación del cocotero en 22 comunidades del Departamento de Colón. Tegucigalpa, Honduras. 19 p.

Castaño-Zapata, J. 1994. Principios básicos de Fitopatología. 2 Ed. El Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. 538 p.

Castillo Lizardo, M. 2001. Estudio básico de la variabilidad genética del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 79 p.

Colantico. 2001. Venta de material genético proveniente de México (en línea). Visitada el 3 de septiembre de 2001. Disponible en <http://colatinco.com.mx/>.

- Córdova Lara, I. I. 2000. Estudio sobre la distribución intraplanta y dispersión del amarillamiento letal en el cocotero mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Maestro en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. C. Oropeza-Salín y G. R. Ashburner
- Dollet, M. 2000. Report on the mission to Honduras. Evaluation of various phytosanitary problems on coconut palms along the Atlantic coast affected by lethal yellowing. CIRAD. s.n.t.
- Doyle, M. 2001. Crisis research: managing lethal yellowing disease. *Biotechnology and development monitor*. # 45, p. 45.
- Doyle, M.; Bustamante, M.; Castillo, M.; Aguilar, E.; García, A.; Sabio, C. 2001. Proyecto de amarillamiento letal Zamorano/Prolansate: reporte final de progreso para COSUDE. El Zamorano, Honduras. 120 p.
- Doyle, M. 2002. Managing lethal yellowing in Honduras: current status and future perspectives. s.n. t.
- Eden-Green, S. J. 1997. History, World Distribution and Present Status of Lethal Yellowing-Like Diseases of Palms. *In* International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut, Elmina, Ghana, November 1995. Eds. S.J. Eden-Green and F. Ofori. Chatham, UK: Natural Resources Institute. s. p.
- Harries, H. 1999. A report on the coconut varieties in Honduras and the options for LYD rehabilitation. La Lima, Honduras, Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. s.p.
- Harries, H. 2000. Coconut. *In* Treecrop ecosystems. Ed. F. T. Last. s. n. t. 321-338 p.
- Harries, H. 2001. Resistencia del cocotero al ALC. *In* informe sobre el curso teórico practico sobre ALC. Ed. A. García y C. Sabio. s. n. t.
- Harrison Alvergue, B. 1999. Diagnóstico molecular y evaluación de la resistencia de los híbridos MAPAN al Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Anteproyecto de Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. s. p.
- Harrison, Alvergue, B. 2000. Diagnóstico molecular y evaluación de la resistencia de los híbridos MAPAN al Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 49 p.
- Harrison, N.; Oropeza, C. 1997. Recent studies on detection of Lethal Yellowing disease phytoplasmas in the Americas. *In* Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing - Like Diseases of Coconut, Elmina, Ghana, November 1995. Ed. S.J. Eden-Green y F. Ofori. Chatman, Reino Unido, Natural Resources Institute. p. 221 - 234.

- Howard, F. W. 1995. Lethal Yellowing vector studies. II Status of *Myndus crudus* host plant studies. *In* Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects. Ed. por C. Oropeza, F.W. Howard y G. R. Ashburner. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 59-63.
- Howard, F. W. 1999. evaluation of dicotyledonous herbaceous plants of *Myndus crudus* (Homoptera: auchenorrhyncha: cixiidae). Integrated Pest Manegement (E. E. U. U.). Marzo- abril 1999
- Howard, F. W.; Harrison, N.A. 1999. Lethal Yellowing of palms (en linea). Consultada 4 de marzo de 2001. Disponible en <http://www.fld.ufl.edu/lyfacts.htm>.
- Howard, F. W.; Norris, N. C.; Thomas, D. L. 1983. Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthoper, *Myndus crudus* (homoptera, Cixiidae). *Trop. Agric. (Trinidad.)*. 60: 168-171.
- Illingworth, R. 1999. El mejoramiento del cocotero para la resistencia la amarillamiento letal. Merida, México. Centro de Investigación Científica del Yucatán. 10 p.
- Illingworth, R. 2000. Citas sobre las ventajas de los cocos híbridos. s.n.t.
- Jones, P.; Doyle, M; Dollet, M.; Harrison, N.; Wayne, M. 2001. Report of a phytoplasma roundtable held in Varadero, Cuba, june 2001. s. n. t.
- Kahl, G.; Valadez, E. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. México D.F., México. Mundi prensa. 147 p.
- Kirkpatrick, B. C.; Harrison, N.; Lee I. M.; Neimark, H.; Sears, B. B. 1995. Isolation of mycoplasma - like organism DNA from plant and insect hosts. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, EE. UU. Academic Press. p. 105-117.
- Kreuzer, H.; Massey, A. 1996. Recombinant DNA and Biotechnology. Washington, EE.UU., ASM Press. 552 p. Laboratoy Manual. EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory. 545 p.
- Mariau, D.; Dery S. K.; Sangaré, A.; N'cho, Y. P.; Philippe, R. s. f. Cocunut lethal yellowing disease in Ghana and planting material tolerance. s.n t.
- Martínez Aguirre, S. 2000. Papel del ácido abscísico en el comportamiento estomático de palmas de *Cocos nucifera* afectadas por el amarillamiento letal. Maestro en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. J. Santamaría-Fernández y C. Oropeza-Salín.
- Red nacional del coco Wafaluma. 2001. Memoria de la décima reunión de la Red Wafaluma 23 y 24 de agosto en Ciriboya, Honduras. El Zamorano, Honduras. s. n. t.

