

**ESTUDIO BÁSICO DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA DEL FITOPLASMA CAUSANTE
DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL
COCOTERO EN HONDURAS**

Melissa Gissel Castillo Lizardo

**ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

Agosto, 2001

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**ESTUDIO BÁSICO DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA DEL FITOPLASMA CAUSANTE
DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL
COCOTERO EN HONDURAS**

**Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera
Agrónoma en el Grado Académico de Licenciatura.**

Presentado por

Melissa Gissel Castillo Lizardo

Zamorano, Honduras
Agosto, 2001

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos, siempre y cuando se cite la fuente. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Melissa Castillo

Zamorano, Honduras
Agosto, 2001

**ESTUDIO BÁSICO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL FITOPLASMA
CAUSANTE DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO EN
HONDURAS**

Presentado por

Melissa Gissel Castillo Lizardo

Aprobada:

M^a Mercedes Doyle, Ph. D.
Asesora Principal

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador de área temática

Elsa Barrientos, M. Sc.
Asesora

Jorge Ivan Restrepo, M. B. A.
Jefe de la Carrera de Ciencia
y Producción Agropecuaria

Mario Bustamante, M. Sc.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano

Pablo Paz, Ph. D.
Coordinador PIA

Keith Andrews, Ph. D.
Director General

DEDICATORIA

A Dios, por la manera inexplicable en que me guió hasta este camino.

A mis padres, por su paciencia y a mis hermanas, por su inocencia.

AGRADECIMIENTOS

A Xavito, por ser parte fundamental de este proyecto y de mi vida.

A mis asesores, María Mercedes Doyle, Elsa, Don Mario y Estela, por la infinita paciencia.

Al equipo del laboratorio Andrés, Lenin, Edith y Edwin, gracias por hacer de cada día una flor.

A **todo** el personal del D.P.V. (Lourdes, Alfredo, Antonio, Ing. Trabanino, Dr. Pitty, Ana, Sonia, Rosa, Maximino, Doña Maria, Julio, Werner, Octavio, Yeovanny, Dr. Cave, Julio, Ing. Cordero, Yamileth, Don Rafael, Silvia, Carolina, Eva.....), sin ustedes estos logros no serían posibles.

A mis amigos y asesores, Nigel, Monica, Hugh, Phil, Michel y Carlos, de ustedes aprendí más que de Amarillamiento Letal.

A mis compañeros (as) de estudio y amigos (as), Gaby Carias, Efraín, Gaby Garzón, Lic. Esperanza, Peter Doyle, Jaime Rojas, Bernarda, Shadia, Naún, Diana, Beatriz, Gaby Santos...!!, gracias por el constante apoyo y la sincera amistad.

A las personas, que no por ser menos importantes, si no por traición de la memoria o el desvelo se encuentran entrelineas.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco al gobierno de Honduras, por el financiamiento brindado para mis estudios del Programa de Ingeniería Agronómica.

Agradezco al fondo dotal de Zamorano y al gobierno de Honduras, por el financiamiento otorgado para mis estudios del Programa de Agrónomo.

A la Red Wafaluma, Standard Fruit Co., PROLANSATE, Caritas, NABIPLA, DICTA-SENASA, por la colaboración brindada para este proyecto de investigación.

RESUMEN

Castillo, Melissa. 2001. Estudio básico de la diversidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 80 p.

La costa norte de Honduras está atravesando por una severa epidemia de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), enfermedad causada por un fitoplasma y transmitida por el insecto vector *Myndus crudus*. Actualmente se realizan programas de rehabilitación de las zonas afectadas, replantando variedades resistentes como altos del Pacífico, enanos malayos e híbridos (Mapan y Maypan). En apoyo a estos programas, se estudió la diversidad genética del fitoplasma, usando un marcador molecular conocido como RFLP's, para entender mejor la epidemiología de la enfermedad y asesorar la toma de decisiones para los programas de replantación. Otros objetivos del estudio fueron evaluar los híbridos Mapan que han sido replantados para entender las limitantes y éxitos de los programas de replantación; optimizar el tejido (inflorescencia y/o aserrín) muestra para el diagnóstico en los híbridos Mapan; y adaptar el manual de muestreo publicado por el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). La evaluación del estado fitosanitario de los híbridos se realizó mediante visitas de campo y toma de muestras de palmas sintomáticas para su análisis por PCR o siembra en medios selectivos. En la plantación Salado Lis lis, se ha plantado una gran cantidad de híbridos Mapan que sufrieron una alta mortalidad de etiología desconocida, por lo que se tomaron muestras que fueron analizadas para ALC por PCR. Para adaptar el manual de muestreo se unificaron los criterios de la Universidad de Florida, el CICY y la experiencia de muestreo de Zamorano. Se optimizó la técnica de RFLP's, se analizaron 32 muestras y se encontró variabilidad genética en una muestra proveniente de Tela con respecto al ALC clásico de Florida. En los híbridos sintomáticos evaluados, sólo el 10% se encuentran infectados por ALC y el resto puede atribuirse a otras enfermedades o factores abióticos. En los híbridos Mapan existe mayor detección del fitoplasma usando las inflorescencias. Se adaptó el manual de muestreo a las necesidades de diagnóstico de los técnicos de la región.

Palabras claves: Enzimas de restricción, PCR, RFLP's, variedades resistentes.

Abelino Pitty, Ph. D.

NOTA DE PRENSA

Estudio básico de la diversidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras

Más del 90% de los cocoteros altos que se encuentran en el Litoral Atlántico hondureño, han sido afectados por una enfermedad conocida como Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC). La enfermedad es transmitida de un cocotero a otro por un insecto vector, y es causada por un organismo similar a una bacteria, conocido como fitoplasma. Las comunidades Garífunas, habitantes de la Costa Atlántica, empresas turísticas y la gente que se beneficia del coco, se han visto afectados desde 1995.

Hasta hace algunos meses, la replantación con variedades resistentes (enanos malayos, altos del pacífico e híbridos) era considerada la mejor opción para el manejo de la enfermedad a largo plazo. Sin embargo, Hugh Harries experto en ALC del Centro de Investigación Científica de Yucatán, comentó sobre el reciente rebrote de ALC en ciertas zonas de Jamaica, donde las variedades resistentes han sido afectadas.

El investigador se pregunta si dentro de las causas del rebrote se encuentra un nuevo tipo de fitoplasma, otros vectores o factores ambientales. Además, señaló que las repercusiones de este rebrote van más allá de Jamaica, y quizás el problema es regional y posiblemente global. En este caso, es necesario saber si otros países de la región afectados por el ALC como Belice, **Honduras** y México, deben continuar plantando las variedades **resistentes**.

En Honduras, con el objetivo de enfrentar este problema y encontrar soluciones viables, se formó la Red Nacional del Coco “Wafaluma”, (nuestro coco, en Garífuna), que agrupa a instituciones gubernamentales, privadas, educativas y ONG’s, entre ellas Zamorano.

A raíz de la nueva epidemia en Jamaica, Zamorano como miembro de la Red, inició una investigación para determinar si existe un tipo diferente de fitoplasma en Honduras, usando **RFLP’s** (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción), técnica muy útil para clasificar organismos similares a nivel genético.

Los análisis se realizaron en la Universidad de Florida en el Centro de Investigación y Educación de Fort Lauderdale, bajo la asesoría del Dr. Nigel Harrison y la colaboración de Monica Carpio y Estela Aguilar. En los resultados se encontró un fitoplasma diferente al del ALC clásico, en una muestra hondureña proveniente de La Ensenada, Tela, Atlántida.

Por ahora no es posible conocer el impacto biológico de este hallazgo, sin embargo, en otros grupos de fitoplasmas, diferencias tan pequeñas como las encontradas en esta investigación, causan grandes variaciones en cuanto al rango de hospederos, diversidad de vectores y severidad de la enfermedad.

De acuerdo a los resultados es necesario dar seguimiento a la investigación iniciada en la zona (La Ensenada), realizar observaciones de campo, recolectar insectos y muestras para nuevos análisis.

Licda. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Agradecimiento a patrocinadores	vi
Resumen	vii
Nota de prensa	viii
Contenido	x
Indice de cuadros	xiii
Indice de figuras.. ..	xiv
Indice de gráficas.....	xvi
Indice de anexos.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 Objetivo General.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 EL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)	4
2.1.1 Historia.....	4
2.1.2 Síntomas.....	4
2.1.3 Agente causal	5
2.1.4 Vector.....	7
2.1.5 Manejo de la enfermedad.....	7
2.2. EL MUESTREO	9
2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO	10
2.3.1 Extracción de ADN.....	10
2.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	10
2.3.3 Electroforesis	12
2.3.3.1 Geles de poliacrilamida.....	12
2.4 MARCADORES MOLECULARES	13
2.4.1 Endonucleasas de restricción	14
2.4.2 Caracterización molecular de los fitoplasmas.....	15
2.4.3 Uso de RFLP's para la caracterización molecular de fitoplasmas en México, Florida y Africa	15

3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 OPTIMIZACIÓN DEL USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA	17
3.1.1 Amplificación de ADN	17
3.1.2 Uso de enzimas de restricción (ER).....	17
3.1.3 Geles de poliacrilamida.....	17
3.2 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP'S), OBTENIDOS POR MEDIO DE LA DIGESTIÓN DEL ADN AISLADO DE FITOPLASMAS DE VARIAS REGIONES....	18
3.2.1 Lugares de muestreo	18
3.2.2 Nomenclatura de las muestras	19
3.2.3 Método de muestreo.....	19
3.2.4 Extracción de ADN.....	20
3.2.5 Electroforesis horizontal de ADN.....	20
3.2.6 Amplificación de ADN	20
3.2.7 Electroforesis horizontal	21
3.2.8 Selección de muestras	21
3.2.9 Enzimas de restricción utilizadas.....	21
3.2.10 Digestión de las muestras.....	22
3.2.11 Comparación de los perfiles de restricción en geles de poliacrilamida al 8%.....	23
3.3 MONITOREO DE LOS HÍBRIDOS MAPAN	24
3.3.1 Sitios visitados	24
3.3.2 Metodología de evaluación.....	24
3.3.3 Análisis realizados en el Centro de Diagnóstico.....	24
3.3.4 Análisis realizados en el laboratorio de diagnóstico molecular.....	25
3.4 OPTIMIZACIÓN DEL TEJIDO MUESTRA PARA LA DETECCIÓN DEL ALC EN LOS HÍBRIDOS MAPAN.....	25
3.4.1 Toma de muestras	25
3.5 ADAPTACIÓN DEL MANUAL DE MUESTREO DE COCOTERO PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL ALC	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 OPTIMIZACIÓN DEL USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA	27
4.2 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's), OBTENIDOS POR MEDIO DE LA DIGESTIÓN DEL ADN AISLADO DE FITOPLASMAS DE VARIAS REGIONES....	28
4.3 MONITOREO DE LOS HÍBRIDOS MAPAN	35

4.3.1 Roatán	35
4.3.2 La Ceiba	38
4.3.2.1 Salado – Lis Lis	38
4.3.2.2 Sambo Creek y Jutiapa (Caribbean Sands Resort)	41
4.3.3 Tela	42
4.3.3.1 Punta Sal	42
4.3.3.2 San Juan	42
4.3.4 Colón.....	43
4.3.4.1 San Antonio	43
4.4 OPTIMIZACIÓN DEL TEJIDO MUESTRA PARA LA DETECCIÓN DEL ALC EN LOS HÍBRIDOS MAPAN.....	44
4.5 ELABORACIÓN DEL MANUAL DE MUESTREO DE COCOTERO PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL ALC.....	46
5. CONCLUSIONES.....	48
6. RECOMENDACIONES.....	50
7. BIBLIOGRAFÍA.....	52
8. ANEXOS.....	56

INDICE DE CUADROS

1.	Iniciadores universales, grupo específicos y específicos para la detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.....	11
2.	Sitios de reconocimiento y fabricantes de las enzimas de restricción, usadas en la optimización del uso de endonucleasas de restricción en geles de poliacrilamida al 8%	18
3.	Información de las enzimas usadas en la caracterización molecular del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.....	22
4.	Muestras seleccionadas para la digestión con enzimas de restricción, de acuerdo a los resultados obtenidos de las amplificaciones con iniciadores universales y específicos, y reamplificaciones (nPCR) con iniciadores grupo específicos	29
5.	Reporte de los resultados obtenidos de las muestras recolectadas durante el primer muestreo en la isla de Roatán.....	37
6.	Reporte de los resultados obtenidos de las muestras recolectadas durante el sexto muestreo en la plantación de Salado Lis Lis.....	44

INDICE DE FIGURAS

1. Mapa de Honduras indicando zonas afectadas por el Amarillamiento Letal del Cocotero.....5
2. Fotografía mostrando la secuencia de síntomas característicos del Amarillamiento Letal del Cocotero. 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).....6
3. Especímenes de *Myndus crudus* recolectados y fotografiados en Fort Lauderdale Research and Education Center, Fl. EE.UU.....8
4. Mapa del gen 16/23S rARN, encontrado en los fitoplasmas15
5. Diagrama de flujo del proceso seguido para el análisis de los fragmentos polimórficos de restricción (RFLP's), obtenidos por medio de la digestión del ADN aislado de fitoplasmas de varias regiones.....23
6. Gel de poliacrilamida al 8%, mostrando los perfiles de restricción de la muestra 1 To ALC 1.5, obtenidos de la digestión con las enzimas *Eco* RI, *Pst* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Bam* HI, *Hinf* I y *Hind* III.....28
7. Geles de agarosa al 1%, mostrando los resultados de la amplificación con los iniciadores P1 y P7.....30
8. Geles de agarosa al 1%, mostrando los resultados de la reamplificación (nPCR) con los iniciadores LY16s y LY16/23sr.....30
9. Geles de poliacrilamida al 8% mostrando los perfiles de restricción obtenidos de la digestión de los productos de reamplificación con los iniciadores LY16s y LY16/23sr con las enzimas *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Dra* I, *Dde* I, *Msp* I y *Taq* I.....33
10. Gel de poliacrilamida al 8%, mostrando en una digestión con la enzima *Hinf* I, los operones del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en Florida34
11. Árbol filogenético de 62 fitoplasmas, representando a 15 grupos filogenéticos....36
12. Híbridos Mapan en Oskgood Key y en West Bay, Roatán.....37
13. Híbrido Mapan en Roatán, mostrando síntomas que concuerdan con la pudrición del cogollo (*Phytophthora* sp.).....38
14. Picudos del cocotero (*Radinaphelenchus cocophilus*), vectores del nemátodo (*Bursaphelenchus cocophilus*) causante de la enfermedad del anillo rojo,

	encontrados en enero del 2001, en una trampa en la finca Salado Lis Lis.....	40
15.	Condiciones de inundación en la finca de cocoteros híbridos Mapan, Salado Lis lis. Jutiapa, Atlántida, Enero 2001.....	40
16.	Híbridos Mapan entregados seis meses atrás, a los habitantes de la comunidad de San Juan, Tela.....	43

INDICE DE GRÁFICAS

1. Resultados del cuarto muestreo en la plantación Salado Lis Lis. Junio 2000.....39
2. Resultados del sexto muestreo de aserrín e inflorescencia en Salado Lis Lis. Enero 2001.....46

INDICE DE ANEXOS

1.	Preparación de reacciones de digestión con enzimas de restricción.....	56
2.	Protocolos para la preparación de geles de poliacrilamida al 8%.....	56
3.	Manual de muestreo.....	58
4.	Protocolos para la extracción de ADN.....	64
5.	Buffer TAE 50X.....	65
6.	Buffer de carga y escalera molecular <i>EcoRI/HindIII</i>	66
7.	Protocolos para Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	66
8.	Protocolos para la preparación de medios de cultivo para <i>Phytophthora</i> sp.	67
9.	Programas para el termociclador.....	68
10.	Protocolos para la reamplificación (nPCR) de productos de P1/P7, usando los iniciadores grupo específicos LY16s y LY16s/23sr.....	69
11.	Rehidratación de las PCR beads.....	70
12.	Secuencias y comparación de los operones del fitoplasma causante del ALC en Florida.....	70
13.	Detalle de los resultados del cuarto muestreo realizado en la plantación Salado Lis Lis.....	74
14.	Secuencia del contaminante amplificado por los iniciadores P1 y P7 en Fort Lauderdale Research and Education Center.....	77
15.	Glosario de términos.....	78

1. INTRODUCCIÓN

El Amarillamiento Letal es una enfermedad causada por un fitoplasma y transmitida por un vector (*Myndus crudus*), que afecta a más de 30 especies de palmas, dentro de las cuales se encuentra el cocotero (*Cocos nucifera*). Actualmente no se conoce ninguna cura, y la opción de manejo más viable, es la replantación con variedades resistentes entre las cuales se encuentran, enanos malayos, altos del pacífico e híbridos provenientes de Jamaica y Costa Rica. En Honduras, a raíz del primer reporte de la enfermedad en 1995, se ha comenzado un programa de replantación, que incluye dichas variedades.

En 1993 la Standard Fruit Co. previendo la llegada de la enfermedad, realizó una importación de híbridos Mapan desde Costa Rica, que fueron plantados en la plantación de Salado Lis lis, en Jutiapa. En 1998 la plantación fue afectada por el huracán Mitch, que causó que las plantas estuvieran sometidas a un exceso de agua durante aproximadamente seis meses. Posteriormente los híbridos presentaron un alto porcentaje de mortalidad, mostrando síntomas similares a los del amarillamiento letal, razón por la que han sido objeto de investigaciones por parte de Zamorano (Honduras) y sus colaboradores internacionales (Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY/ México, Universidad de Florida/Estados Unidos, CIRAD/Francia y Rothamstead Experimental Station/Inglaterra).

En 1995, Harrison y Oropeza reportaron el hallazgo, por medio del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism), de un fitoplasma, diferente al aislado clásico de Florida, asociado con cocoteros con síntomas atípicos en la costa pacífica mexicana (Tabasco). Esta nueva cepa causante de los “síndromes de amarillamiento del pacífico” constituye una amenaza latente para los cocoteros altos del pacífico del continente americano.

En el año 2000¹, Harries reportó en el CICY¹ que los brotes esporádicos de amarillamiento letal en Jamaica, con pérdidas altas entre los enanos malayos y los híbridos Maypan, que fueron reportados por Howard en 1987, se habían vuelto más serios en los últimos años. Brotes localizados de la enfermedad, se observaban casi tan serios como durante la epidemia, hace 30 años (Harries 2000)¹. Posterior a este mensaje, una gran cantidad de teorías y comentarios acerca de la(s) causa(s) de este rebrote han sido enviadas al CICY.

Reflexionando acerca de esta situación, Harries, 2000² envió el siguiente mensaje al CICY: “El reciente brote de ALC en Jamaica, que ha afectado a los enanos malayos y a los híbridos resistentes, tiene serias implicaciones:

✓ ¿ Existe una nueva cepa o una más virulenta del patógeno?

¹ CICY: Center for Information on Coconut Lethal Yellowing. Foro de discusión en internet.

- ✓ ¿ Existen otros vectores que podrían ser más eficientes que el *Myndus crudus*?
- ✓ ¿ Existen factores ambientales o económicos que estén contribuyendo al problema?
- ✓ ¿ Qué pueden hacer las instituciones y productores involucrados en los programas de rehabilitación?

Las implicaciones de estas preguntas van más allá de Jamaica, son problemas regionales y posiblemente globales. Por ejemplo, otros países de la región afectados por el ALC como Belice, **Honduras** y México, necesitan saber si deberían continuar plantando las variedades **resistentes** ”

En respuesta a este llamado, Zamorano inició un proyecto de investigación, dentro de cuyos objetivos se encuentra el estudio de la variabilidad genética del fitoplasma causante del amarillamiento letal en Honduras, a través de la técnica de RFLP's. La información obtenida por medio de esta herramienta, debe contribuir a entender los factores que pueden influenciar la epidemiología de la enfermedad, a mediano o largo plazo, en la población de cocoteros en Honduras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Estudiar la diversidad genética del patógeno causante del Amarillamiento Letal del Cocotero para entender mejor la epidemiología de la enfermedad en Honduras.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Optimizar la técnica de Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism, RFLP's), mediante el uso de endonucleasas (enzimas) de restricción en geles de poliacrilamida, en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano.
2. Realizar análisis de RFLP's de los aislamientos de ADN extraído de los fitoplasmas encontrados en palmas de cocotero en:
 - ✓ La Ceiba, Tela, Cayos Cochinos, Roatán, Trujillo y Choluteca,
 - ✓ Cocoteros altos del atlántico, altos del pacífico, híbridos y enanos malayos, y
 - ✓ Guatemala, México, Florida, Belice, Jamaica y Honduras.
 para extraer hipótesis, que contribuyan al entendimiento de la epidemiología de la enfermedad en Honduras.
3. Monitorear el comportamiento agronómico de los híbridos MAPAN, replantados en las zonas afectadas por el Amarillamiento Letal del Cocotero, en la costa norte de Honduras.