- Micklos, D.; Freyer G. A. 1990. DNA Science: A first course in recombinant DNA technology. Carolina del Norte, EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 442 p.
- Morales Martínez, J. J. 1994. Estudio del sistema agrario en una comunidad garífuna de Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 90 p.
- Morales Martínez, J. J. 2001. Proyecto de amarillamiento letal Zamorano/Prolansate: informe de la evaluación del proyecto a 8 meses de ejecución. s. n. t.
- OIRSA. 2000. Amarillamiento letal del cocotero: plaga de las palmáceas. s. n. t. 23 p.
- Oropeza, C.; Córdova, I.; Narvaez, M.; Harrison, N. 2000. Instructivo para la toma de muestras de tronco para la detección de fitoplasmas en palmas. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). s.n.t.
- Oropeza, C. 2001. Importancia y usos del cocotero. *In* informe sobre el curso teórico practico sobre ALC. Ed. A. García y C. Sabio. s. n. t.
- Ranghage, A. 2001. Nuevas dimensiones de la industria forestal: recolección de cocos. Unasyuva (Italia) # 153.
- Razin, S.; Yogev, D. 1995. Restriction endonuclease analysis. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasma. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, E.E. U.U. Academic Press. p. 355 -368.
- Sánchez de Lorenzo, J. M. 1998. Los árboles en España (en línea). Visitada el 2 de noviembre de 2001. disponible en [Http://www.floraguide.es/arboles/Cocosnucifera.htm](http://www.floraguide.es/arboles/Cocosnucifera.htm).
- Seemüller, E.; Schneider, B. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied and environmental microbiology*. 60(9):3409–3412.
- Seemüller, E.; Schneider, B.; Smart, D. C.; Kirkpatrick, C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma - like organisms or phytoplasmas. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasma. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, E.E. U.U. Academic Press. p. 369 -380.
- Urbina, N. E. 1997. Plan de evaluación, control, capacitación y comunicación del amarillamiento letal del cocotero. Tegucigalpa, Honduras. Secretaria de Agricultura y Ganadería. 10 p.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 .Protocolos para la extracción de ADN

Reactivos

Buffer CTAB 1

2% CTAB
1.4M NaCl
20mM EDTA pH8
100 mM Tris – HCl pH8
1% PVP-40
0.2% β -mercaptoetanol

Disolver los reactivos excepto el β -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 β -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

Isopropanol

Etanol al 95 %

Etanol al 70%

70 ml etanol

30 ml agua destilada

Protocolo para la extracción de ADN Doyle & Doyle modificado por Harrison

1. Colocar en un mortero aproximadamente 1 g del tejido a extraer y agregar 600 µl 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 µl 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 interface.
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 µl de buffer TE alto en sal.
15. Añadir 250 µl 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 µl 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 µl de agua destilada estéril.
22. Almacenar a 4 °C.

8.1.1 Protocolo para la extracción a gran escala

1. Colocar en un mortero aproximadamente 5 g del tejido a extraer y agregar 6 ml de CTAB 1.
2. Agregar 0.5 g de arena de cuarzo ultra pura y macerar el tejido con un pistilo.
3. Transferir a un tubo de centrífuga de 45 ml.
4. Incubar a 65 C por 30 min.
5. Transferir 600 µl del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
6. Seguir con el paso 5 en adelante del método de extracción convencional (protocolo anterior)

8.1.2 Buffer TAE 50X

242.0 g de Tris base
57.1 ml de ácido acético glacial

100.0 ml de una solución de EDTA 0.5 M pH 8

8.2 Anexo 2. Protocolos para Reacción en Cadena de la Polimerasa

Buffer 10X para PCR

385 µl de agua desionizada, destilada y estéril

200 µl Tris (1M)

250 µl KCl (1 M)

50 µl gelatina (2%)

100 µl Tween 20 (5%)

15 µl MgCl₂ (1M)

1000 µl total

Preparar y usar durante el día de preparación, posteriormente descartar.