4. Optimizar el proceso de toma de muestras para diagnóstico del Amarillamiento Letal del Cocotero, para clarificar si en los híbridos MAPAN, las muestras de aserrín o de inflorescencia inmadura son las óptimas para la detección del fitoplasma causante de la enfermedad.
5. Adaptar el manual de muestreo para la detección del Amarillamiento Letal del Cocotero, publicado por el Centro de Investigación Científica de Yucatán, con el fin de obtener un manual apropiado, para apoyar a los técnicos involucrados en programas de lucha contra la enfermedad en Honduras y en otros países de la región.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)

2.1.1 Historia

Según Eden-Green (1995), los primeros casos de ALC fueron observados posiblemente en la isla del Gran Caimán en 1834; luego Fawcett y Ashby notaron la enfermedad en Jamaica, donde se le conocía con el nombre de “West End bud rot” y en Cuba fue Johnston quien describió la enfermedad bajo el nombre de “bud rot”.

En 1961 cuando la enfermedad comenzó a atacar la principal zona de producción de coco en Jamaica, se estimuló el inicio de la investigación por parte de la industria cocotera de Jamaica; en 1971 la enfermedad se diseminó en Florida y además se identificaron los fitoplasmas (en ese entonces conocidos como Organismos Similares a Micoplasmas) como los agentes causales de la enfermedad (Eden-Green,1995). La enfermedad también se encuentra distribuida en República Dominicana, Haití, Cuba, Jamaica, Florida y las Bahamas (Alvarado, s.f.). En 1982 la enfermedad fue confirmada en México (Barradas *et. al.*,s.f.).

En Belice, el ALC se detectó en 1992 y en Honduras en 1995 en la isla de Roatán. El diagnóstico visual fue confirmado durante la vista del Dr. Roger Ashburner, en diciembre de 1995, cuyas muestras fueron analizadas en el laboratorio del Dr. Harrison en la Universidad de Florida (Alvarado, s.f.).

En Honduras (figura 1), en 1996 se detectó en el Departamento de Colón y desde entonces se ha dispersado a los Departamentos de Atlántida, Islas de la Bahía y Cortés. Se prevé que llegará pronto a Gracias a Dios (Caritás de Honduras,2000; Roca de Doyle, 2000).

2.1.2 Síntomas

El primer síntoma visible del ALC, es la caída prematura de los cocos en todos los estados de desarrollo, el siguiente síntoma es la necrosis de las inflorescencias nuevas. Las primeras inflorescencias muestran necrosis parcial pero a medida que la enfermedad avanza la necrosis abarca mayor área de la inflorescencia (Arellano y Oropeza, 1995; Howard y Harrison, 1999). El amarillamiento de las frondas comienza en las hojas más viejas u hojas basales de la planta, luego el amarillamiento avanza en forma ascendente y finalmente las frondas se secan y caen dejando el tronco desnudo, lo que se conoce como poste telefónico (figura 2) (Arellano y Oropeza, 1995; Howard y Harrison, 1999).



Figura 1. Mapa de Honduras indicando zonas afectadas por el Amarillamiento Letal del Cocotero (www.maps.com, modificado por la autora).

Howard y Harrison (1999) indican que en Florida, la secuencia de síntomas, desde la caída de los cocos hasta la muerte de la planta, usualmente tarda de 3 - 6 meses. La rapidez con que se presenta esta secuencia es en sí un síntoma de la enfermedad.

2.1.3 Agente causal

Los estudios iniciales para encontrar el agente causal del ALC, investigaron sin éxito, hongos, bacterias, virus, nemátodos y factores abióticos (Arellano y Oropeza, 1995). En 1972, tres grupos de investigadores reportaron la ocurrencia de Organismos Similares a Micoplasmas (OSM) en el floema de plantas que mostraban síntomas de ALC (Arellano y Oropeza, 1995). Howard y Harrison (1999) indican que investigadores en varias instituciones han concurrido en la conclusión de que el agente causal del ALC es un fitoplasma, antes conocido como OSM, ya que este se encuentra consistentemente colonizando el floema de palmas con síntomas de ALC, y se encuentra ausente de estos tejidos en palmas saludables.

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. Entre las características comunes se encuentra su tamaño, no mucho mayor al de un virus, su falta de pared celular, la cual explica su insensibilidad a los antibióticos del grupo de las penicilinas y su susceptibilidad a las tetraciclinas.

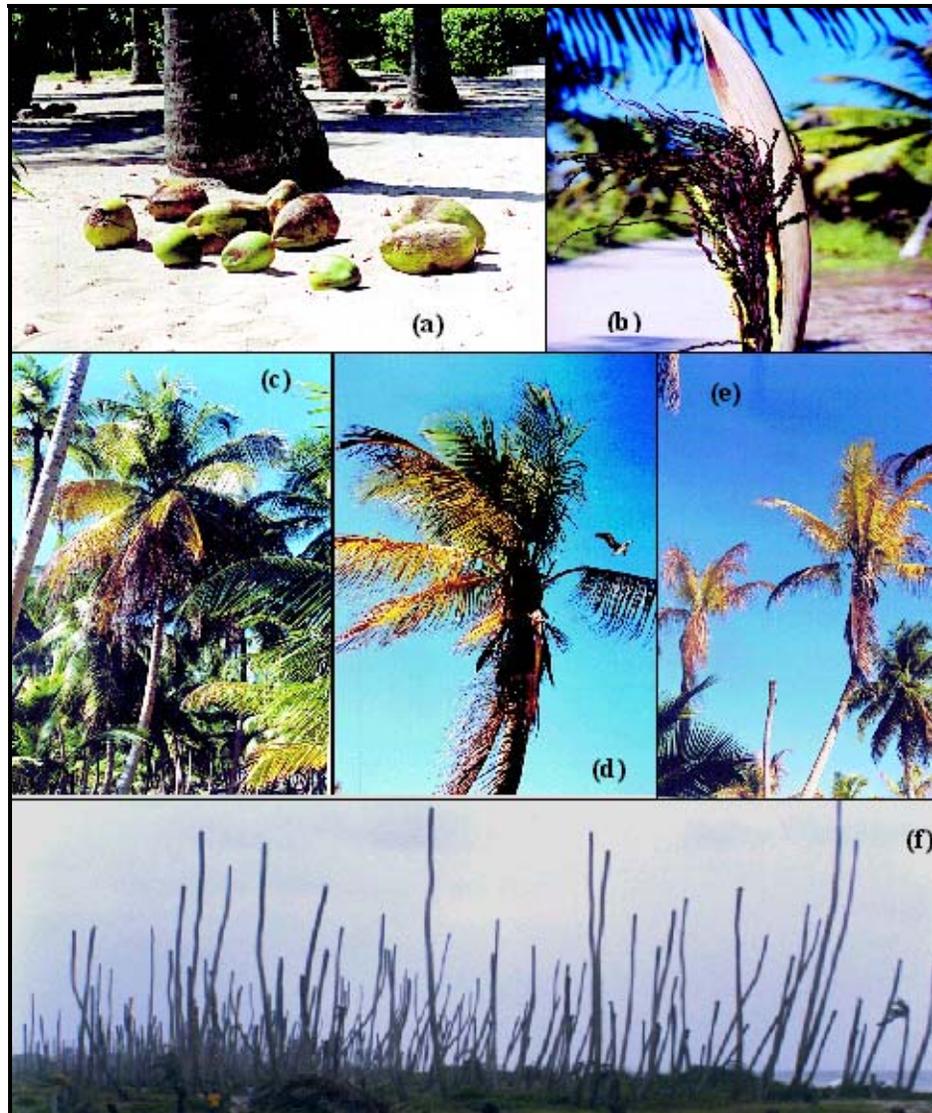


Figura 2. Fotografía mostrando la secuencia de síntomas característicos del Amarillamiento Letal del Cocotero. a) Caída de cocos de todos los tamaños; b) Necrosis de las inflorescencias; c), d) y e) Amarillamiento foliar ascendente; f) Muerte de la planta (poste telefónico). Fuente: M.M. Doyle.

Existe evidencia proveniente de estudios moleculares que ha demostrado que los OSM, son un grupo único de patógenos de plantas, bien diferenciados de los micoplasmas y de otros procariotes carentes de pared celular, por lo cual se conocen ahora con el nombre de fitoplasmas (Howard y Harrison, 1999).

Según Castaño – Zapata (1994), los fitoplasmas son organismos procariotes pertenecientes a la clase mollicutes, que poseen ciertas características que hacen que su estudio, diagnóstico y tratamiento, no se realice por los métodos convencionales. Entre estas características podemos enumerar:

- ✓ No crecen sobre medios de cultivo,
- ✓ No se han podido inocular en plantas sanas,
- ✓ Carecen de pared celular,
- ✓ Son parásitos obligados del floema de sus hospederos y de la hemolinfa de sus vectores (Agrios,1995).

Cada célula esta rodeada por una membrana trilaminar que contiene al citoplasma con fibras de ADN y ribosomas (Compendium of tropical fruit diseases, 1994; Agrios, 1995).

Los fitoplasmas son los procariotes auto - replicables más pequeños que se conocen hasta ahora y su genoma varia en tamaño de 500 a 1180 Kilobases (Kb), carecen de los genes para reparar su ADN, producir paredes celulares y algunos aminoácidos (Jones, 1999).

2.1.4 Vector

Según Howard (1995), el *Myndus crudus* Van Duzee parece ser el principal, si no el único vector del ALC en Florida.

Existen diversas razones que afirman que este insecto, del orden Homoptera, suborden Auchenorrhyncha y familia Cixidae, es el vector de la enfermedad:

1. Investigaciones de campo han demostrado que se alimenta de palmas susceptibles,
2. La distribución geográfica de áreas con alta incidencia de ALC, coincide con las zonas de altas poblaciones del insecto,
3. La supresión de poblaciones del insecto está asociada a un descenso en la dispersión de la enfermedad,
4. Bajo condiciones controladas, se ha logrado la transmisión del ALC a palmas expuestas al insecto, y
5. Pruebas basadas en ADN han mostrado que el insecto adquiere los fitoplasmas cuando se alimenta de palmas infectadas (Howard y Harrison,1999).

El *Myndus crudus* (Figura 3) tarda aproximadamente 52 días en pasar de huevo (11 días) a adulto (41 inmaduro) y vive como tal, unos 50 días². Este insecto tiene un comportamiento inusual, dentro del orden Homoptera, pues los estados inmaduros generalmente se desarrollan en la zona radicular de plantas herbáceas y los adultos viven en huéspedes arborescentes (Howard, 1995).

2.1.5 Manejo de la enfermedad

Hasta el momento no se ha encontrado una cura efectiva para la enfermedad del ALC; sin embargo se han identificado varias

² RAUDALES, S. T.; GÜITY, R. 1999. El insecto vector del Amarillamiento Letal del Cocotero. Tegucigalpa, Honduras, DICTA. (Comunicación Personal)

estrategias de manejo, aplicables en situaciones y momentos específicos, que pueden mitigar los efectos de la enfermedad, entre ellas tenemos:

- a) **Control genético.** La plantación de palmas resistentes es la **forma más eficiente y estable** de contrarrestar el ALC. Entre los ecotipos resistentes se incluyen los enanos malayos (rojo, verde y amarillo), enanos de ceylon, enanos de fiji, también los híbridos de Maypan o Mapan (enano malayo con alto de panamá) (Arellano y Oropeza, 1995; Diseases and disorders of ornamental palms, 1993; Howard y Harrison, 1999).

En el caso de Honduras, Harries (1999) recomienda la replantación con enanos malayos, como medida a corto plazo y la compra de híbridos resistentes Maypan de Jamaica y Mapan de Costa Rica. Illinworth (2000) indica que desde una perspectiva comercial, el híbrido presenta ciertas ventajas: precocidad, resistencia al ALC y alto rendimiento. Sin embargo, es necesario recordar que los híbridos son “resistentes” al ALC pero no a los otros patógenos que pueden atacar al cocotero y cuyos síntomas se pueden confundir con los del ALC. Entre ellos está la enfermedad del anillo rojo causada por el nemátodo *Bursaphelenchus cocophilus*, la pudrición del cogollo causada por *Phytophthora* sp. y la enfermedad de hartrot causada por *Phytophthora* sp. (Ortíz, 1999).

No se ha encontrado un solo caso de ALC en palmas nativas de Florida, Cuba, Jamaica, Haití o México, áreas donde el ALC ha sido epidémico, lo que significa que las palmas nativas también son una buena opción para la replantación ornamental de las áreas afectadas (Howard y Harrison, 1999).

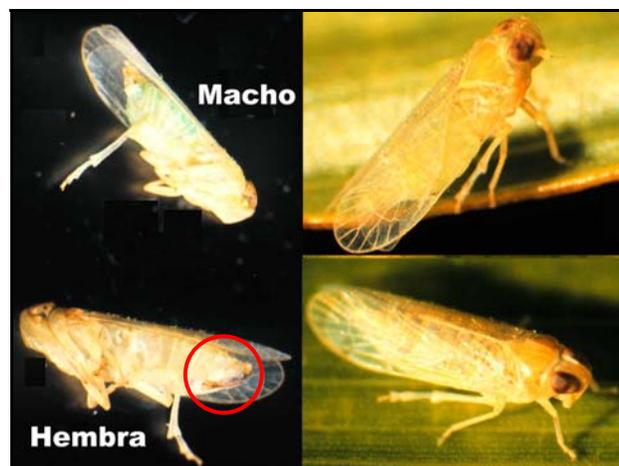


Figura 3. Especímenes de *Myndus crudus* recolectados y fotografiados en Fort Lauderdale Research and Education Center, Fl. EE.UU.

b) Manejo del vector. A pesar de que experimentalmente se ha demostrado que el control del vector por medio de insecticidas reduce la dispersión del ALC, la implementación de esta medida a gran escala sería extremadamente costosa, insegura para la salud de los habitantes de las zonas costeras, ambientalmente cuestionable y finalmente podría resultar en vectores resistentes a los insecticidas (Howard y Harrison, 1999).

Enemigos naturales, incluyendo parasitoides, depredadores y hongos, han sido identificados, sin embargo esta es un área que todavía necesita investigación (Howard y Harrison, 1999; Eden- Green, 1995).

Considerando que las ninfas de *M. crudus* se alimentan de las raíces de ciertos pastos, entre los cuales según Howard (1995) se encuentra el San Agustín (*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze) y el pasto guinea (*Panicum maximum* Jacquin), el control o sustitución de estos, puede ser una alternativa viable para la reducción de poblaciones del vector (Arellano y Oropeza, 1995; Howard y Harrison, 1999).

c) Quimioterapia. Se ha encontrado que los antibióticos del grupo de las tetraciclinas suprimen el desarrollo de los síntomas cuando son aplicados antes del amarillamiento foliar (Arellano y Oropeza, 1995). La dosis recomendada es de 0.5 a 20 g de hidrocloreuro de oxitetraciclina, la cual debe ser aplicada cada 4 meses (Agrios, 1995). Sin embargo, debido al alto costo del tratamiento y a riesgos potenciales a la salud, el uso de esta terapia se ha limitado a palmas ornamentales.

d) Control legal. El ALC una vez establecido, se dispersa rápidamente, ya sea radialmente o a saltos cubriendo así largas distancias para establecer nuevos sitios de infección. Sin embargo, la mayoría de los nuevos casos ocurren en un radio de 100 m del sitio de infección. Tomando en cuenta estas condiciones, la cuarentena de áreas infectadas, podría retardar la dispersión de la enfermedad (Arellano y Oropeza, 1995).

2.2. EL MUESTREO

Un análisis no puede ser más confiable que los datos con los cuales se hace. Por esto el primer paso para asegurar un diagnóstico molecular confiable es una adecuada toma de muestra.

Los tejidos que se usan como muestra para realizar el diagnóstico molecular del ALC incluyen ápice y aserrín del tallo, inflorescencias y hojas inmaduras (Oropeza *et. al.*, 2000). Sin embargo cada uno de estos tejidos presenta ciertas desventajas, la toma de muestra del ápice del tallo es destructiva, las de hoja inmadura e inflorescencia son difíciles de obtener cuando la palma

es muy alta, además de que las inflorescencias no están presentes en palmas jóvenes (Oropeza *et. al.*, 2000).

Las muestras de aserrín del tallo presentan una detección del fitoplasma cercana al 100% y son relativamente fáciles de tomar y conservar (Oropeza *et. al.*, 2000). Sin embargo, Harrison B. (2000) encontró ciertas discrepancias en la detección del fitoplasma entre inflorescencia y aserrín del mismo cocotero en híbridos Mapan en la finca de la Standard Fruit Company, Salado – Lis Lis.

2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

Debido a las características especiales de los fitoplasmas, una de las formas más confiables de diagnóstico del ALC, es el diagnóstico molecular. Este se basa en tres pasos básicos: la extracción de ADN, la amplificación del mismo y finalmente la visualización por medio de electroforesis.

2.3.1 Extracción de ADN

El primer paso para el diagnóstico molecular del ALC es la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del tejido muestra. Este ADN conocido como ADN total, incluye el ADN de la planta y del fitoplasma, en el caso de que esté presente en la muestra.

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

La extracción de ADN esta basada en centrifugación diferencial. Primero se maceran las muestras para liberar el contenido celular, luego el extracto se somete a varios pasos de centrifugación y lavado, para finalmente formar un precipitado de ADN que se resuspende en una pequeña cantidad de agua destilada estéril, para su posterior amplificación por

medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa **PCR**, por sus siglas en inglés (Kirkpatrick *et. al.*, 1995; Micklos y Freyer, 1990).

2.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Según Kreuzer y Massey (1996), “el PCR es una técnica simple que combina síntesis de ADN *In vitro* por medio de la ADN polimerasa e hibridación”. Esta fue introducida en la biología moderna en 1985 por el científico Kary Mullis (Kreuzer y Massey, 1996).

El PCR nos permite sintetizar una gran cantidad de cadenas de ADN, partiendo tan solo de una cadena modelo, dos iniciadores, ADN polimerasa y nucleótidos libres (Kreuzer y Massey, 1996). 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).

Según Jackson *et.al.*,1991, problemas con la sensibilidad del PCR se dan cuando se trata con huéspedes leñosos de fitoplasmas, los cuales contienen bajas concentraciones del ADN muestra, esto es confirmado por Gundersen y Lee, 1996; usando PCR anidado (nPCR), se puede mejorar la sensibilidad y especificidad de la amplificación (Jackson *et.al.*,1991).

El proceso requiere de dos amplificaciones consecutivas, en la primera se usan un par de iniciadores y en la segunda otro par de iniciadores cuyo sitio de ligamiento se encuentra dentro de la secuencia amplificada por el primer par de iniciadores, es decir que el fragmento amplificado en la primera amplificación se usa como muestra para la segunda amplificación (Jackson *et.al.*,1991).

Los iniciadores, son pequeños fragmentos de ADN de una sola cadena, que típicamente constan de 16 a 20 nucleótidos (Kreuzer y Massey, 1996). Los iniciadores son complementarios a la cadena de ADN que se desea amplificar, por lo tanto son los responsables de la especificidad del PCR (Kreuzer y Massey, 1996).

En el caso del ALC se han diseñado varios pares de iniciadores, cuyas secuencias se encuentran en el cuadro 1. Algunos conocidos como iniciadores universales, los cuales amplifican ADN de un amplio rango de fitoplasmas, tanto en plantas como en insectos vectores (Schneider *et. al.*1995). Otros grupo específicos, que amplifican ADN extraído de los fitoplasmas clasificados filogenéticamente como “grupo de amarillamiento letal”, y finalmente unos específicos que amplifican únicamente al fitoplasma causal del ALC clásico³.

En cuanto a los iniciadores universales, Gunderson y Lee (1996) refieren que debido a la amplitud de la sección amplificada, existe la posibilidad de amplificar secuencias que no pertenecen a los fitoplasmas. Como ejemplo de esto, el Dr. Harrison⁴ ha detectado la

³ HARRISON, N. 2000. Iniciadores para la detección del fitoplasma causante del ALC. Florida, EE.UU., Universidad de Florida. (Comunicación Personal).

⁴ HARRISON, N. 2000. Amplificación de secuencias no deseadas con los iniciadores P1 y P7. Florida, EE.UU., Universidad de Florida. (Correo electrónico).

amplificación de un organismo diferente a un fitoplasma, el cual al ser secuenciado y comparado con las secuencias existentes en Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov), presenta una homología de 99.2% con un bacilo llamado *Leuconostoc* sp.

Cuadro 1. Iniciadores 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: Schneider (1995), Harrison y Oropeza (1997), & Secuencia proporcionada por Nigel Harrison, Universidad de Florida.

2.3.3 Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite la separación de fragmentos de ADN de acuerdo a su tamaño y peso molecular. La distancia de migración de un fragmento de ADN es inversamente proporcional a su peso (Kreuzer y Massey, 1996). Ésta técnica esta basada en el principio de que el ADN por ser un ácido orgánico tiene carga negativa, por lo tanto cuando se coloca en un campo eléctrico, es atraído hacia el polo positivo (Micklos y Freyer, 1990).

Kreuzer y Massey (1996), refieren que el ADN en estudio se coloca en un soporte semisólido, que puede ser una gel de agarosa o poliacrilamida a través de cuyos poros el ADN migra desde el polo negativo hacia el polo positivo, los fragmentos más pequeños migrarán más rápidamente que los grandes, lo cual permite la separación de las moléculas de ADN.

El tamaño de los poros esta determinado por la concentración de la agarosa o de la poliacrilamida, por lo tanto si se desea separar fragmentos pequeños de ADN se usa una concentración alta de agarosa (Kreuzer y Massey, 1996).

2.3.3.1 Geles de poliacrilamida

Según Kreuzer y Massey (1996), la poliacrilamida es un polímero de acrilamida que se mezcla con bisacrilamida y un catalizador para preparar una gel, la cual se corre verticalmente.

Las geles de poliacrilamida se usan para análisis de proteínas, secuenciación de ADN, huellas digitales de ADN, polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's), entre otros (Kreuzer y Massey, 1996; CIAT, 1995).

La poliacrilamida forma poros más pequeños que la agarosa, por lo tanto tiene la capacidad de separar fragmentos muy pequeños de ADN, además tiene una mejor resolución que la agarosa, lo que implica que es capaz de separar fragmentos de ADN que difieren muy poco en su peso molecular (Kreuzer y Massey, 1996).

Los perfiles de restricción obtenidos de la digestión de productos de PCR, se aprecian mejor en geles de poliacrilamida, debido a su mayor poder de resolución, que nos permite visualizar fragmentos muy pequeños que pasarían desapercibidos en una gel de agarosa. Por esto, para trabajos de investigación con enzimas de restricción, los productos de digestión se corren en geles de poliacrilamida⁵.

En las geles de poliacrilamida, el persulfato de amonio provee los radicales libres que causan la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida, y el TEMED cataliza la formación de estos radicales libres, catalizando así la polimerización de la gel (Maniatis *et. al*, 1998).

En el caso de trabajo con enzimas de restricción en ADN amplificado del fitoplasma causante del ALC, el Dr. Harrison recomienda que debido al tamaño de los fragmentos obtenidos de la digestión, debe trabajarse en geles de poliacrilamida al 8%.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

"Los marcadores moleculares son una herramienta para el análisis genómico, con los cuales se busca identificar y medir la variabilidad genética de un organismo...." (Aranda, 2000).

Los marcadores basados en el ADN, se pueden reunir en tres categorías:

- ✓ RFLP's (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism/
Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción),

⁵ HARRISON, N. 2000. Uso de geles de poliacrilamida. Florida, EE. UU., Universidad de Florida. (Comunicación Personal)

- ✓ MAAP (**M**ultiple **A**rbitrary **A**mplicon **P**rofilin**g**/Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación) y
- ✓ STS (**S**equence **T**agged **S**ite/ Sitios etiquetados por la secuencia) o SSLP (**S**imple **S**equence **L**ength **P**olymorphism/ Polimorfismos de longitud en las secuencias discretas) (Claros, 2000; Van Eck, 1999).

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 Yogev, 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 Yogev, 1995). A pesar de que con RFLP's, solo se evalúa un tipo de polimorfismo por ensayo, los resultados son muy precisos (Moctezuma y Kahl, 2000).

Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling, MAAP), este término agrupa todas las técnicas que usan oligonucleótidos aleatorios para generar huellas dactilares complejas (Claros, 2000).

ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), es una amplificación aleatoria de una región de ADN que presenta polimorfismos; se basa en el uso de un solo iniciador que tiene una secuencia al azar, 60 - 70% de contenido CG y una longitud de 10 bases (RFLP, PCR y estructura de genes procarióticos y eucarióticos, 2001).

Esta técnica se usa para la catalogación de frutos, selección de variedades y diferenciación de líneas clonales (Moctezuma y Kahl, 2000).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP), esta técnica es equivalente en aplicación a los RAPD's, pero es más compleja, exacta y reproducible (RFLP, PCR y estructura de genes procarióticos y eucarióticos, 2001). La técnica combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, se corta el ADN con dos enzimas de restricción y a los fragmentos se les ligan oligonucleótidos compatibles con las enzimas usadas, luego se amplifica por PCR (Claros, 2000). Los resultados de AFLP's generan muchos fragmentos en una sola reacción, por lo tanto deben resolverse en geles de poliacrilamida (Claros, 2000).

Sitios etiquetados por la secuencia (Sequence Tagged Site, STS) o Polimorfismos de longitud en las secuencias discretas (Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP) esta técnica aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR, combina la rapidez de los RAPD con la especificidad de los RFLP (Claros, 2000). De ella se han derivado varias técnicas, algunas de las cuales se explican a continuación:

Repetición de secuencias discretas (Microsatellites/ Microsatelites, Simple Sequence Repeats/SSR, Inter-Simple Sequence Repeat amplification/ ISSR y Random Amplified Multiple Polymorphisms/ RAMP), los microsatélites son secuencias de 2 a 10 bases, repetidas en serie a través del genoma (Moctezuma y Kahl, 2000). Claros (2000), refiere que este ADN es muy polimórfico, y se ha usado como marcador molecular cuando el microsatélite se clona y secuencian, para ser usado en el análisis de poblaciones, actualmente se ha usado para el análisis de poblaciones de árboles.

Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas (Sequence Characterized Amplified Regions, SCARS), esta técnica aprovecha los fragmentos de ADN altamente repetido, producido por los RAPD, estos fragmentos se clonan y secuencian para elaborar oligonucleótidos específicos (Claros, 2000). A pesar de que permiten el

desarrollo rápido de marcadores, el grado de polimorfismo es bastante bajo (Claros, 2000).

2.4.1 Endonucleasas de restricción

Las enzimas o endonucleasas de restricción (ER) son miembros de una clase de endonucleasas, que tienen la propiedad de romper los enlaces que unen nucleótidos consecutivos en una cadena de ADN o ARN (Kreuzer y Massey, 1996).

Existen tres tipos de ER, los tipos I y tipo III presentan actividad de restricción (corte) y modificación del ADN muestra, mientras que las de tipo II solamente tienen actividad de restricción y además cortan en sitios específicos los ácidos nucleicos, por lo tanto son las usadas en estudios de restricción de ADN (Micklos y Freyer, 1990).

Para evitar confusiones, existe una nomenclatura para las ER. La primera letra (mayúscula) es la inicial del género del microorganismo del cual se extrajo la ER, la segunda y tercera letras provienen de la especie del microorganismo; por ser parte de un nombre científico se escriben en letras de tipo itálicas (Stryer, 1995). De existir una cuarta letra, esta indica una raza del microorganismo y finalmente un número romano indica el orden de descubrimiento y síntesis de la ER del mismo microorganismo (Stryer, 1995). Por ejemplo, *Eco* RI (*Escherichia coli* RY13, primera ER sintetizada).

2.4.2 Caracterización molecular de los fitoplasmas

Dos marcadores evolutivos han sido usados para la clasificación taxonómica de los fitoplasmas, el gen 16s ARN ribosomal (rARN) y la región espaciadora, que separa el gen 16SrARN del 23SrRNA (figura 4) (Schneider, *et. al.* 1995). Para caracterizar estos genes se han usado dos técnicas, los Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) y el análisis de la secuenciación del gen 16SrARN del fitoplasma (Schneider, *et. al.* 1995; Lee, *et. al.*, 1993). Sin embargo, en el laboratorio molecular de Zamorano, no se tiene capacidad de secuenciación, por lo tanto solo se realizó la primera parte del análisis (RFLP's). Si los perfiles de restricción obtenidos son idénticos, entonces el fitoplasma puede ser clasificado por RFLP's, en el caso contrario, será necesario el análisis de secuenciación para determinar la posición taxonómica apropiada para la nueva raza (Schneider, *et. al.* 1995).



Figura 4. Mapa del gen 16/23S rARN, encontrado en los fitoplasmas (Schneider, *et. al.* 1995).

2.4.3 Uso de RFLP's para la caracterización molecular de fitoplasmas en México, Florida y Africa

Haciendo uso de la técnica de RFLP's, con la enzima *Alu I*, Harrison y Oropeza (1997), encontraron diferencias entre los fitoplasmas aislados de muestras provenientes de Florida y muestras provenientes de la costa pacífica mexicana, en el estado de Tabasco. El aislado mexicano fue extraído de cocoteros que presentaban síntomas atípicos de ALC. Posterior al análisis por RFLP's, se realizó la secuenciación del producto amplificado con los iniciadores P1 y P7 del aislado mexicano, encontrándose una homología de 97% entre ambos fitoplasmas (Harrison y Oropeza, 1997).

Jones (1999), reporta que usando PCR y RFLP's, se encontró que el fitoplasma causante de la enfermedad letal en cocoteros en Tanzania (Lethal Disease), es diferente del fitoplasma que causa el ALC en América, lo cual puede ayudar a explicar las diferencias epidemiológicas observadas.

Las ER que el Dr. Harrison recomienda para la elaboración de perfiles de restricción del fitoplasma causante del ALC son: ***Alu I, Hae III, Hinf I, Dra I, Dde I, Msp I y Taq I***⁶. Esto debido a que son enzimas con las cuales se han realizado trabajos previos de RFLP's en fitoplasmas y con ellas se ha realizado parte de la clasificación taxonómica de los mismos (Harrison y Oropeza, 1997; Lee *et. al.*, 1998).

El producto de PCR que se usa para la digestión con enzimas de restricción, es el obtenido con los iniciadores P1 y P7 o anidado (nPCR) con LY16s y LY16s/23sr, debido a que Schneider *et. al.*(1995) indican que este par de iniciadores amplifican un fragmento relativamente grande del genoma del fitoplasma (1.8 y 1.7 Kb respectivamente), lo cual incrementa las posibilidades de corte de las ER.

⁶ HARRISON, N. 2001. Enzimas de restricción para la caracterización del fitoplasma causante del ALC. Florida, EE.UU., Universidad de Florida (Correo electrónico).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

3.1.1 Amplificación de ADN

Para la amplificación de ADN se usaron “PCR beads Ready to Go ®” (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.),⁷ las que se diluyeron de acuerdo al protocolo presentado en el anexo 11. Los iniciadores usados para la amplificación fueron los universales P1 y P7.

3.1.2 Uso de enzimas de restricción (ER)

Para optimizar el uso de enzimas de restricción se usó el protocolo del fabricante (cuadro 2), que viene acompañando cada enzima al momento de su compra, con el cual no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por esto se usó el protocolo desarrollado por el Dr. Harrison en la Universidad de Florida (anexo 1).

3.1.3 Geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% (anexo 2), usando como base una solución al 30% de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 y como catalizador el TEMED y una solución al 1% de persulfato de amonio.

Se vertió la solución entre dos vidrios para electroforesis vertical usando un espaciador de 1.5 mm. Se colocó el peine y se dejó polimerizar durante aproximadamente una hora. Se retiró el peine y se lavaron las celdas formadas con buffer TBE 1X. Se retiró el espaciador inferior y se expulsaron todas las burbujas formadas. Se hizo una pre-corrida de la gel durante 30 min. a 250 v.

⁷ PCR beads: Perla que contiene *Taq* polimerasa liofilizada, Cloruro de magnesio, Cloruro de potasio, Tris HCl pH 9 y Nucleótidos para el PCR.

Se cargaron las geles usando puntas planas, con 10µl del producto de la digestión de las ER más 2µl de buffer de carga, estas se corrieron en TBE 1X, a 250 v. Como escalera molecular se uso, 1 Kb DNA ladder (GibcoBRL®) preparada según el protocolo presentado en el anexo 2.

Cuadro 2. Sitios de reconocimiento y fabricantes de las enzimas de restricción, usadas en la optimización del uso de endonucleasas de restricción en geles de poliacrilamida al 8%.

Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento	Fabricante
<i>Alu</i> I	5' AG/CT 3' 3' TC/GA 5'	GibcoBRL
<i>Bam</i> H I	5' G/GATC C 3' 3' C CTAG/G 5'	GibcoBRL
<i>Eco</i> RI	5' G/AATT C 3' 3' C TTAA/G 5'	Promega
<i>Hind</i> III	5' A/AGCT T 3' 3' T TCGA/A 5'	Promega
<i>Hinf</i> I	5' G/ ANT C 3' 3' C TNA / G 5'	GibcoBRL
<i>Pst</i> I	5' C/ TGCA C 3' 3' G ACGT / G 5'	Promega
<i>Rsa</i> I	5' GT/ AC 3' 3' CA / TG 5'	Promega

N: cualquier base, A,T,C o G. Fuente: Sigma, 2001

Las geles se tiñeron en una solución de 1mg/ml de bromuro de etidio durante 15 min. y se destiñeron durante 10 min. en agua de la llave. Posteriormente se observaron con un transiluminador y seguidamente se fotografiaron.

3.2 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP'S), OBTENIDOS POR MEDIO DE LA DIGESTIÓN DEL ADN AISLADO DE FITOPLASMAS DE VARIAS REGIONES

3.2.1 Lugares de muestreo

Las muestras de otros países usadas para la digestión con ER fueron amablemente donadas por las siguientes personas e instituciones:

- ✓ **EE. UU., Belice y Jamaica**, Nigel Harrison de la Universidad de Florida,
- ✓ **México**, Carlos Oropeza del Centro de Investigación Científica de Yucatán y
- ✓ **Guatemala**, Margarita Palmieri de la Universidad del Valle.

Las muestras de Honduras fueron recolectadas, en sitios distribuidos en la costa norte del país, en donde la enfermedad se encuentra activa y en la costa pacífica:

- ✓ **Roatán:** West Bay, West End, Oskgood Key y Flower Bay.
- ✓ **Cayos Cochinos:** Cayo Mayor, Cayo Menor y Chachahuate.
- ✓ **La Ceiba:** Salado - Lis Lis y Vía Ceiba – Trujillo.
- ✓ **Tela:** La Ensenada, Tornabé, Punta Sal y El Triunfo de la Cruz.
- ✓ **Colón:** San Antonio y Limón.
- ✓ **Choluteca:** Vía a Cedeño.

3.2.2 Nomenclatura de las muestras

Para nombrar las muestras se usó el siguiente sistema de nomenclatura:

Viaje:	1
Sitio de muestreo:	Ro
Enfermedad:	ALC
Número de muestra:	7
Número de extracción:	2
Tejido muestreado	A

En resumen esta muestra, **1 Ro ALC 7.2 A**, fue la séptima recolectada durante el primer viaje a Roatán y es la segunda extracción de ADN de aserrín del tronco. La importancia de la claridad en la nomenclatura, es que se está formando un banco de ADN, que puede ser muy útil en investigaciones futuras.

Las abreviaturas usadas para los sitios de muestreo son las siguientes:

Ro	- Roatán
Cc	- Cayos Cochinos
Ce	- Vía Ceiba - Trujillo
Sll	- Salado - Lis Lis
Te	- Tela
En	- La Ensenada
To	- Tornabé
Ps	- Punta Sal
Tc	- El Triunfo de la Cruz
Li	- Limón
Sa	- San Antonio
Ch	- Choluteca

Las abreviaturas usadas para los tipos de tejido son las siguientes:

A – Aserrín
F – Inflorescencia inmadura

3.2.3 Método de muestreo

Para la toma de muestras se siguió el manual de muestreo elaborado como parte de este proyecto de investigación (anexo3).

3.2.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguió el método de Doyle & Doyle (1990), optimizado en Zamorano para extracción de fitoplasmas de cocotero, por Harrison, B. (2000) (anexo 4).

3.2.5 Electroforesis horizontal de ADN

Para analizar la calidad del ADN extraído y determinar la cantidad de ADN a usar como muestra para la amplificación, se realizó una electroforesis horizontal. En una gel de agarosa al 1% preparada con TAE 1X (anexo 5), se cargaron 2 µl de cada muestra mezclados con 8 µl de buffer de carga (anexo 6); Como escalera molecular se usó *Eco* RI/*Hind* III (Promega®) (anexo 6) ésta gel se corrió a 65 v, usando TAE 1X como buffer de corrida.

Posteriormente se tiñó en una solución de 1mg/ml de bromuro de etidio durante 15 min y se destiñó en agua durante 15 min. Finalmente, se observó y fotografió bajo luz ultravioleta.

3.2.6 Amplificación de ADN

Las amplificaciones a usarse para las digestiones con enzimas de restricción, se realizaron en el Centro de investigación y educación de Fort Lauderdale, (Fort Lauderdale Research and Education Center, University of Florida) bajo la asesoría del Dr. Harrison y la colaboración de Monica Carpio y Estela Aguilar.

Para la amplificación de ADN, se usó el protocolo de preparación de reacciones de PCR según Innis y Gelfand, 1990 (anexo 7).

El agua usada para diluir la reacción, fue agua desionizada, destilada y estéril, la cual se referirá como agua ultrapura. Los dideoxinucleótidos se diluyeron en agua ultrapura, hasta alcanzar una concentración de 100 mM y un pH de 7.0 (anexo 7). Los iniciadores usados para la amplificación fueron P1 y P7, que se encontraban a una concentración de 25 ng/µl.

Posteriormente se agregó el buffer de PCR a una concentración de 10X (anexo 7), y se descartó el sobrante. La *Taq* polimerasa se añadió a una concentración de 5 U/ μ l y finalmente se completó la reacción con el ADN muestra.

Una vez preparadas las reacciones, se centrifugaron por 2 s a 10,000 rpm y luego se colocaron en un termociclador, en el cual se usó el programa indicado en el anexo 9.

Debido a que se observaron bandas tenues con la amplificación directa, se decidió realizar una reamplificación (nPCR) haciendo uso de los iniciadores grupo específicos LY16s y LY16s/23sr. Para esto se diluyeron las muestras que presentaron bandas visibles 1:100 y las que no presentaron banda 1:40. Se usaron como muestra para la amplificación, 3 μ l de cada dilución siguiendo los protocolos presentados en el anexo 10.

3.2.7 Electroforesis horizontal

Del producto de la amplificación de ADN se usaron 5 μ l, más 10 μ l de buffer de corrida, los que fueron sometidos a electroforesis a 65v, en una gel de agarosa al 1.0 % preparada con TAE 1X, el buffer de corrida fue TAE 1X. Como escalera molecular se usó *Eco* RI/*Hind* III (Promega ®, anexo 2).

La gel se tiñó en una solución de 1mg/ml de bromuro de etidio durante 15 min y se destiñó en agua de la llave durante 15 min. Finalmente, se observó y fotografió bajo luz ultravioleta.

Esto se realizó para comprobar la amplificación y definir el volumen del producto de la amplificación a usar en la digestión, el cual se determina de acuerdo a la intensidad de la banda observada en la gel, con la ayuda de un transiluminador. Este volumen varía de 4 a 6 μ l.

3.2.8 Selección de muestras

Para seleccionar las muestras a analizar en la Universidad de Florida, se decidió que las muestras debían cumplir con los siguientes requisitos:

- ✓ Positiva con P1 y P7, en los análisis realizados usando PCR beads (ver 3.3.4) en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano y
- ✓ Representar a un país, ecotipo o región dentro de Honduras.

Se decidió cortar las muestras positivas con el nPCR, realizado en la Universidad de Florida, con los iniciadores grupo específicos (anexo 10), debido a que se observaron bandas más intensas y por lo tanto amplificaciones de mejor calidad, que permitieran obtener un claro perfil de restricción al ser digeridas con las enzimas de restricción. Además, se seleccionaron dos muestras representativas de cada localidad dentro de Honduras, las que también representaban diferentes ecotipos de cocotero; y las muestras disponibles de cada país.

Como control se usó una muestra positiva para ALC de Honduras, que presentó síntomas clásicos de ALC (3 Cc ALC 25) y una muestra de ALC clásico de Florida (LY Juno).

3.2.9 Enzimas de restricción utilizadas

Las ER usadas en este estudio fueron *Alu I*, *Hae III*, *Hinf I*, *DraI*, *Dde I*, *Msp I* y *Taq I* (ver cuadro 3). Estas se usaron para digerir el producto de la amplificación con los iniciadores P1/P7, y posteriormente reamplificado (nPCR) con los iniciadores LY16s y LY16s/23sr, que son específicos para el grupo de fitoplasmas causantes de los síndromes de amarillamiento del caribe.

Cuadro 3. Información de las enzimas usadas en la caracterización molecular del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento	Fabricante	Temperatura de incubación (°C)	Concentración (U/μl)
<i>Alu I</i>	5' AG/CT 3' 3' TC/GA 5'	New England Biolabs	37	10
<i>Dra I</i>	5' TTT/AAA 3' 3' AAA/TTT 5'	Promega	37	10
<i>Dde I</i>	5' C/TNAG 3'	New England	37	10

	3' G ANT/C 5'	Biolabs		
<i>Hae</i> III	5' GG/CC 3'	Promega	37	10
	3' CC/GG 5'			
<i>Hinf</i> I	5' G/ ANT C 3'	New England	37	10
	3' C TNA / G 5'	Biolabs		
<i>Msp</i> I	5' C/CGG 3'	Promega	37	10
	3' GGC/C 5'			
<i>Taq</i> I	5' T/CGA 3'	Promega	65	10
	3' AGC/T 5'			

N: cualquier base, A,T,C o G. Fuente: Micklos y Freyer, 1990; Sigma, 2001

3.2.10 Digestión de las muestras

Se usaron de 4 a 6 µl del producto de nPCR con los iniciadores grupo específicos, para la digestión con enzimas. Se prepararon las digestiones de acuerdo al protocolo presentado en el anexo 1.