Dideoxinucleotidos 10 X (dNTP's)

760 µl de agua desionizada, destilada y estéril

10 µl de dATP (100 mM)

10 µl de dCTP (100 mM)

10 µl de dGTP (100 mM)

10 µl de dTTP (100 mM)

800 µl total

Ajustar a pH 7 con 0.5 µl de 1N NaOH

Iniciadores

1 µl de solución madre de 1 µg/µl

39 µl de agua desionizada, destilada y estéril

40 µl de solución 25 ng/µl

Reacción de PCR

33.8 µl de agua desionizada, destilada y estéril

5.0 µl de dNTP's 10X

2.0 µl de iniciador 1

2.0 µl de iniciador 2

5.0 µl de buffer de PCR 10X

0.2 µl *Taq* polimerasa (5u/µl)

2.0 µl de ADN muestra

50.0 µl total

8.2.1 Programas para el termociclador

Iniciadores universales P1 y P7, en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano

Primer ciclo	94 °C 2:00 min. 55 °C 1:20 seg. 72 °C 1:00 min.
28 ciclos	94 °C 0:30 seg. 55 °C 1:20 seg. 72 °C 2:00 min.
Ultimo ciclo	94 °C 0:30 seg. 55 °C 1:20 seg. 72 °C 8:00 min.

8.2.2 Iniciadores universales P1 y P7, programas en Fort Lauderdale

Primer ciclo	94 °C 2:00 min.
35 ciclos	94 °C 1:00 min. 55 °C 0:50 seg. 72 °C 2:00 min.
Ultimo ciclo	72 °C 8:00 min.

Iniciadores específicos LYR1 y LYF1 en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, hasta el 12 de Julio de 2001

Primer ciclo	94 °C 1:30 seg. 53 °C 0:50 seg. 72 °C 1:20 seg.
38 ciclos	94 °C 0:30 seg. 53 °C 0:50 seg. 72 °C 1:20 seg.
Ultimo ciclo	94 °C 0:30 seg. 53 °C 0:50 seg. 72 °C 8:40 seg.

Iniciadores específicos LYR1 y LYF1, en Fort Lauderdale

Primer ciclo 94 °C 1:30 seg.

40 ciclos 94 °C 0:30 seg.
53 °C 0:50 seg.
72 °C 1:20 seg.

Ultimo ciclo 72 °C 8:40 seg.

8.3 Anexo 3. Protocolos para la reamplificación (nPCR) de productos de P1/P7, usando los iniciadores grupo específicos LY16s y LY16s/23sr.

8.3.1 Mezcla para la reamplificación de producto de PCR

32.8 µl de agua desionizada, destilada y estéril
5.0 µl de dNTP's 10X
2.0 µl de iniciador 1
2.0 µl de iniciador 2
5.0 µl de buffer de PCR 10X
0.2 µl *Taq* polimerasa (5 U/µl)
3.0 µl de producto de PCR diluido (1:40 productos no visibles; 1:100 productos visibles)
50.0 µl total

8.3.2 Programa del termociclador para la reamplificación

Primer ciclo 94 °C 2:30 seg.

30 ciclos 94 °C 0:30 seg.
60 °C 0:50 seg.
72 °C 1:20 seg.

Ultimo ciclo 72 °C 8:40 seg.

8.3.3 Rehidratación de las PCR beads

24.0 µl de agua destilada estéril
0.5 µl de P1 (25 ng/µl)
0.5 µl de P7 (25 ng/µl)
25.0 µl total

De estos 25 μl , 12.5 μl se transvasaron a otro tubo de microcentrífuga, para usar media reacción. A cada una de las mitades de reacción se le agregó 1 μl de ADN, luego se cubrió cada tubo con una gota de aceite mineral estéril para PCR.

8.4 Anexo 4. Cuadro de salida del programa Minitab® para la comparación de concentraciones.

Paired T for Gran escala – Actual Lab.

	N	Mean (ng/ml)	StDev	SE Mean
Gran escala	8	202.6	144.1	50.9
Actual lab.	8	85.1	26.5	9.4
Diferencia	8	117.5	151.2	53.5

95% CI for mean difference: (-9.0, 244.0)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 2.20 P-Value = **0.064**

Paired T for inflorescencia - Floema de tronco

	N	Mean (ng/ml)	StDev	SE Mean
Inflorescencia	8	553	392	139
Floema de tronco	8	174	148	52
Diferencia	8	379	455	161

95% CI for mean difference: (-2, 760)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 2.36 P-Value = **0.051**

8.5 Anexo 5. Registro de las muestras evaluadas.

8.6 Anexo 6. Detalle de las muestras tomadas.

8.7 Anexo 7. Salida del programa estadístico SAS®

**ANALISIS DE DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR
TODOS LOS PRIMERS**

10:24 Thursday, April 11, 2002

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PRIMER	6	ESPA ESPF GESA GESF UNIA UNIF

Number of observations 33

ANALISIS DE DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR

10:24 Thursday, April 11, 2002

The GLM Procedure

Dependent Variable: PORPOS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	646.4701212	129.2940242	11.28	<.0001
Error	27	309.5753333	11.4657531		
Corrected Total	32	956.0454545			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PORPOS Mean
0.676192	63.56183	3.386112	5.327273

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PRIMER	5	646.4701212	129.2940242	11.28	<.0001

ANALISIS DE DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR
10:24 Thursday, April 11, 2002

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for PORPOS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 27
Error Mean Square 11.46575
Harmonic Mean of Cell Sizes 5.454545

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	4.2070711	5.0837796	5.6110322	5.9885496	6.2820923

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	PRIMER
A	12.800	5	GESF
A			
A	9.817	6	GESA
B	4.200	5	ESPF
B			
B	4.160	5	UNIF
B			
B	1.150	6	UNIA
B			
B	0.700	6	ESPA

PROBANDO SOLO ESPECIFICOS VSR UNIVERSALES EN FLOR Y FLOEMA DE TRONCO.

ANALISIS DE DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR
10:24 Thursday, April 11, 2002

The GLM Procedure

Dependent Variable: PORPOS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	58.4025455	19.4675152	7.70	0.0016
Error	18	45.4870000	2.5270556		
Corrected Total	21	103.8895455			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PORPOS Mean
0.562160	66.11110	1.589672	2.404545

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PRIMER	3	58.40254545	19.46751515	7.70	0.0016

20

ANALISIS DE DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR

10:24 Thursday, April 11, 2002

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for PORPOS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 18
 Error Mean Square 2.527056
 Harmonic Mean of Cell Sizes 5.454545

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3	4
Critical Range	2.0223353	2.456697	2.7205702

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	PRIMER
A	4.2000	5	ESPF
A			
A	4.1600	5	UNIF
B	1.1500	6	UNIA
B			
B	0.7000	6	ESPA

8.8 Anexo 8. Resumen de los resultados por muestreo.

Resultados de laboratorio del primer muestreo realizado en la finca de Salado Lis lis. Jutiapa, Atlántida. Enero 28 de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	Nested-PCR
Floema de tronco	12	1	0	10
Inflorescencia	10	4	3	8

Resultados del segundo muestreo en Salado lis- lis y Salado barra, con tres primers y cuatro tejidos. Mayo de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested"-PCR
Floema de tronco	18	0	0	11
Flor	17	3	2	11
Embrión	1	0	0	0
Hoja	2	0	0	1
Palmito	2	0	0	1

Resultados del tercer muestreo en Salado Lis lis. Jutiapa, Honduras. Junio de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested" PCR
Inflorescencia	7	2	2	6
Floema del tronco	7	0	0	4

Resultados del cuarto muestreo en la finca el Salado Lis lis. Agosto de 2001.

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested" PCR
Inflorescencia	11	2	1	6
Floema de tronco	15	3	1	8

Resultados del quinto muestreo en la finca del Salado Lis lis y en Cadeca. Diciembre de 2001.

Lugar	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested" PCR
Salado Lis lis	3	2	3	3

Cadecsa	5	1	1	3
---------	---	---	---	---

Resultados del sexto muestreo en la plantación de Salado Lis lis. Febrero de 2002

Tejido	# de muestras	Positivas		
		P1/P7	LYR1/LYF1	"nested"- PCR
Inflorescencia	9	1	1	4
Floema del tronco	30	1	2	16
Con Ambos	9	0	0	2