Una vez preparadas se mezclaron en el vortex y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 s. Las muestras a las que se les agregó *Taq* I se sellaron con parafilm para evitar la evaporación de las mismas durante la incubación, la cual duró 12 h. para todas las muestras. Todas las digestiones se incubaron a 37 °C, excepto las que contenían *Taq* I las cuales fueron incubadas a 65 °C.

Después de la primera incubación se agregaron 5 µl de mezcla (anexo 1) a todas las muestras, seguidamente se mezclaron y centrifugaron. Las que contenían *Taq* I se sellaron y todas regresaron a sus respectivas temperaturas de incubación, en donde permanecieron durante aproximadamente 12 h.

Finalmente se colocaron las muestras que fueron incubadas a 37 °C, en un baño de agua a 65 °C, durante 5 min. Luego todas las digestiones fueron mezcladas, centrifugadas y almacenadas a 4 °C.

3.2.11 Comparación de los perfiles de restricción en geles de poliacrilamida al 8%

Las muestras digeridas por las enzimas de restricción, fueron corridas en geles de poliacrilamida al 8% preparadas de según los protocolos presentados en el anexo 2, con la salvedad de que la escalera molecular usada fue pGEM (Promega®).

Se compararon los perfiles de restricción, obtenidos de la digestión del producto de la amplificación de fitoplasmas, extraídos de muestras recolectas o donadas, provenientes de:

- ✓ Honduras, México, Guatemala, Florida, Jamaica y Belice.
- ✓ altos del atlántico, altos del pacífico, enanos malayos e híbridos de Honduras.
- ✓ Roatán (West End, West Bay, Flower Bay y Osgood Key), La Ceiba (Salado – Lis Lis y Vía Ceiba - Trujillo), Bahía de Tela (La Ensenada, Punta Sal, Tornabé, El Triunfo de

la Cruz y Tela), Cayos Cochinos (Cayo Menor, Cayo Mayor y Chachahuate), Colón (Limón y San Antonio) y Choluteca (Carretera a Cedeño).

Para resumir el procedimiento realizado, se elaboró el diagrama de flujo presentado en la figura 5.

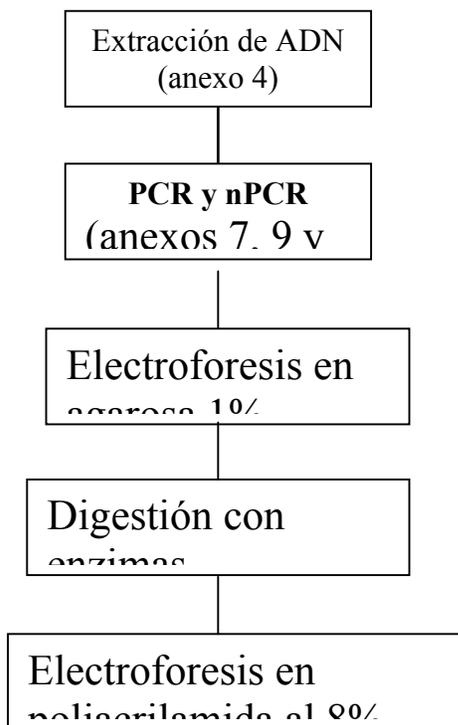


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso seguido para el análisis de los fragmentos polimórficos de restricción (RFLP's), obtenidos por medio de la digestión del ADN aislado de fitoplasmas de varias regiones.

3.3 MONITOREO DE LOS HÍBRIDOS MAPAN

3.3.1 Sitios visitados

- ✓ **Roatán:** Oskgood Key y West Bay,
- ✓ **Tela:** Punta Sal y en la comunidad Garífuna de San Juan,

- ✓ **La Ceiba:** la finca de la Standard Fruit Company Salado Lis Lis, las plantaciones en el hotel Caribbean Sands Resort y la comunidad Garífuna de Sambo Creek,
- ✓ **Colón:** San Antonio.

3.3.2 Metodología de evaluación

Se observaron los híbridos sembrados en los sitios mencionados; en el caso de La Ceiba y Tela en compañía del Ing. Antonio Jaco y en el caso de los demás sitios excepto Roatán con la Lic. Estela Aguilar.

Se observó el estado general de las palmas y se tomaron muestras para su posterior análisis en el laboratorio de diagnóstico molecular o en el Centro de Diagnóstico de Zamorano, de acuerdo al tipo de análisis a realizar en cada muestra. Para decidir que tipo de análisis debían realizarse en cada una de las muestras, se tomaron en cuenta los síntomas que presentaban las palmas. De ser típicos o muy similares a los del ALC, se tomaron para detección del fitoplasma por medio de PCR, de ser atípicos se tomaron para análisis de hongos en el centro de diagnóstico de Zamorano.

3.3.3 Análisis realizados en el Centro de Diagnóstico

Debido a las sospechas provocadas por los síntomas observados en los híbridos evaluados, se tomaron muestras de la hoja bandera, que se transportaron en hielo para evitar la proliferación de organismos contaminantes sobre la muestra, hasta su llegada a Zamorano.

Estas se sembraron en dos tipos de medio de cultivo específicos para el crecimiento de *Phytophthora* sp., V8 y agar zanahoria (Erwin y Ribeiro, 1996) (anexo 8). Las muestras se sembraron aproximadamente tres días después de la toma de las mismas, antes de sembrarlas se desinfectaron rociándolas con una solución de cloro al 2% durante 1 min., posteriormente se lavaron con agua destilada y se dejaron escurrir sobre papel toalla.

La siembra se efectuó dentro de una cámara de flujo laminar, desinfectando el equipo de disección con un mechero. Las muestras se colocaron en una incubadora a 35 °C, durante cinco días para su posterior observación al microscopio.

3.3.4 Análisis realizados en el laboratorio de diagnóstico molecular

La nomenclatura, método de muestreo, extracción de ADN y electroforesis horizontal se realizaron de igual manera que en la sección 3.2.

Los rangos de severidad de la enfermedad se asignaron de acuerdo a la siguiente escala:

0. Asintomático
1. Caída de cocos
2. Inflorescencias necróticas
3. Primer tercio del follaje amarillo
4. Todo el follaje amarillo o seco
5. Poste telefónico

Para la amplificación de ADN se usaron “PCR beads Ready to Go ®” (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.),⁸ las que se diluyeron de acuerdo al protocolo presentado en el anexo 11.

Los iniciadores usados para la amplificación fueron los universales P1 y P7 y los específicos para la detección del fitoplasma causante del ALC, LYR1 y LYF1. Los programas usados para el termociclador durante las amplificaciones pueden encontrarse en el anexo 9.

3.4 OPTIMIZACIÓN DEL TEJIDO MUESTRA PARA LA DETECCIÓN DEL ALC EN LOS HÍBRIDOS MAPAN

La nomenclatura, método de muestreo, extracción de ADN y electroforesis horizontal se realizaron de igual manera que en la sección 3.2. La amplificación de ADN se realizó de igual manera que para el monitoreo de los híbridos Mapan (3.3).

3.4.1 Toma de muestras

Las muestras se tomaron de los híbridos Mapan, provenientes de la hacienda Victoria en Costa Rica, sembrados en la finca Salado- Lis Lis. Se seleccionaron plantas que presentaran síntomas de amarillamiento, de las cuales se pudieran obtener ambos tipos de tejido, inflorescencia inmadura y aserrín del tronco.

En el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, todos los demás factores se mantuvieron iguales para el procesamiento y análisis de ambos tipos de tejidos.

3.5 ADAPTACIÓN DEL MANUAL DE MUESTREO DE COCOTERO PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL ALC

⁸ PCR beads: Perla que contiene *Taq* polimerasa liofilizada, Cloruro de magnesio, Cloruro de potasio, Tris HCl pH 9 y nucleótidos para la PCR.

Es necesario recalcar la importancia de la unificación de criterios de muestreo para la detección del ALC, para la elaboración del “Manual de Toma de muestras de Cocotero para la detección del Fitoplasma Causante del Amarillamiento Letal del Cocotero”, se tomó en cuenta la optimización del muestreo de Harrison, B. (2000), la cual tomó como base para la optimización, la técnica de muestreo del Dr. Harrison; el manual de muestreo de Oropeza *et.al* (2000) proporcionado por el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y la experiencia obtenida durante el presente trabajo de investigación. De esta manera se unificaron los criterios usados para el muestreo en la Universidad de Florida, el CICY y Zamorano, que son actualmente los laboratorios de diagnóstico de la región.

Este manual fue elaborado por la autora en el año 2000, y el mismo fue distribuido y usado como manual de instrucción durante el “curso sobre enfermedades y diagnóstico molecular del amarillamiento letal del cocotero”, realizado en Honduras del 30 de octubre al 3 de noviembre del 2000.

Este manual esta dirigido a un público con un nivel técnico suficiente para poder interpretarlo, y tomar y enviar muestras al laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, para su posterior análisis y diagnóstico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Siguiendo los protocolos de digestión de los fabricantes de las enzimas de restricción, no se obtuvieron resultados aceptables, pues en la mayoría de los casos no hubo digestión visible. Esto puede deberse al mayor tiempo de incubación, recomendado por el Dr. Harrison, el cual incrementa las probabilidades de obtener una digestión completa. El uso de Albumina Serica Bovina (BSA) se obvió, debido a que esta ayuda en las digestiones de ADN extraído de tejidos vegetales, pero tiene poco o ningún efecto benéfico en las digestiones de productos de amplificaciones de ADN de fitoplasmas.

Usando el protocolo de digestión del Dr. Harrison se obtuvieron perfiles de restricción aceptables de la muestra 1 To ALC 1.5, como puede observarse en la figura 6. En esta digestión, se cortó la muestra con las enzimas *Eco* R I, *Pst* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Bam* H I, *Hinf* I y *Hind* III. Los perfiles de restricción no tienen por objeto mostrar diferencias, pues se trata de una sola muestra; el objetivo del ensayo era comprobar la actividad de las enzimas de restricción, la que podría haberse disminuido o perdido, debido al almacenamiento o manipulación inadecuada y además comprobar la optimización de las geles de poliacrilamida al 8%.

Como puede observarse en la figura 6, las enzimas se encontraban en perfecto estado, con excepción de *Hinf* I, la que no presentó ninguna banda en la gel. Esto podría atribuirse a que esa enzima en particular, haya permanecido a una temperatura inadecuada, durante un mayor tiempo que las demás enzimas, que si presentaron actividad.

Las geles de poliacrilamida al 8%, presentaron un tiempo de polimerización más largo de lo esperado y una textura menos firme, lo cual se resolvió alterando el protocolo de preparación del persulfato de amonio (anexo 2). Ya que este es un reactivo altamente higroscópico, que había absorbido agua y al pesar 1 g., se pesaba realmente una cantidad menor de ingrediente activo, pues se estaba pesando parte del agua absorbida. Por lo tanto, se redujo la cantidad de agua para diluir el persulfato de amonio de 1 a 0.85 ml, lo cual resolvió el problema.

El hecho de poder observar claramente los perfiles de restricción, es suficiente para probar que las geles de poliacrilamida al 8% fueron optimizadas. Sin embargo la baja intensidad de algunas de las bandas, puede explicarse de varias maneras, una de ellas es que se usaron 5µl del producto de la amplificación con los iniciadores P1 y P7, cantidad que pudo haberse incrementado para proporcionar más sustrato para la digestión de las enzimas; otra de las maneras para explicar la intensidad de las bandas, es la calidad fotográfica, pues la fotografía que se muestra en la figura 6, no fue tomada en un cuarto

oscuro, ni con la suficiente intensidad de luz ultravioleta, debido al mal funcionamiento de algunas de las lámparas del transiluminador, como para poder obtener una mejor intensidad de las bandas. Otra explicación válida para el problema de la intensidad de las bandas es que se deba a la suma de los dos factores anteriores, cantidad de producto de amplificación a digerir y mala calidad fotográfica.

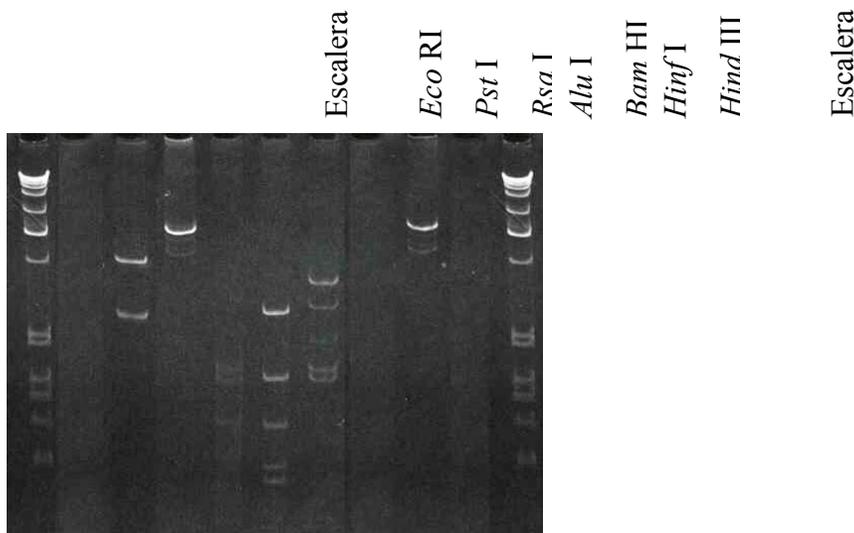


Figura 6. Gel de poliacrilamida al 8%, mostrando los perfiles de restricción de la muestra 1 To ALC 1.5, obtenidos de la digestión con las enzimas *Eco RI*, *Pst I*, *Rsa I*, *Alu I*, *Bam HI*, *Hinf I* y *Hind III*.

4.2 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's), OBTENIDOS POR MEDIO DE LA DIGESTIÓN DEL ADN AISLADO DE FITOPLASMAS DE VARIAS REGIONES

Habiendo optimizado el uso de enzimas de restricción y geles de poliacrilamida al 8%, fue posible comparar los perfiles de restricción obtenidos de la digestión de los productos de reamplificación (nPCR) con iniciadores grupo específicos LY16S LY16/23sr (cuadro 4).

Debido a que con los iniciadores universales P1 y P7, no se obtuvieron bandas lo suficientemente intensas como para ser sometidas a una digestión (figura 7), se sometieron las muestras a una reamplificación (nPCR) usando los iniciadores grupo específicos LY16S LY16/23sr. En esta amplificación se logró observar bandas más intensas (figura 8), que permitieron obtener mejores perfiles de restricción.

Cuadro 4. Muestras seleccionadas para la digestión con enzimas de restricción, de acuerdo a los resultados obtenidos de las amplificaciones con iniciadores universales y específicos, y reamplificaciones (nPCR) con iniciadores grupo específicos.

Muestra	Ecotipo	P1/P7	LY16S/ LY16/23sr	LYf1/ LYr1
1 Ch ALC 2	Alto Pacífico	Negativo	Tenue	Negativo
1 Tc ALC 8	Enano Verde	Positivo	Positivo	Positivo
1 Tc ALC 10	Enano Verde	Positivo	Positivo	Positivo
1 En ALC 1	Enano Verde	Positivo	Positivo	Positivo
1 En ALC 6	Alto Atlántico	Positivo	Positivo	Tenue
1 Li ALC 2	Alto Atlántico	Positivo	Positivo	Positivo
1 Ro ALC 3	Alto Atlántico	Positivo	Positivo	Positivo
1 Ro ALC 6	Enano Verde	Positivo	Positivo	Positivo
6 SII ALC 45	Enano Amarillo	Negativo	Positivo	Negativo
6 SII ALC 1 F	Mapan	Positivo	Positivo	Tenue
6 SII ALC VIII F	Mapan	Positivo	Positivo	Positivo
7 SII ALC 63 F	Mapan	Positivo	Positivo	Negativo
7 SII ALC 67 F	Mapan	Positivo	Positivo	Positivo
1 Ce ALC 4	Palma de manila	Positivo	Positivo	Positivo
1 Sa ALC 1 F	Mapan	Positivo	Positivo	Positivo
4 To ALC 6.2	Alto Atlántico	Tenue	Positivo	Tenue
3 CC ALC 6	Alto Atlántico	Tenue	Positivo	Tenue
3 CC ALC 25	Alto Atlántico	Positivo	Positivo	Positivo
Mex 2	?	Positivo	Positivo	Negativo
Mex 1	?	Tenue	Positivo	Negativo
JTMX1	?	Positivo	Positivo	Positivo
Gua 26	?	Negativo	Positivo	Tenue
Gua 32	?	Negativo	Positivo	Tenue
Gua 34	?	Tenue	Positivo	Tenue
Gua 42	?	Tenue	Positivo	Positivo
LY Juno	?	Positivo	Positivo	Positivo
5 Jam	?	Positivo	Positivo	Positivo
4 Bel	?	Tenue	Positivo	Tenue

Abreviaturas: **Ch:** Choluteca; **Tc:** El Triunfo de la Cruz; **En:** La Ensenada; **Li:** Limón; **Ro:** Roatán; **SII:** Salda lis lis; **Ce:** La Ceiba; **Sa:** San Antonio; **To:** Tornabé; **Cc:** Cayos Cochinos; **Mex y JTMX:** México; **Gua:** Guatemala; **LY Juno:** Florida; **Jam:** Jamaica; **Bel:** Belice.

Como puede observarse claramente en la figura 9, los perfiles de restricción de todas las muestras de Honduras digeridas con *Alu I*, *Hae III*, *Dra I*, *Dde I*, *Msp I* y *Taq I* presentaron el mismo perfil, sin presentar diferencias entre localidades o ecotipos.

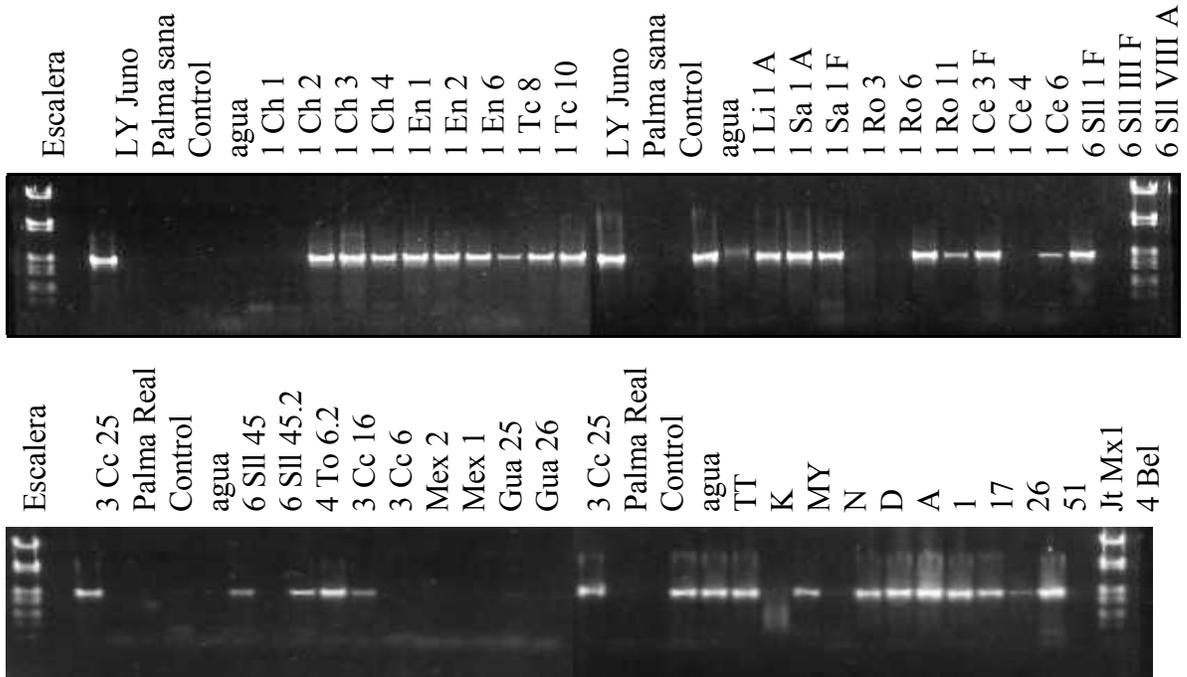


Figura 7. Geles de agarosa al 1%, mostrando los resultados de la amplificación con los iniciadores P1 y P7. Las muestras desde TT hasta 51, provienen de Africa y fueron donadas por el Dr. Jones.

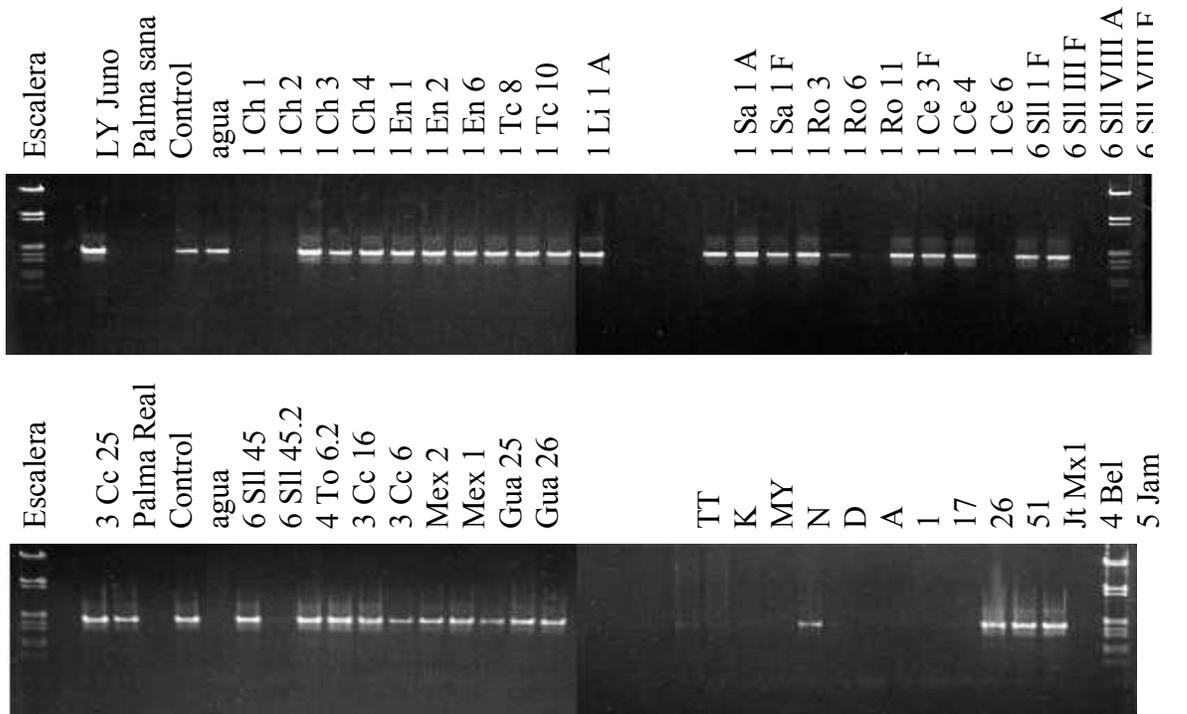
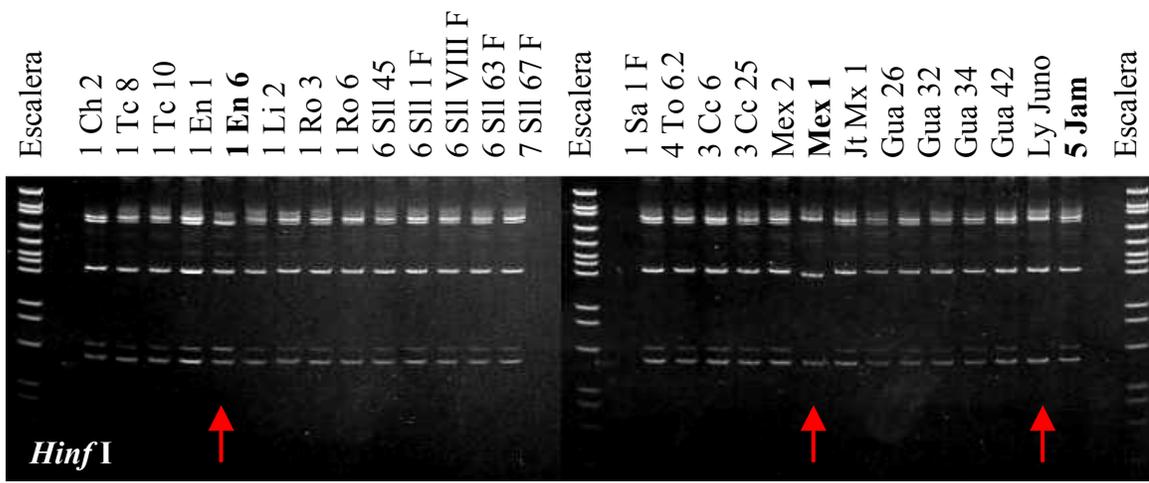
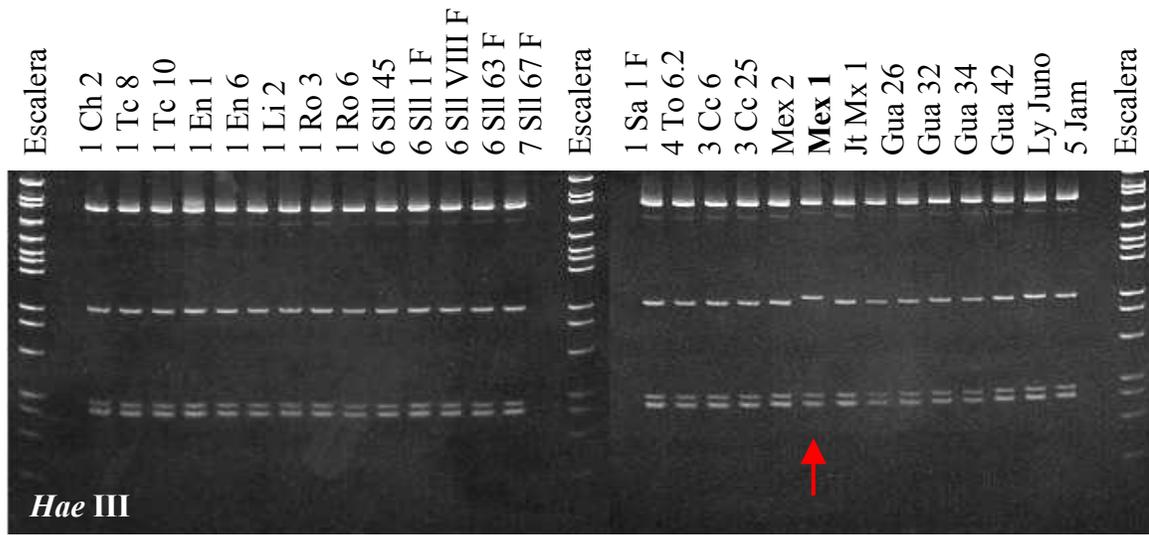
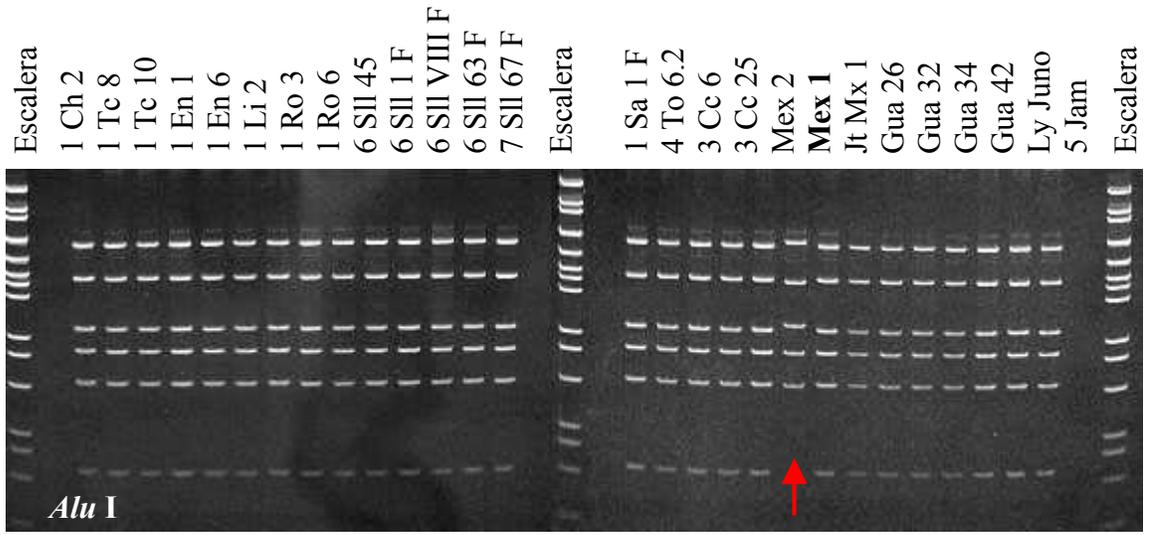
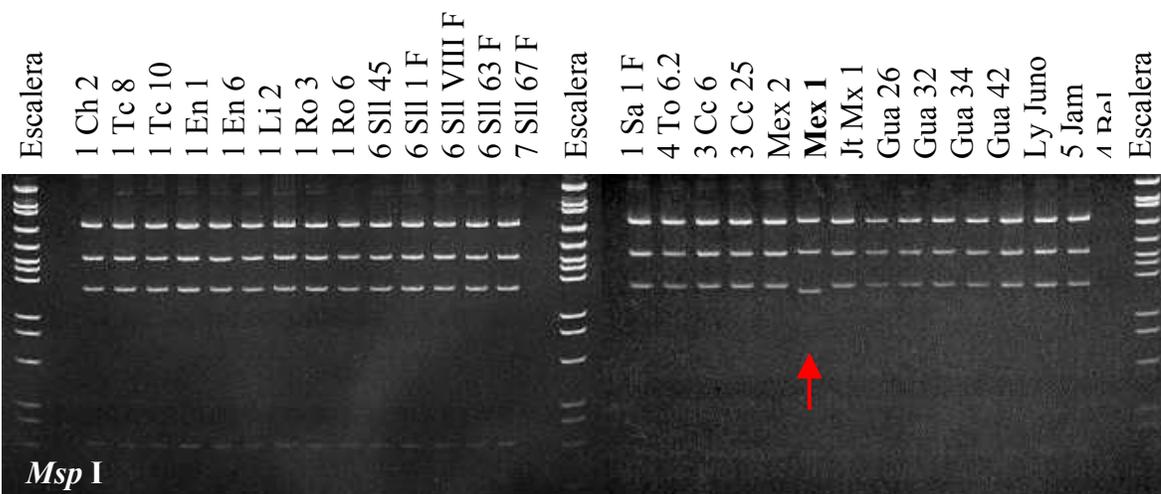
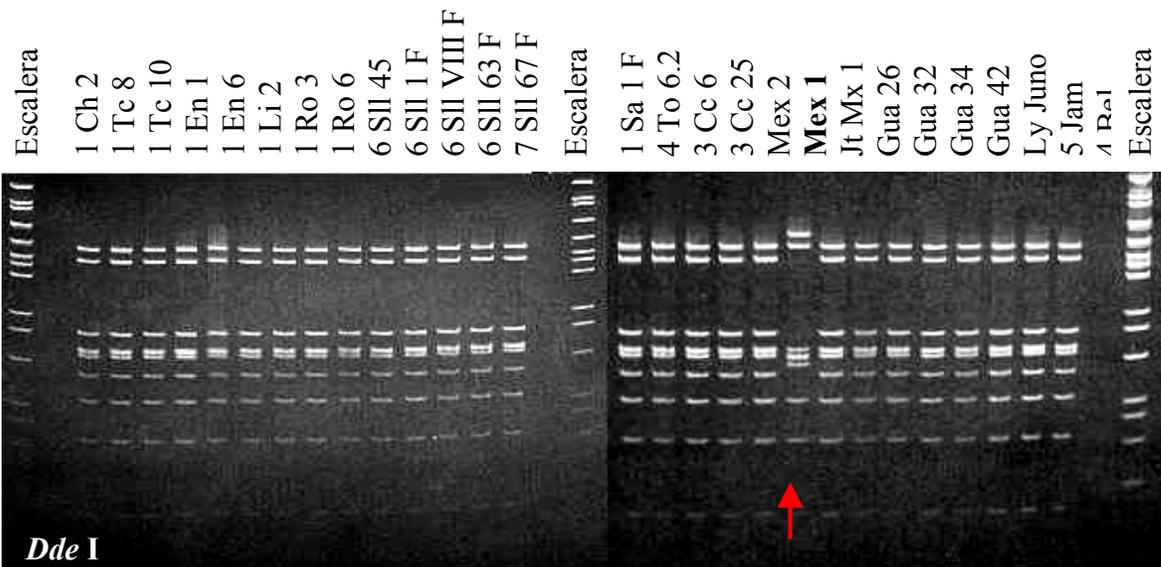
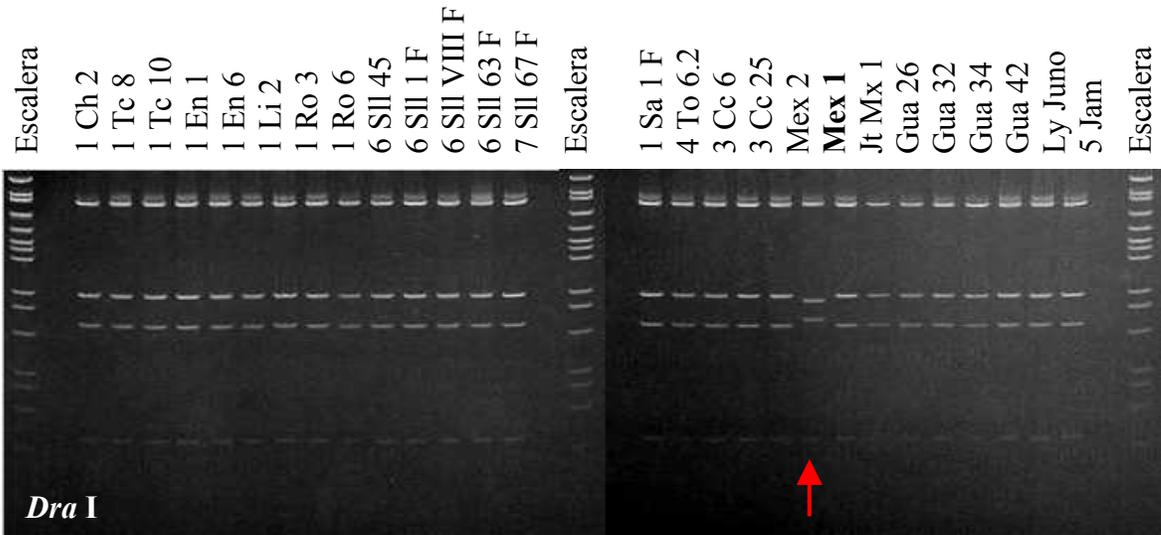


Figura 8. Geles de agarosa al 1%, mostrando los resultados de la reamplificación (nPCR) con los iniciadores LY16s y LY16/23sr. Las muestras desde TT hasta 51, provienen de Africa y fueron donadas por el Dr. Jones.





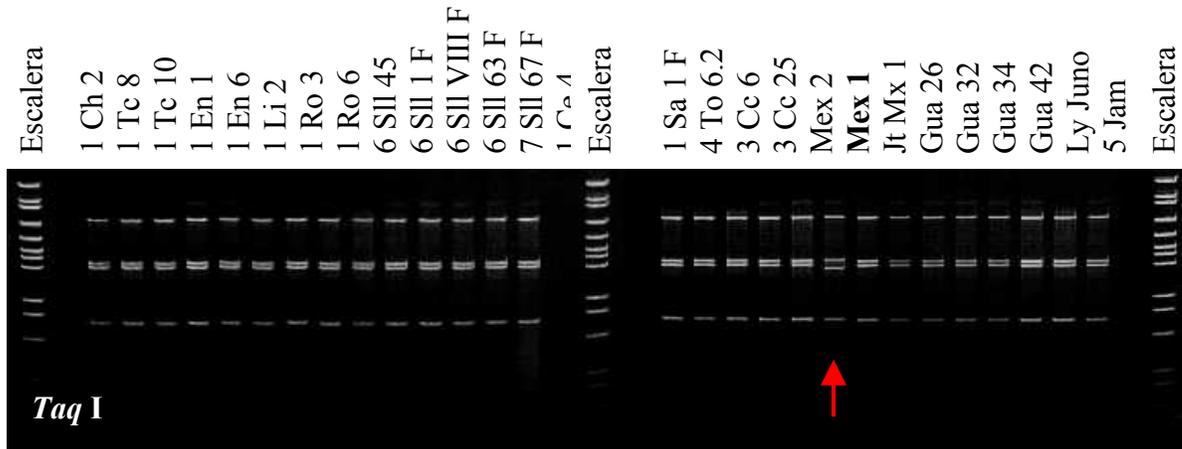


Figura 9. Geles de poliacrilamida al 8% mostrando los perfiles de restricción obtenidos de la digestión de los productos de reamplificación con los iniciadores LY16s y LY16/23sr con las enzimas *Alu I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Dra I*, *Dde I*, *Msp I* y *Taq I*.

Una de las muestras provenientes de la costa pacífica mexicana (Mex1), presentó notables diferencias en los perfiles de restricción con todas las enzimas, lo cual era predecible, debido a que los “síndromes de amarillamiento” presentes en la costa pacífica mexicana, han sido previamente diferenciados del amarillamiento letal clásico presente en la Florida, por medio de enzimas de restricción, por Nigel Harrison y Carlos Oropeza (1997).

Sin embargo al digerir las muestras con la enzima *Hinf I* (figura 9), se presentó una notable diferencia en una de las muestras provenientes de la costa atlántica de Honduras (**1 En ALC 6**), con respecto al perfil de amarillamiento letal clásico de la Florida y del resto de las muestras hondureñas. También en el perfil de restricción obtenido con *Hinf I*, de la muestra proveniente de Jamaica (5 Jam), se observó una diferencia, la cual ya había sido reportada (datos sin publicar) por el Dr. Harrison.

El fitoplasma causante del ALC clásico de Florida, contiene en su genoma dos operones (Schneider y Seemüller, 1994) (anexo 12), que pueden observarse en el perfil que se obtiene al cortar los mismos con la enzima *Hinf I* (Figura 10). Sin embargo el fitoplasma que se aisló y amplificó, de la muestra número seis recolectada durante el primer muestreo, en la comunidad de La Ensenada (**1 En ALC 6**), presentó un perfil de restricción que muestra la presencia de un solo operon (A en la figura 10), o dos copias idénticas del mismo operon.

Las diferencias encontradas entre las secuencias de los operones del amarillamiento letal clásico de la Florida, son del orden de sustitución de tres bases, sin embargo esto elimina un sitio de restricción de *Hinf I*⁹. Esto explica la presencia de cinco bandas en uno de los operones (A) y cuatro en el otro (B) (figura 10). En el B, debido a la sustitución de las tres

⁹ HARRISON, N. 2001. Operones en los fitoplasmas causantes del ALC. Florida, EE.UU., Universidad de Florida. (Comunicación Personal).

bases, se pierde uno de los sitios de restricción de *Hinf* I, por lo tanto solamente se efectúan tres cortes y por esto se obtienen cuatro en vez de cinco bandas en el perfil de restricción. El aislado hondureño (1 En ALC 6) presenta el perfil de cinco bandas (A), diferente del aislamiento de Jamaica el cual cuenta con un solo operon (B), o dos copias idénticas del mismo operon, que es complementario al operon de la muestra hondureña.

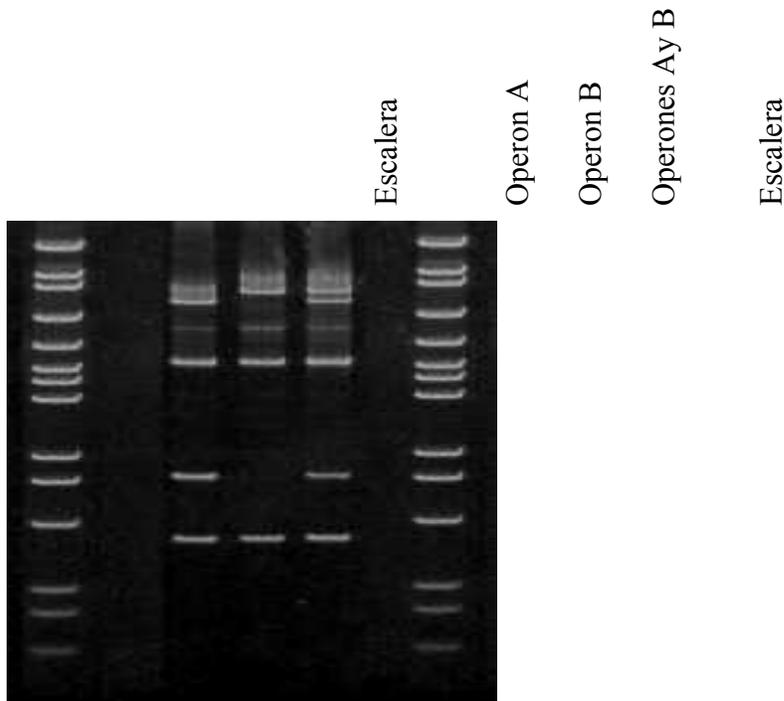


Figura 10. Gel de poliacrilamida al 8%, mostrando en una digestión con la enzima *Hinf* I, los operones del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en Florida Fuente: Harrison, N y Carpio, M.

Las implicaciones biológicas de esta diferencia, en cuanto a la resistencia varietal o la severidad de la enfermedad, los síntomas, el rango de hospederos del fitoplasma y la diversidad de vectores, no pueden ser determinadas directamente, debido a la imposibilidad de cultivar y transmitir el fitoplasma a plantas sanas bajo condiciones controladas.

Sin embargo, tomando como ejemplo el caso de la costa pacífica mexicana en donde este organismo, “primo” (97% homólogo) del fitoplasma causante del amarillamiento letal clásico, afecta una variedad resistente (altos del pacífico) y presenta ciertas diferencias en cuanto a la sintomatología tales como la retención de los cocos, podría inferirse que este organismo diferente, aislado de una muestra hondureña, podría causar variaciones en los factores biológicos mencionados anteriormente. Además puede decirse que las diferencias

genotípicas en el fitoplasma pueden reflejarse en diferencias en ciertos aspectos de la epidemiología de la enfermedad.

Otro ejemplo que apoya la posibilidad de consecuencias biológicas de la variante hondureña del fitoplasma, es la alta variabilidad genética que se encuentra dentro del grupo filogenético del amarillamiento del aster, (figura 11) grupo de fitoplasmas cuyos representantes se encuentran distribuidos alrededor del mundo. Este grupo tiene un amplio rango de vectores y síntomas, además de encontrarse en hospederos que van desde plantas herbáceas anuales, hasta leñosas perennes. Los fitoplasmas dentro de este grupo filogenético presentan porcentajes de homología mayores al 95.7%. Considerando que diferencias tan pequeñas entre ellos, impliquen variaciones biológicas tan grandes, puede apoyarse la inferencia de las posibles consecuencias biológicas, de la variante del fitoplasma clásico del amarillamiento letal en Honduras.

Finalmente, es importante recordar que Jamaica atravesó hace algunas décadas por la epidemia del ALC, y debido a ella se replantó con variedades resistentes, entre las cuales se encuentran el híbrido Maypan, enanos malayos y altos de panamá. Actualmente Jamaica está atravesando por una nueva crisis, la cual está afectando a todas las variedades “resistentes” en algunas regiones de la isla. Dentro de las posibles causas se encuentra la mutación del patógeno debido a la presión de selección ejercida por las variedades resistentes (Steer, 1997). En el aislado de Jamaica que se analizó por RFLP's durante este estudio, se confirmó la presencia de un solo operon o varias copias del mismo operon, lo cual nos permite formular la hipótesis de que la crisis actual de Jamaica podría deberse a la diferencia encontrada en el patógeno, que debido a la posible presión de selección y a la dispersión por el vector, se ha esparcido y ha infectado a las variedades “resistentes” en Jamaica, es posible que dentro de algunos años la misma situación se viva en las costas Hondureñas.

4.3 MONITOREO DE LOS HÍBRIDOS MAPAN

4.3.1 Roatán

Roca de Doyle, (2001) reporta que durante su visita a la isla de Roatán (Abril, 2001), observó aproximadamente 5,000 híbridos provenientes de Costa Rica, los cuales habían sido plantados en los últimos seis años y se encuentran bajo manejo de la industria turística de la isla. No se observaron problemas de adaptación o resistencia, durante esta visita (Roca de Doyle, 2001).

En el muestreo realizado en Roatán por Andrés García y Melissa Castillo, se evaluaron los híbridos Mapan sembrados en Oskgood Key y West Bay. Los resultados de las muestras tomadas para la detección del fitoplasma causante del ALC en híbridos Mapan se muestran en el cuadro 5.

Se observa que las dos muestras que presentaron síntomas de amarillamiento, resultaron infectadas con el fitoplasma. Sin embargo durante el muestreo fue difícil encontrar palmas

con síntomas característicos de ALC, pues la mayoría de los híbridos se encontraban sanos, y los que presentaban síntomas mostraban una mezcla de síntomas avanzados dentro de los cuales no podía diferenciarse, si la causa primaria de los mismos era un factor abiótico, la pudrición del cogollo, el picudo del cocotero, el anillo rojo o el ALC.

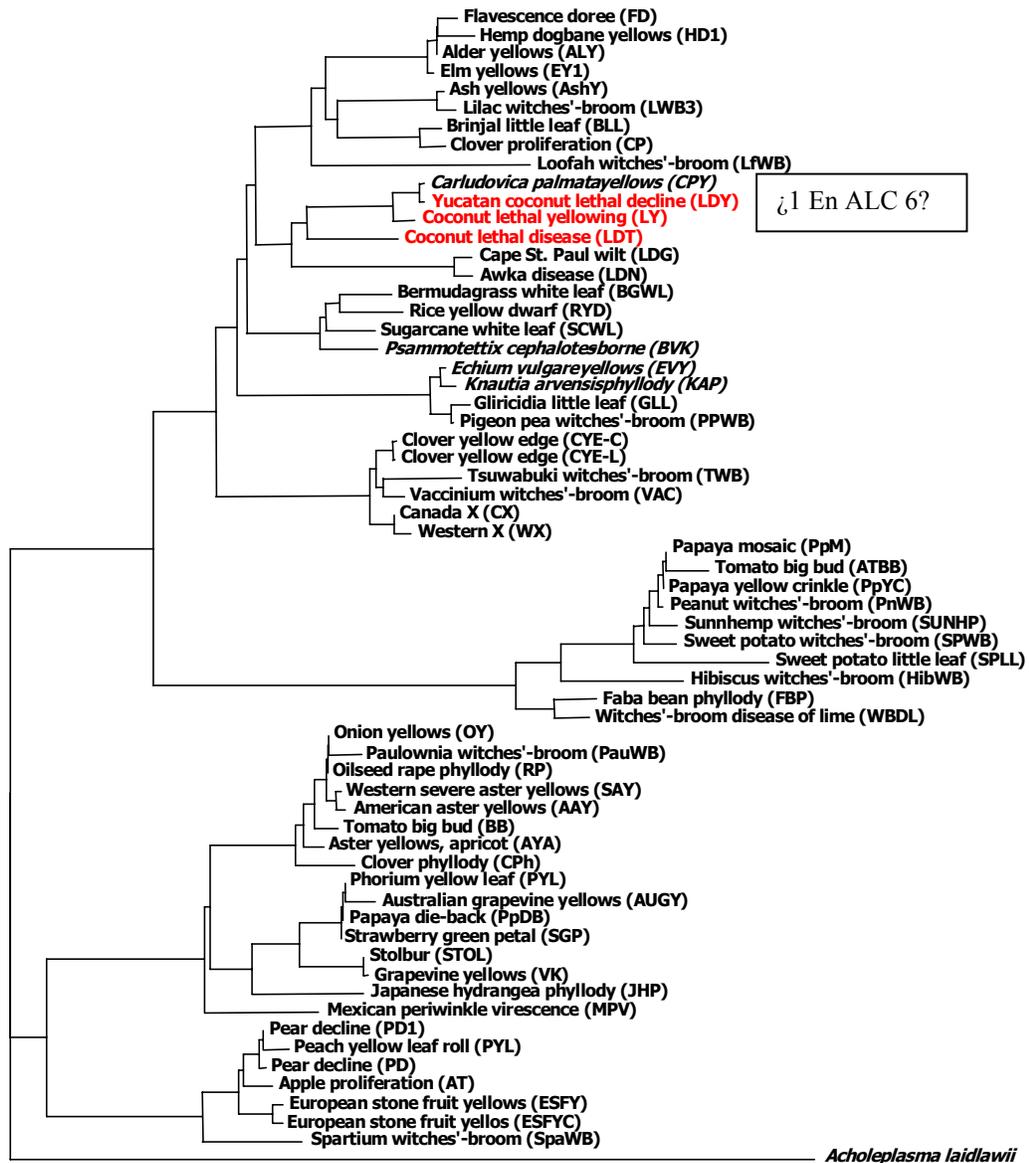


Figura 11. Árbol filogenético de 62 fitoplasmas, representando a 15 grupos filogenéticos. Fuente: Nigel Harrison, editado y alineado con SeqEd y PileUp (Wisconsin Package Version 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA).



Figura 12. Híbridos Mapan en Oskgood Key y en West Bay, Roatán. Fuente: Andrés García.

Cuadro 5. Reporte de los resultados obtenidos de las muestras recolectadas durante el primer muestreo en la isla de Roatán. Enero, 2001.

Número	Escala	Síntomas			Observaciones	Resultados	
		Cocos	Inflorescencias	Hojas		P1/P7	LYR1/LYF1
1 Ro ALC 4	3	No hay	Secas	1/3 amarillas	Mapan	+	+
1 Ro ALC 10	0	Fueron cosechados	Normales	Verdes	Mapan	-	-
1 Ro ALC 11	3	No ha fructificado	No hay	1/3 amarillas	Mapan	+	+

Escala = 0) asintomático, 1) caída de cocos, 2) inflorescencias necróticas, 3) 1/3 del follaje amarillo e inflorescencias secas, 4) todo el follaje amarillo o seco y 5) poste telefónico.

Es importante enfatizar los últimos posibles factores de mortalidad, pues algunos de los pobladores de Roatán indicaron que “el amarillamiento de los cocos es causado por un gusano que hemos encontrado dentro del corazón del cocotero”, lo cual indica la posible presencia de larvas del picudo del cocotero (*Radinaphelenchus cocophilus*), que es el vector de la enfermedad del anillo rojo.

Además de esto, algunos de los híbridos observados presentaron síntomas que concuerdan con los de la pudrición del cogollo (figura 13), enfermedad que no pudo ser diagnosticada debido a que no se encontraron muestras aptas para su análisis en el centro de diagnóstico de Zamorano. Todas las plantas observadas presentaban un estado avanzado de pudrición, donde los patógenos causantes de infecciones secundarias podrían ser predominantes sobre el organismo que causó inicialmente la infección.



Figura 13. Híbrido Mapan en Roatán, mostrando síntomas que concuerdan con la pudrición del cogollo (*Phytophthora* sp.) Fuente: Andrés García.

Aparte del amarillamiento observado en algunos híbridos, la mayoría de los mismos pueden considerarse saludables, por lo que no se tomaron más muestras.

4.3.2 La Ceiba

4.3.2.1 Salado – Lis Lis

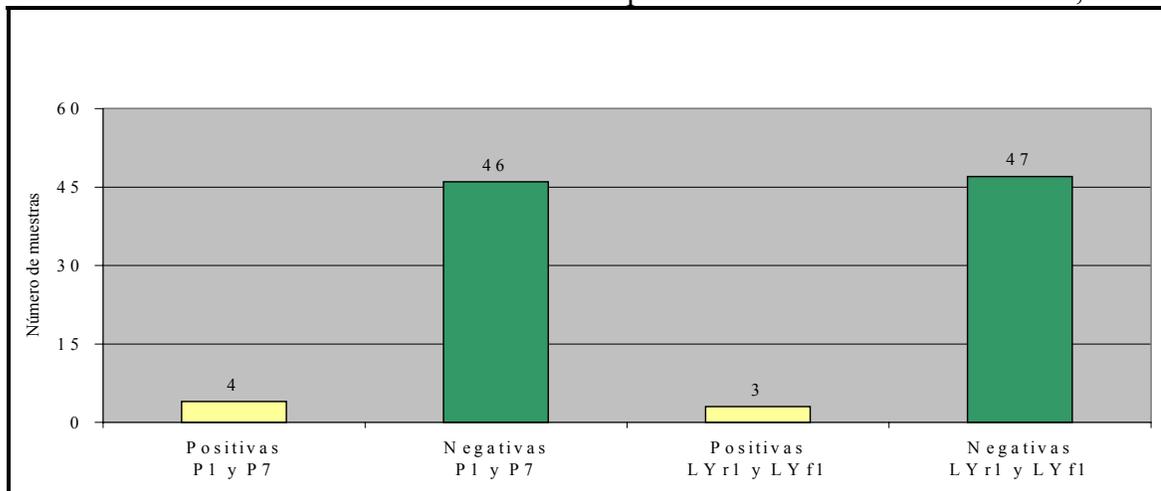
En la gráfica 1 se presentan los resultados del cuarto muestreo realizado en la finca de la Standard Fruit Company, Salado - Lis Lis. El detalle de los síntomas y observaciones de cada planta se encuentra en el anexo 13.

Durante este muestreo de cocoteros híbridos Mapan con síntomas de amarillamiento, de 3 a 7 años de edad, se detectó 6 % de infección con iniciadores específicos para la detección del fitoplasma causante del ALC (LYF1/LYR1).

Este bajo porcentaje de infección, con respecto al porcentaje aceptable en los híbridos (20%), sumado al estudio realizado por Michel Dollet, Hugh Harries, Nigel Harrison, Carlos Oropeza, Phil Jones y el equipo de investigación de Zamorano (María Mercedes

Doyle, Estela Aguilar, Barbara Harrison y Melissa Castillo), confirma la conclusión que los síntomas de amarillamiento que se presentan en los híbridos Mapan de la finca Salado - Lis Lis, se deben a una suma de factores bióticos y abióticos.

Gráfica 1. Resultados del cuarto muestreo en la plantación de Salado Lis Lis. Junio, 2000.



Bióticos debido a que en un 6% de las plantas con síntomas de amarillamiento se detectó la presencia del fitoplasma del ALC. Sin embargo, debido a que no se conoce con certeza el mecanismo de resistencia de los híbridos, la presencia de fitoplasmas no indica que estos sean necesaria o exclusivamente la causa de la mortalidad de los híbridos infectados, pues estos podrían simplemente estar presentes en el tejido, pero no causar ningún daño a la planta. También podrían estar presentes y debido a las condiciones de estrés abiótico extremo que han sufrido las plantas éstas podrían perder su mecanismo de resistencia y finalmente sucumbir a la enfermedad. También cabe la posibilidad de que 6% (hasta 20% se considera aceptable) de las plantas estén infectadas por fitoplasmas y que estos sean la causa de su mortalidad.

Es importante considerar, que el patógeno se encuentra presente en un 6% de los tejidos analizados, y sea o no el causante del amarillamiento, en el caso de no causar mortalidad de los híbridos, estos pueden convertirse en un reservorio de fitoplasmas, que gracias a la presencia de vectores podría convertirse en una fuente de inóculo, que mantendría activa la enfermedad a largo plazo.

Durante el tercer muestreo de Salado Lis Lis, el cual se realizó en compañía de Michel Dollet se tomaron muestras para la detección del nemátodo causante de la enfermedad del anillo rojo (*Bursaphelenchus cocophilus*), sin encontrar ninguna muestra infectada. Sin embargo durante otros muestreos en la plantación, se ha encontrado el vector del anillo rojo, el picudo del cocotero (*Radinaphelenchus cocophilus*) contra el cual se utilizan trampas con atrayentes impregnados de insecticidas (figura 14). Además Michel Dollet, realizó un análisis usando un microscopio compuesto, para detectar *Phytopomonas* que son los organismos causales de la enfermedad de Hartrot, sin encontrar ninguna de las tres muestras infectada (Dollet, 2000).



Figura 14. Picudos del cocotero (*Radinaphelenchus cocophilus*), vectores del nemátodo (*Bursaphelenchus cocophilus*) causante de la enfermedad del anillo rojo, encontrados en enero del 2001, en una trampa en la finca Salado Lis Lis. Fuente: Andrés García.

A pesar de estas búsquedas sin resultado, no puede descartarse totalmente la presencia de estos patógenos en la plantación, ya que el muestreo fue realizado a pequeña escala y en un corto tiempo. Sumado a esto, la distribución de la enfermedad de Hartrot no es uniforme, razón por la cual el Dr. Dollet concluyó que no se encontraron *Phytomonas* en la muestra, pero no es posible concluir que no existen *Phytomonas* en la planta. Por lo tanto estos patógenos pueden ser parte de los factores bióticos que están causando amarillamiento en la plantación.

Figura 15. Condiciones de inundación en la finca de cocoteros híbridos Mapan, Salado Lis lis. Jutiapa, Atlántida, Enero 2001. Fuente: Andrés García

Uno de los factores abióticos a los que se pueden atribuir los síntomas del 94% restante de los híbridos, es al exceso de agua durante gran parte del año, pues como se observa en la figura 15 muchos de los híbridos se encuentran creciendo bajo condiciones extremas de exceso de agua, lo cual impide el intercambio gaseoso en las raíces, asfixiándolas y causando síntomas como la caída de cocos, el amarillamiento del follaje y finalmente la muerte de la palma.

Otro de los argumentos que apoya esta conclusión es que durante el sexto muestreo (enero, 2001) en esta misma finca, se observó la

implementación de un sistema de drenaje, el cual según expresó el Ing. Clemente Molina (encargado de la finca) y observaron los investigadores, mejoró la situación de los híbridos e incluso algunos comenzaron a remitir síntomas.

4.3.2.2 Sambo Creek y Jutiapa (Caribbean Sands Resort)

Esta evaluación se realizó en compañía de la Lic. Aguilar y el Ing. Jaco, en el mes de Junio del año 2000. Se observaron alrededor de 10 híbridos Mapan (según informes de los habitantes de la zona) que estaban sembrados a la orilla de la playa. Los híbridos evaluados estaban entre los 2 – 3 años de edad y ninguno de ellos había fructificado.

En aproximadamente 3% de los híbridos evaluados se detectaron síntomas que concuerdan con los de la pudrición del cogollo (*Phytophthora* sp.). Estos síntomas eran:

- ✓ Hoja bandera doblada,
- ✓ Pudrición maloliente detectada al disectar la base de la hoja bandera y
- ✓ Amarillamiento descendente de la palma.

A los habitantes de la zona se les recomendó sacrificar las palmas afectadas, debido al peligro que representa la diseminación de la probable enfermedad, quemar los residuos de la palma, tratar con cal el área donde estuvo sembrada, para subir el pH y crear un microambiente inhóspito para el hongo. Finalmente, se recomendó no volver a sembrar otro cocotero en el mismo lugar que el anterior, debido a la posible persistencia en el suelo del patógeno.

En los cultivos de las muestras foliares sembradas en medio V8 sin clarificar, e incubadas a 37 °C durante 5 días, no se detectó el crecimiento de ningún microorganismo, por lo cual es imposible indicar concluyentemente cual es el agente causal de los síntomas observados.

Ninguno de los híbridos evaluados presentó síntomas que coincidieran con los del ALC, por lo tanto no se realizaron análisis moleculares para su detección, asumiéndose de esta manera, que aparte de la posible infección por la pudrición del cogollo, el resto de los híbridos se encuentra en condiciones normales de desarrollo.

4.3.3 Tela

4.3.3.1 Punta Sal

La evaluación de los híbridos plantados en Punta Sal, que es parte del parque Nacional Janeth Kaway, se realizó en el marco del “curso sobre enfermedades y diagnóstico molecular del ALC”, en el mes de Noviembre del año 2000, en compañía de Carlos Oropeza, Phil Jones y Nigel Harrison.

Según los habitantes del parque de los 20 híbridos Mapan, plantados en la zona hace 5 años, solamente 7 ($\cong 35\%$) han sobrevivido. De los sobrevivientes se tomaron muestras, las cuales en opinión de Oropeza y Jones presentaban síntomas similares a los de la pudrición del cogollo, sin embargo debido a problemas de transporte las muestras llegaron a Zamorano en un estado no apto para su cultivo en medios específicos para *Phytophthora* sp.

Se tomó una muestra para la detección de ALC, la cual resultó negativa, confirmando de esta manera que los síntomas observados no se deben al fitoplasma causante del ALC, si no probablemente a otros factores de tipo biótico o abiótico.

En opinión del Dr. Harrison, una de las palmas mostraba síntomas de deficiencias nutricionales, lo cual confirma la susceptibilidad de los híbridos a condiciones sub óptimas de siembra y manejo. Esta evaluación es un buen modelo para mostrar que los híbridos no tienen la misma robustez que los altos del atlántico, y que por lo tanto un programa de replantación debe ir acompañado de una capacitación adecuada para que los beneficiarios de las plantas

conozcan los cuidados que se deben ofrecer a las palmas, antes durante y después de la siembra.

4.3.3.2 San Juan

En compañía del Ing. Javier Menjivar, representante de la Fundación para la Protección de Punta Sal y Texiguat (PROLANSATE) y la Lic. Aguilar se visitó la comunidad Garífuna de San Juan, donde el Ing. Menjivar había repartido híbridos Mapan traídos de Costa Rica.

Algunas de las plantas repartidas no habían sido sembradas y continuaban, 6 meses después de ser repartidas, en las bolsas de transplante, donde ya no había suficiente espacio para el desarrollo normal de la planta (figura 16).

Las plantas evaluadas se encontraban entre los 2 – 3 años de edad y la evaluación se realizó en el mes de Junio del 2000. El Ing. Menjivar manifestó que el patronato de la comunidad se encargó de repartir 3 plantas por hogar que manifestara el deseo de sembrar y cuidar las plantas en sus casas.

Los habitantes de la zona manifestaron que algunos de los híbridos perecieron después de ser afectados por el huracán Mitch, durante el cual la comunidad vivió varios días de lluvia intensa, la cual algunos de los híbridos no pudieron resistir.



Figura 16. Híbridos Mapan entregados seis meses atrás, a los habitantes de la comunidad de San Juan, Tela.

Además de las plantas que murieron por exceso de agua, no se encontraron plantas que presentaran síntomas de ALC o de pudrición del cogollo, por lo que se puede decir que los híbridos plantados en esta comunidad se encuentran dentro de los parámetros normales de desarrollo.

4.3.4 Colón

4.3.4.1 San Antonio

La evaluación de los híbridos plantados en la comunidad de San Antonio se realizó durante el curso teórico – práctico sobre Amarillamiento Letal del Cocotero realizado en Mayo del 2001, con la colaboración de Carlos Oropeza, Hugh Harries, Mario Bustamante, Estela Aguilar, Carlos Sabio y Andrés García.

En esta comunidad se visitó un vivero de híbridos importados desde Costa Rica, que se encontraban plantados en bolsas y sin ningún sistema de sombra. Según pudimos observar y escuchar del encargado del vivero, la causa del amarillamiento de las plántulas era la falta de riego, pues no se les había proporcionado agua a las plantas que mostraban ya un notable amarillamiento foliar debido a la falta de agua.

En los alrededores del vivero se encontró un híbrido de aproximadamente 3 años de edad, que presentaba síntomas de amarillamiento. De este se tomaron dos muestras, aserrín e inflorescencia, para el diagnóstico del ALC. No pueden hacerse inferencias acerca del resto de los híbridos plantados en la comunidad debido a que no pudieron evaluarse. Sin embargo en la única muestra tomada se detectó el fitoplasma tanto en el aserrín como en la inflorescencia.

4.4 OPTIMIZACIÓN DEL TEJIDO MUESTRA PARA LA DETECCIÓN DEL ALC EN LOS HÍBRIDOS MAPAN

En el cuadro 6 se presentan los resultados del muestreo realizado en la finca de la Standard Fruit Company, Salado - Lis Lis.

Cuadro 6. Resultados obtenidos de las muestras recolectadas durante el sexto muestreo en la plantación de Salado Lis Lis. Enero, 2001

Número	Escala	Síntomas			Observaciones	Resultados	
		Cocos	Inflorescencias	Hojas		P1/P7	LYR1/ LYF1
6 SLL I F 6 SLL I A	2	Caídos	Algunas secas no se observaron abiertas	Verdes	7 años	-	
6 SLL II F 6 SLL II A	2	Caídos	Secas	Verdes		-	
6 SLL III F	2	Algunos	Necrótica	Dos secas		+	-

6 SLL III A		Caídos				-	
6 SLL IV F	0	No Fructificado	Normal	Verdes	2 ½ años	-	
6 SLL IVA						-	
6 SLL V F	2	Caídos	Necrótica	Verdes	3 años	+	+
6 SLL VA						-	
6 SLL VI F	3	No se Observaron	Secas	Pequeñas		-	
6 SLL VI A						-	
6 SLL VIII F	3	Caídos	Secas	Secas y algunas con puntas secas	7 años	+	+
6 SLL VIII A						t+	-
6 SLL 1 F	3	Caídos	Secas	Bajas caídas	7 años (5 SLL 1)	+	+
6 SLL 1 A						-	
6 SLL 14 F	1	Algunos Caídos	Normal	Verdes	7 años	-	
6 SLL 14 A						-	
6 SLL 27 F	2	Caídos	Necróticas y secas	Verdes	7 años	-	
6 SLL 27 A						-	

t = tenue, A = aserrín, F = inflorescencia, Escala = 0) asintomático, 1) caída de cocos, 2) inflorescencias necróticas, 3) 1/3 del follaje amarillo e inflorescencias secas, 4) todo el follaje amarillo o seco y 5) poste telefónico.

Durante este muestreo, de diez muestras tomadas por duplicado de plantas sintomáticas, de 2 ½ a 7 años de edad, un 30% fueron positivas con los iniciadores específicos para el fitoplasma causante del ALC (LYF1/LYR1). Si solo se hubieran tomado muestras de aserrín no se hubiera detectado ninguna muestra positiva, y si solo se tomaran inflorescencias el porcentaje de infección se mantendría en 30 %.

Estas diferencias son razonables, debido a que la inflorescencia inmadura es un sitio de crecimiento activo, a donde se envía gran cantidad de savia a través de los tubos cribosos del floema, lo cual explica que los fitoplasmas se detecten más temprano en las inflorescencias que en el aserrín del tallo¹⁰.

Puede observarse claramente (gráfico 2), a pesar del reducido tamaño de la muestra, la mayor detección del fitoplasma en las muestras tomadas de inflorescencias que en las de aserrín del

¹⁰ DOLLET, M. Las discrepancias en la detección del fitoplasma en aserrín e inflorescencia de coco. Montpellier, Francia. CIRAD (Comunicación Personal).

tronco. Este resultado podría indicar que en muestreos anteriores se ha subestimado el porcentaje de muestras infectadas por el fitoplasma, debido a que la mayoría de las muestras hasta la fecha son de aserrín. Por lo tanto, las conclusiones en cuanto a los porcentajes de infección están basadas únicamente en este tejido, el que como puede observarse, puede darnos falsos negativos.

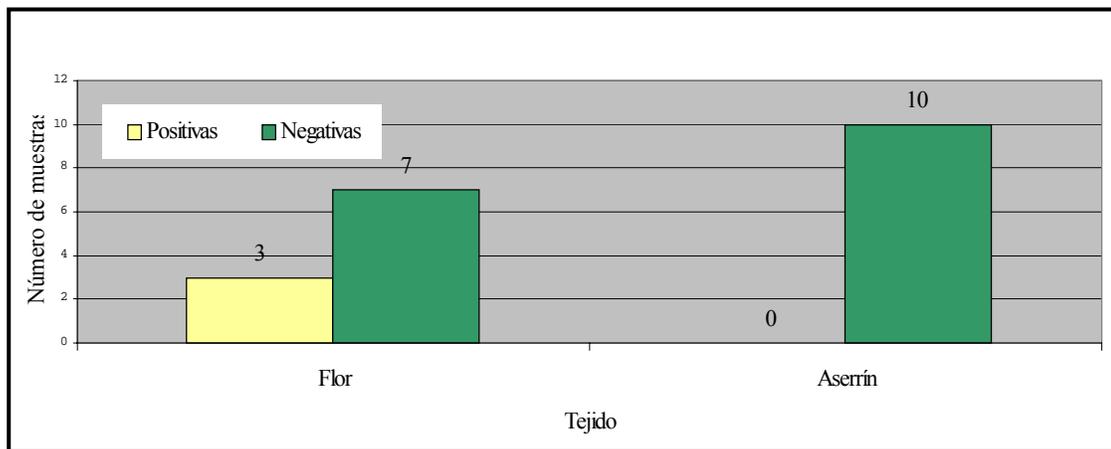
A pesar de que estos resultados indican que en los híbridos Mapan el fitoplasma puede detectarse antes en muestras tomadas de la inflorescencia, que en las de aserrín, la aplicación práctica de esta conclusión se ve seriamente limitada por la dificultad logística que la obtención de la muestra representa, aparte de que para el productor esto representa la pérdida potencial de un racimo de cocos.

En dos de las plantas se encontraron muestras positivas con los iniciadores universales y negativas con los específicos para ALC, lo que ya se había presentado en otros muestreos en esta misma finca y en otras localidades de la costa atlántica hondureña. Esto podría deberse a la amplificación de un contaminante de superficie incluido al momento de la toma de muestra, debido a que durante este muestreo no se practicó la desinfestación de la superficie a muestrear con fuego. Sin embargo en otras muestras tomadas durante este mismo muestreo en Roatán, La Ceiba y Tela, no se presentaron discrepancias entre los resultados obtenidos con los iniciadores universales para fitoplasmas (P1/P7) y los específicos para ALC (LYF1/LYR1).

Estos resultados también podrían explicarse por la contaminación de las muestras durante la toma de las mismas o su procesamiento en el laboratorio, ya que sabemos que con los iniciadores P1/P7 pueden amplificarse secuencias no deseadas, como es el caso del *Leuconostoc* sp. que se amplificó y secuenció (anexo 14) en el laboratorio del Dr. Harrison. Otra hipótesis es que debido a la

especificidad de los iniciadores LYr1/LYf1, estos no amplifiquen una secuencia que los iniciadores universales si amplifiquen, o que la amplificación sea débil y por lo tanto no visible, debido a la poca luz ultravioleta emitida por las lámparas averiadas del transiluminador.

Gráfica 2. Resultados del sexto muestreo de aserrín e inflorescencia en Salado Lis Lis. Enero, 2001.



4.5 ELABORACIÓN DEL MANUAL DE MUESTREO DE COCOTERO PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL ALC

Se elaboró un manual de muestreo ilustrado, tomando en cuenta la optimización del muestreo de Harrison, B. (2000), la cual tomó como base para la optimización, la técnica de muestreo del Dr. Harrison; el manual de muestreo de Oropeza *et.al* (2000) y la experiencia obtenida durante este trabajo de investigación.

Éste manual se presentará a la red “Wafaluma” como un aporte del equipo de investigación de Zamorano. Este ampliará las posibilidades de diagnóstico de la enfermedad en zonas a las que el equipo de Zamorano no puede llegar, pero en las cuales existen técnicos, que pertenecen a la red “Wafaluma”, los que con la ayuda de este manual, estarán en la capacidad de tomar y enviar muestras,

para su posterior diagnóstico en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano.

En el manual de muestreo se incluyó la toma de muestras de aserrín e inflorescencia, pues a pesar de que durante este estudio se observó una detección más temprana del fitoplasma en las inflorescencias inmaduras, estas no siempre pueden obtenerse como tejido muestra, debido a que pueden estar muy altas, necróticas o ausentes.

El método de identificación de muestras recomendado en el manual de muestreo consiste en pintar en el tronco, el mismo número que se asignó a la muestra enviada, esto permitirá relacionar los resultados del diagnóstico con los síntomas observados y con la evolución de los mismos en la planta.

En el manual de muestreo se recomienda como método de desinfección de la broca, el uso de una solución de cloro al 3%, por referencias del manual de muestreo del CICY (Oropeza *et. al.* 2000). Sin embargo, se prefiere la desinfección del taladro y de la superficie a muestrear con un soplete, como refiere Harrison, B. (2000) pues se considera que este último método es más eficiente para la destrucción de posibles contaminantes de la superficie y la muestra.

En el manual de muestreo se recomendó la desinfección de la broca con cloro, debido a que durante este estudio se probó ese método de desinfección en el quinto y sexto muestreos de Salado- Lis Lis y primer muestreo de La Ceiba, Roatán, Tela y Choluteca, obteniéndose resultados aceptables. Considerando lo anterior y las limitantes de equipo de muestreo con el que cuentan los técnicos que integran la red “Wafaluma”, se optó por la desinfección con cloro.

En cuanto a la conservación de las muestras se recomendó el uso del buffer CTAB con 2% de β -mercaptoetanol, el cual será preparado y enviado por el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano. Sin embargo, considerando las dificultades que el envío del buffer podría presentar, se mencionan las alternativas de conservación de muestras en hielo, si es que éstas serán enviadas antes de dos días al laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano o se indica que si las muestras serán almacenadas a largo plazo, deben ser secadas durante 24 h en un horno a 36 °C, selladas en bolsas plásticas y enviadas lo más pronto posible (Oropeza *et. al.* 2000).

En el manual de muestreo se indica que después de la toma de una muestra de aserrín, debe sellarse la herida con un trocito de plasticina para evitar la entrada de otras plagas y/o patógenos que pueden causar o acelerar la muerte del cocotero muestreado. Se especifica que el fitoplasma no puede ingresar al cocotero por la herida causada para tomar la muestra de aserrín.

Como anexo se presentó una hoja de datos que deben acompañar a cada muestra, esto para evitar el envío de muestras de las cuales se desconoce su procedencia, síntomas o cualquier otra observación, que pueda ser útil a la hora de realizar el diagnóstico y formular las recomendaciones pertinentes.

Finalmente se incluyen fotografías (Gabriel Chiriboga), las cuales facilitarán el claro entendimiento y la puesta en práctica de la información presentada en el texto del manual.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Como resultado de este trabajo de investigación, en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, se cuenta con la capacidad técnica, los reactivos y el equipo para realizar la caracterización molecular de fitoplasmas, usando la técnica de RFLP's en geles de poliacrilamida al 8%.
- ✓ Comprando algunas otras enzimas de restricción, la técnica de RFLP's puede ser aplicada para realizar el primer paso de la caracterización molecular, de otros organismos con los que se trabaja en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, como Geminivirus.
- ✓ No se encontró variabilidad en los perfiles de restricción de los aislados provenientes de cocoteros altos del atlántico, altos del pacífico, enanos malayos e híbridos de Honduras, usando las enzimas de restricción *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Dra*I, *Dde* I, *Msp* I y *Taq* I, para digerir el producto de la reamplificación con los iniciadores LY16s y LY16s/23sr.
- ✓ Se encontró variabilidad entre los aislados de la costa pacífica mexicana y de Jamaica con respecto a los del ALC clásico de Florida, usando las enzimas *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Dra*I, *Dde* I, *Msp* I y *Taq* I, para digerir el producto de la reamplificación con los iniciadores LY16s y LY16s/23sr.
- ✓ En la costa atlántica hondureña, observando los perfiles de restricción obtenidos de la digestión del producto de reamplificación (nPCR), con los iniciadores LY16s y LY16s/23sr con la enzima ***Hinf* I**, se encontró un fitoplasma proveniente de La Ensenada, que difiere de los aislados de Jamaica, el pacífico mexicano y el ALC clásico de Florida. 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. Sin embargo, deben tomarse en cuenta los casos del pacífico mexicano y de Jamaica, en donde es posible que diferencias genéticas en el patógeno, sean las causantes de diferencias en la epidemiología (tasa de dispersión, rango de hospederos susceptibles, severidad) de la enfermedad. Además, tomando como modelo al grupo filogenético del amarillamiento del aster, dentro del cual existe una gran diversidad de fitoplasmas, que comparten una homología mayor al 97.5%, y que tienen un amplio rango de hospederos y vectores, puede extrapolarse que la diferencia encontrada en Honduras podía tener implicaciones biológicas, las cuales solamente el tiempo, las observaciones a largo plazo en el campo o nuevas herramientas biotecnológicas podrán revelar.
- ✓ No puede concluirse si existe ALC en la costa pacífica hondureña, debido a que las únicas dos muestras positivas, fueron tomadas de cocoteros altos del pacífico que fueron sometidos a un largo período de inundación, posterior al huracan Mitch. Estas

muestras fueron positivas **únicamente**, usando nPCR con los iniciadores grupo específicos en la Universidad de Florida. Por lo tanto, no es posible concluir inequívocamente acerca de la presencia de la enfermedad en la costa pacífica del país.

- ✓ En los híbridos evaluados en las localidades de Roatán, Tela, La Ceiba y Colón, se encontraron algunos síntomas de amarillamiento. Menos del 10% de los casos se encontraron infectados por el fitoplasma causante amarillamiento letal del cocotero y el resto podría atribuirse a factores bióticos (anillo rojo, pudrición del cogollo, daño por picudo) y abióticos (falta/exceso de agua, deficiencias nutricionales). Estos últimos factores pueden ser manejados bajo los principios de manejo integrado de plagas, como han sido manejados en Roatán donde se observó el mejor comportamiento de los híbridos, debido a los altos ingresos generados por turismo, que permiten proveer a los híbridos con las medidas adecuadas de manejo.
- ✓ En los híbridos MAPAN existe un mayor porcentaje de detección del fitoplasma en las muestras obtenidas de inflorescencia que en las de aserrín. Sin embargo no siempre es factible obtener las muestras de inflorescencia, por lo que la aplicación práctica del hallazgo se ve seriamente limitada.
- ✓ Se adaptó un manual de toma de muestras para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero, el que puede ser distribuido a los técnicos integrantes de la red Wafaluma y a técnicos de otros países de la región con necesidades de diagnóstico, para que estos puedan tomar y enviar muestras al laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda, aplicar la técnica de RFLP's para caracterizar molecularmente a otros organismos con los cuales se trabaja en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano.
- ✓ Debería darse seguimiento a los síntomas de la muestra de La Ensenada (1 En ALC 6), y realizar un segundo muestreo de las palmas en la zona, para verificar la existencia de la variante del fitoplasma en zonas aledañas a la muestra recolectada.
- ✓ Como siguiente paso de la investigación iniciada, debe clonarse y secuenciarse el aislado hondureño (1 En ALC 6), para poder colocarlo en el árbol filogenético de los fitoplasmas. Y así poder extraer conclusiones de acuerdo a la posición filogenética del fitoplasma.
- ✓ Actualmente en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, se cuenta con la capacidad de realizar reamplificaciones (nPCR) de aislados de fitoplasmas, haciendo uso de los iniciadores grupo específicos LY16s y LY16/23sr, los que pueden reamplificar la secuencia amplificada con los iniciadores universales P1 y P7. En el momento en que se realizaron los diagnósticos de este proyecto de investigación, no se contaba con estos iniciadores por la cual no se usaron, pero ahora que se cuenta con ellos se recomienda validar los negativos obtenidos con P1 y P7, haciendo uso de (nPCR). Otra de las recomendaciones para validar negativos, es realizar pruebas de inhibidores, añadiendo a una muestra de ADN extraído de un híbrido, ADN de una muestra que se conoce positiva, posteriormente debe realizarse una amplificación de la mezcla, para verificar que no existe presencia de inhibidores en la muestra extraída del híbrido.
- ✓ Cuando sea logísticamente posible, se recomienda la toma de muestras de inflorescencia, en los híbridos Mapan, ya que se observa un mayor porcentaje de detección del fitoplasma en ese tejido. Sin embargo para poder afianzar las conclusiones obtenidas de este trabajo de investigación, se recomienda incrementar el número de muestras a analizar usando ambos tejidos, y para la obtención de las mismas, la manera más factible es realizar el muestreo usando un automóvil.
- ✓ Debido a los problemas con enfermedades diferentes al ALC en las variedades resistentes, es recomendable complementar los programas de replantación con programas efectivos de capacitación, que aseguren que los beneficiarios de las plantas comprendan, que estas no son "super palmas" resistentes a todas las enfermedades, las cuales deben aprender a prevenir y manejar, y que el material resistente requiere de ciertos cuidados, los cuales no eran necesarios en la variedad criolla susceptible, alto del atlántico.

- ✓ Se recomienda, realizar un muestreo de cocoteros sintomáticos en la zona sur del país, debido a que se encontraron dos muestras positivas usando nPCR, con los iniciadores grupo específicos en la Universidad de Florida.
- ✓ Para el diagnóstico de la pudrición del cogollo, deben agregarse antibióticos y fungicidas a los medios de cultivo (v8 y agar zanahoria), ya que estos probablemente permitan aislar *Phytophthora* sp., aún de muestras tan contaminadas, como las que se obtienen de cocotero después de varios días de transporte, desde el lugar de muestro hasta el centro de diagnóstico de Zamorano.
- ✓ Durante una reunión de la red Wafaluma, deben distribuirse algunos manuales de muestreo, acompañados de una demostración práctica de la toma de muestras, tal y como se instruye en el manual de muestreo, para que los técnicos asistentes puedan familiarizarse con la técnica y hacer las preguntas pertinentes al equipo de investigación del amarillamiento letal del cocotero de Zamorano.
- ✓ Para mejorar la calidad de los resultados, obtenidos en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, debe mejorarse la calidad del sistema fotográfico actual (cámara, transiluminador y cuarto oscuro).

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. 2 ed. México D.F., Limusa. 838 p.
- ALVARADO, L. s.f. Amarillamiento letal del cocotero en Honduras. Tegucigalpa, Honduras, Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria. s.p.
- ARANDA ROCHA, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/ Escuela Agrícola Panamericana. 78 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.
- BARRADAS VILLANUEVA, J.; PIÑA RAZO, J.; CARRILLO RAMIREZ, H. s.f. El amarillamiento letal del cocotero. 10 p.
- CARITÁS DE 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. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. 538 p.
- CIAT. 1995. Protocolos para Escaleraes moleculares. Ed. D. O. Gonzáles; N. Palacios; G. Gallego. J. Tohme. Calí, Colombia, CIAT. 82 p.
- CLAROS DÍAZ, M. G. 2000. Marcadores moleculares: qué son, cómo se obtienen y para qué valen. www.uma.es/Estudios/Centros/Ciencias/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html visitada en Junio, 2000.
- COMPENDIUM OF TROPICAL FRUIT DISEASES. 1994. Ed. R.C. Ploetz; G.A. Zentmyer; W.T. Nishijima; K.G. Rohrbach; H.D. Ohr. Minnesota, EE.UU., APS Press. 88 p.
- DISEASES AND DISORDERS OF ORNAMENTAL PALMS. 1993. Ed. por A.R. Chase, T.K. Broschat. Minnesota, EEUU., APS press. 56 p.
- 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.

EDEN-GREEN, S.J. 1995. A brief history of lethal yellowing research. *In* Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects. Ed. por C. Oropeza, F.W. Howard y G. R. Ashburner. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 17-33.

ERWIN, C.D.; RIBEIRO, O.K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. Minnesota, EE.UU., APS Press. 562 p.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia mediterranea*, 35, 144-151.

HARRIES, H. 1999. A report on the coconut varieties in Honduras and the options for LYD rehabilitacion. La lima, Honduras, Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. s.p.

HARRIES, H. 2000¹. <http://groups.yahoo.com/group/CICLY/message/283> visitada en Julio, 2001.

HARRIES, H. 2000². <http://groups.yahoo.com/group/CICLY/message/285> visitada en Julio, 2001.

HARRISON ALVERGUE, B. 2000. Diagnóstico molecular y evaluación de la resistencia de los híbridos MAPAN al Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Tesis Lic. Zamorano, Honduras. Programa de Ingeniería de Zamorano/ 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.; HARRISON, N.A. 1999. Lethal Yellowing of palms. <http://www.ftld.ufl.edu/lyfacts.htm>.

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.

IILINWORTH, R. 2000. Citas sobre las ventajas de los cocos híbridos. s.n.t.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. 1990. Optimization of PCRs. *In* PCR protocols: Protocols A guide to methods and applications. Ed. Por M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White. California, EE. UU. Academic Press. p. 3 -12.

JACKSON, D.P.; HAYDEN, J.D.; QUIRKE, P. 1991. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. *In*. PCR a Practical approach. Ed. por M. J. McPherson, P. Quirke y G. R. Taylor. Nueva York, EE. UU. Oxford University Press. p. 1: 29-45.

JONES, P. 1999. The history and biology of yellows diseases and phytoplasmas. *In* Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia. (1998, Manado, Indonesia). Ed. por D. Allorerung; H.C. Harries; P. Jones; J.S. Warokka. Jakarta, Indonesia, Asian & Pacific coconut community. 83 - 93 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.

LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R.D.; GUNDERSEN, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* (EE.UU.) 83 (8): 834 – 842.

LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R.; BARTOSZYK, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of systematic bacteriology* (G.B.) no. 48: 1153-1169.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. SAMBROOK, J. 1998. Molecular Cloning A Laboratory Manual. EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory. 545 p.

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.

MOCTEZUMA, E. V.; KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. México D.F., México. Mundi prensa. 147 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.

ORTÍZ GARCÍA, C. F. 1999. Diseases in coconut of fungal and other origins. *In* Workshop & Lab Course on Coconut Biotechnology. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México. Diciembre 03, 1999. s.n.t.

RAZIN, S.; YOGEV, D. 1995. Restriction endonuclease analysis. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, E.E. U.U. Academic Press. p. 355 -368.

RFLP, PCR y estructura de genes procarióticos y eucarióticos.
2001. <http://www.bio.puc.cl/cursos/bio288/clase4.htm>, visitada en Julio 2001.

ROCA de DOYLE, M. M. 2000. Propuesta de investigación:
Programa de rehabilitación del cocotero. Zamorano, Honduras. [4]
p.

ROCA de DOYLE, M. M. 2001. News from Honduras. Mensaje 848.
<http://www.yahogroups.com/messages/CICLY>, visitada en Julio, 2001.

SIGMA, 2001. www.sigma-aldrich.com, visitada en marzo, 2001.

SCHNEIDER, B.; SEEMÜELLER, E. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied and environmental microbiology*. 60(9): 3409 – 3412.

SCHNEIDER, B.; SEEMÜELLER, E.; SMART, D. C.; KIRKPATRICK, C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma - like organisms or phytoplasmas. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, E.E. U.U. Academic Press. p. 369 -380.

STEER, J.D. 1997. History of lethal yellowing disease, research and rehabilitation programmes in Jamaica. *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. 61 - 67.

STRYER, L. 1995. Biochemistry. 4ta edición. W.H. Freeman and Co. 1064 p.

VAN ECK, H. J. 1999. LIST OF ACRONYMS, used in literature on genome research.
www.spg.wau.nl/pv/aflp/acronyms.html, visitada en Julio 2001.

8. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reacciones de digestión con enzimas de restricción

Día 1

- 5.0 µl de producto de amplificación (varia de acuerdo a la intensidad de la banda)
- 0.5 µl de enzima (10 U/µl)
- 1.5 µl de buffer de la enzima
- 8.0 µl de agua destilada estéril (debe modificarse, para completar 15 µl de volumen final)
- 15.0 µl Total (incubar a la temperatura indicada, hasta el día siguiente)

Día 2

A la mezcla del día uno, agregar:

- 0.5 µl de enzima
- 0.5 µl de buffer
- 4.0 µl de agua destilada estéril
- 20.0 µl total (incubar a la temperatura indicada, hasta el día siguiente)

Detener la reacción, colocándola a 65 °C durante 5 min.

Anexo 2. Protocolos para la preparación de geles de poliacrilamida al 8%

Solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%

- 29.0 g acrilamida
- 1.0 g bisacrilamida

Pesar y aforar a 100 ml con agua destilada estéril. Si la solución se ve turbia filtrar y almacenar en un frasco oscuro a 4 °C. La solución es útil hasta que se vuelve de un color amarillento, en ese momento agregue TEMED para que se polimerize y posteriormente descarte.

TBE 5X

54.0 g de Tris
27.5 g de ácido bórico
20.0 ml de EDTA 0.5M pH 8

Solución de persulfato de amonio al 1%

0.1 g de persulfato de amonio
1.0 ml de agua destilada estéril

Mezcle en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Descarte la solución no utilizada.

Gel de acrilamida al 8%

6.65 ml de solución acrilamida-bisacrilamida al 30%
13.17 ml de agua destilada estéril
5.0 ml de TBE 5X
175.0 μ l de persulfato de amonio al 1% (preparado en ese momento)
8.7 μ l de TEMED

Mezclar y verter en el molde para la gel. Tiempo aproximado de polimerización: 1:30 h.

Escalera molecular (1 Kb DNA ladder Gibco)

10 μ l de 1 Kb DNA ladder
20 μ l de buffer de carga
70 μ l de agua destilada
100 μ l

Escalera molecular (pGEM Promega)

17.2 μ l de TBE 1X
2.0 μ l de buffer de carga (6X blue/orange, Promega)
0.8 μ l de pGEM (1mg/ml)
20.0 μ l, usar 10 μ l/celda

Anexo 3. Manual de muestreo

MANUAL DE TOMA DE MUESTRAS DE COCOTERO (*Cocos nucifera*) PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

OBJETIVOS

- ✓ Adaptar el manual de muestreo para la detección del Amarillamiento Letal del Cocotero, publicado por el Centro de Investigación Científica de Yucatán, con el fin de obtener un manual apropiado, para apoyar a los técnicos involucrados en programas de lucha contra la enfermedad en Honduras y en otros países de la región.
- ✓ Instruir a técnicos de la región en la selección, toma, conservación y envío de muestras de cocotero para la detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

INTRODUCCIÓN

Morales (1994) afirma que “ el coco es un ingrediente de la mayoría de alimentos consumidos por las familias, Garífunas de la costa norte de Honduras, se utiliza en la preparación de sopas, arroz, aceite y bebidas, además es un componente principal en la elaboración de pan y dulces... el coco es un elemento que está presente en todas las parcelas, en solares de las viviendas, a la orilla de la playa, en asocio con banano, como cerca viva y en potreros...”, lo cual demuestra que el cocotero es parte esencial en la dieta y cultura de los pueblos Garífunas de Honduras.

Los mismos que en estos momentos encaran la crisis causada por la reciente llegada del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) a las costas hondureñas, tambaleándose así uno de los pilares básicos de su forma de vida.

Sin embargo el ALC no es la única enfermedad que afecta al cocotero, los problemas fitosanitarios más comunes que afectan al cocotero en Honduras son:

1. Anillo rojo, causado por un nemátodo (*Bursaphelenchus cocophilus*, antes conocido como *Rhadinaphelenchus cocophilus*), transmitida por el picudo del coco (*Rhynchophorus palmarum*).

2. Marchitez de cedros o Hartrot (*Phytomonas*), transmitida por una chinche de la familia pentatomidae (*Lincus* sp.).
3. Pudrición del cogollo, causada por un hongo (*Phytophthora* spp.).
4. Amarillamiento Letal del Cocotero (Fitoplasma), transmitido por una chicharrita de la familia cixidae (*Myndus crudus*).

Estas enfermedades presentan síntomas muy parecidos (cuadro 1), caracterizándose todas por un amarillamiento de las hojas, lo cual puede fácilmente crear confusiones entre ellas, sin embargo todas requieren diferentes medidas de control, por lo tanto es necesario diagnosticarlas para poder manejarlas eficientemente.

Cuadro 1. Síntomas de Anillo Rojo, Pudrición del Cogollo, Hartrot y Amarillamiento Letal del Cocotero(ALC).

ANILLO ROJO	PUDRICIÓN DEL COGOLLO	HARTROT	ALC
<ol style="list-style-type: none"> 1. Caída de frutos 2. Oscurecimiento de las inflorescencias 3. Se observa tono amarillo y castaño en las hojas 4. Caída de hojas 5. Muerte del cogollo 6. Se observa un anillo rojo en un corte transversal del tallo. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Clorosis y marchitez de la hoja bandera. 2. Las hojas que no se han desplegado pueden presentar lesiones de color café oscuro, que producen un olor particular. 3. Doblamiento de la hoja bandera. 4. El tejido infectado tiene una apariencia aceitosa de color café claro a amarillento 5. Amarillamiento descendente. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Necrosis de las inflorescencias 2. Amarillamiento ascendente 4. Caída de las hojas 5. Apariencia de poste telefónico 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Caída de frutos de todos los tamaños 2. Necrosis de las inflorescencias 3. Amarillamiento progresivo desde las hojas basales 4. Caída de las hojas 5. Apariencia de poste telefónico

TEJIDO PARA MUESTREO

En el laboratorio de Zamorano se realizan diagnósticos moleculares del fitoplasma causante del ALC. Sin embargo un diagnóstico efectivo comienza con una buena toma de muestras.

Para la detección del fitoplasma pueden usarse varios tipos de tejidos, tales como hojas inmaduras, ápice meristemático, aserrín del tallo e inflorescencias inmaduras, sin embargo, en este manual nos referiremos a los últimos dos tipos de muestras, que presentan ventajas y desventajas (cuadro 2).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de muestras de aserrín e inflorescencia para la detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

INFLORESCENCIAS INMADURAS		ASERRÍN DEL TALLO	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Se requiere de una navaja bien afilada para tomar la muestra.	Si el cocotero es muy alto, difícil de obtener.	Fácil de obtener, aún en cocoteros muy altos.	Se requiere de un taladro para tomar la muestra.
La muestra se encuentra estéril.	Si el cocotero no está infectado, pérdida de una inflorescencia.		La muestra puede contener contaminantes.
Permite una detección temprana del fitoplasma.			Detección un poco más tardía del fitoplasma.

TOMA DE MUESTRAS

1. Identificación del cocotero y toma de datos.

Es muy importante poder reconocer el cocotero del cual se tomó la muestra, para poder relacionar los resultados del diagnóstico con los síntomas observados. Para esto se recomienda identificar el cocotero muestreado, pintando el número asignado a la muestra en el tronco, usando pintura de aceite para evitar que se lave con la lluvia (figura 1).

Para completar la información necesaria en el laboratorio debe enviarse junto con la muestra una hoja que contenga información acerca de los síntomas observados, número de la muestra (el mismo con el que se identificó el cocotero), ubicación y cualquier otra información que pueda ser de importancia para el diagnóstico (anexo 1).

Figura 1. Identificación del cocotero y toma de datos.



2. Desinfección del equipo de muestreo.

Lavar la broca del taladro o la navaja con una solución de cloro al 3% (anexo 2). Elimine el exceso de cloro lavando la broca o navaja con agua limpia (agua embotellada). Finalmente seque el instrumento con una hoja de papel toalla o un trozo de papel higiénico, deséchelo (figura 2).

Después de la primera muestra y antes de desinfectar la broca, es recomendable eliminar el tejido que queda en la misma con un palillo de dientes, para hacer más eficiente la desinfección.

No olvide desinfectar la broca o navaja antes de comenzar y después de cada muestra, para evitar la contaminación de la muestra y la transmisión de otros patógenos, NO del fitoplasma.

Figura 2. Desinfección del equipo de muestreo.



3. Toma de la muestra

Aserrín del tronco (figura 3): use una broca de 5/8 ", perforo con el taladro hasta una profundidad de 10 cm., descarte el primer aserrín que obtenga, para eliminar

contaminantes. Recoja la muestra en un tubo que contenga una solución buffer llamada CTAB, esta debe solicitarse a Zamorano. En México el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) ha probado otros métodos de conservación de las muestras, uno de ellos es transportar las muestras dentro de bolsas plásticas, que deben colocarse en una hielera a 4 °C, para conservarlas durante el trayecto desde el sitio de muestreo hasta donde se procesarán las muestras; otro método consiste en secar, por separado el aserrín de cada muestra, en un horno a 36 °C durante toda la noche, posteriormente embolsar, sellar y enviar las muestras lo más pronto posible.

Inflorescencia inmadura (figura 4): elija una inflorescencia sin abrir y córtela desde la base. Ábrala y deposite unos cinco granitos en el tubo con solución buffer CTAB.

No use las manos para manipular ninguna de las dos muestras, recuerde que sus manos tocaran todas las muestras que tome, debe evitar contaminarlas.

Finalmente cierre bien el tubo, séllelo con cinta adhesiva y rotúlelo con el mismo número con que rotuló el cocotero.

Figura 3. Toma de muestra de aserrín



Figura 4. Toma de muestra de inflorescencia



4. Sellado de heridas

En el caso de la muestra de aserrín es necesario sellar la herida que se ha hecho en el tronco, para evitar el ingreso de patógenos (hongos y bacterias), NO del fitoplasma, y la atracción de picudos del cocotero.

Para esto se recomienda colocar un trocito de plasticina en la herida y presionar para asegurar que no se salga.

5. Envío de muestras al laboratorio

Las muestras deben enviarse lo más pronto posible a:

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Laboratorio Molecular, Programa de Protección Vegetal
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Zamorano, Francisco Morazán.

Recuerde que las muestras en CTAB no necesitan refrigeración. Las muestras que han sido colocadas en bolsa plásticas, deben enviarse en una hielera a 4 °C, en un plazo no mayor de 3 días después de su recolección y las muestras secas deben enviarse lo más pronto posible, en bolsas plásticas.

INFORMACIÓN ADICIONAL

Contactar a:

- Maria Mercedes Roca de Doyle
mmroca@zamorano.edu.hn
- Estela Aguilar
esteyaa@yahoo.com
- Melissa Castillo
mcastilloli2@onebox.com

Laboratorio Molecular
Tel: 776 61 40 ext 2362
Fax: 776 62 42

BIBLIOGRAFÍA

1. MORALES MARTÍNEZ, J.J. 1994. Estudio del sistema agrario en una comunidad Garífuna de Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. p.90.
2. OROPEZA, C; CORDOVA, 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 Yucatan (CICY), Merida, México. 4p.

ANEXOS

1. Hoja de datos que acompañan a una muestra de cocotero para la detección del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Fecha: _____

Responsable: _____

		SÍNTOMAS	
--	--	-----------------	--

UBICACIÓN	# DE MUESTRA	COCOS	INFLORESCENCIA	HOJAS	OBSERVACIONES (edad y variedad)

2. Preparación de la solución de cloro al 3%.

Para preparar un litro de la solución de cloro al 3% se debe mezclar 546 ml de cloro Comercial con 456 ml de agua potable.

Anexo 4. 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.

Anexo 5. 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

Anexo 6. Buffer de carga y escalera molecular *EcoRI/HindIII*

Buffer de carga

0.25 % de azul de bromofenol
0.25% de xilene cyanol
30% de glicerina

Mezclar con agua para preparar una solución madre, la cual luego se diluye con el buffer de corrida hasta alcanzar un color azul claro.

Escalera molecular *Eco RI/HindIII*

0.75 µl de Lambda DNA/*Eco RI + Hind III* (0.5 mg/ml)
9.25 µl de buffer de carga
10.0 µl total, usar para una celda

Anexo 7. 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

Anexo 8. Protocolos para la preparación de medios de cultivo para *Phytophthora* sp.

Medio V8 clarificado

1.50 g de Carbonato de Calcio
150.0 ml de jugo V8
0.5 g de β-sitosterol
15.0 g de agar

Disuelva el Carbonato de Calcio en el V8. Clarifique el jugo centrifugándolo por 5 min. Combine 100 ml del sobrenadante con 900 ml de agua, agregue el β-sitosterol y el agar. Mezcle aplicando calor hasta disolver. Esterilizar en el autoclave por 20 min. 121 °C 15 psi.

Agar zanahoria

200 g de Zanahoria
500 ml de agua destilada
15 g de agar

Pesar 200 g de zanahorias y licuar en 500 ml de agua destilada por 40 segundos. Filtrar el jugo obtenido a través de un tamiz fino y adicionar 15 g de agar. Hervir hasta que se disuelva el agar y luego aforar a un litro. Esterilizar en el autoclave por 20 min. 121 °C 15 psi.

Anexo 9. Programas para el termociclador

Iniciadores universales P1 y P7, en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano, hasta el 12 de Julio de 2001

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.

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.

Anexo 10. Protocolos para la reamplificación (nPCR) de productos de P1/P7, usando los iniciadores grupo específicos LY16s y LY16s/23sr.

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

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.

Anexo 11. 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 microcentrifuga, 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.

Anexo 12. Secuencias y comparación de los operones del fitoplasma causante del ALC en Florida.

Florida coconut LY phytoplasma (Juno Beach) rDNA operon 1

(P1/P7 product), Length: 1808 December 21, 2000..

```
1 AGTTTGATCC TGGCTCAGGA TTAACGCTGG CGGCGTGCTT AATACATGCA
51 AGTCGAACGG AAATCTTTTA GATTTTAGTG GCGAACGGGT GAGTAACACG
101 TAAGCAACCT GCCTTTAAGA CGAGAATAAC AATTGGAAAC AGTTGCTAAG
151 GCTGGATAGG AAATAAAAAAG GCATCTTTTT ATTTTTAAAA GACCTTTTTTC
201 GGAAGGTATG CTTAAAGAGG GGCTTGCGTC ACATTAGTTA GTTGGTAGGG
251 TAAAGGCCTA CCAAGACGAT GATGTGTAGC TGGACTGAGA GGTGGAACAG
301 CCACATTGGG ACTGAGACAC GGCCCAAACCT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG
351 GGAATTTTCG GCAATGGAGG AAACCTCTGAC CGAGCAACGC CGCGTGAACG
401 ACGAAGTACT TCGGTATGTA AAGTTCTTTT ATTGAAGAAG AAACAATAGT
451 GGAAAAACTA TCTTGACGTT ATTCAATGAA TAAGCCCCGG CTAACTATGT
501 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC ATAGGGGGCG AGCGTTATCC GGAATTATTG
551 GGCGTAAAGG GTGCGTAGGC GGTTTAATAA GTCTCTAGTT TAATTTCAAC
601 GCTTAACGTT GTCCTGCTAG AGAAACTGTT TAACTAGAGT GAGATAGAGG
651 TAAGCGGAAT TCCATGTGTA GCGGTAAAAAT GTGTAAATAT ATGGAGGAAC
701 ACCAGAGGCG TAGGCGGCTT ACTGGGTCTT TACTGACGCT GATGCACGAA
751 AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTA AAC
801 TATGAGTACT AAGTGTGCGG GTTAAACTCG G TACTG AAGT TAACACATTA
851 AGTACTCCGC CTGAGTAGTA CGTACGCAAG TATGAAACTT AAAGGAATTG
901 ACGGGATCCC GCACAAGCGG TGGATCATGT TGTTTAATTC GAAGATACAC
951 GAAAAACCTT ACCAGGTCTT GACATACTCT GCAAAGCTAT AGAAATATAG
1001 TGGAGGTAT CAGGGATACA GGTGGTGCAT GGTGTGCGTC AGCTCGTGTC
1051 GTGAGATGTT AGGTTAAGTT CTAAAACGAG CGCAACCCCT GTCGTTAATT
1101 GCCAGCACGT TATGGTGGGG ACTTTAGCGA GACTGCCAAT GAAAAATTGG
1151 AGGAAGGTGG GGATTACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG ATCTGGGCTA
1201 CAAACGTGAT ACAATGGCTA TTACAAAGAG TAGCTGAAAC GCGAGTTTTC
1251 GCAAATCTC AAAAAAATAG TCTCAGTTCG GATTGAAGTC TGCAACTCGA
1301 CTTCAATGAAG TTGGAATCGC TAGTAATCGC GAATCAGCAT GTCGCGTGTA
1351 ATACGTTCTC GGGGTTTGTA CACACCGCCC GTCAAACCAC GAAAGTGGAC
1401 AATACTCGAA AGCGACAGCC TAACTGCGTA AGCAGAGGGA ATCGTCTAAG
1451 GTAGGGTCGA TGATTGGGGT TAAGTCGTAA CAAGGTATCC CTACCGGAAG
1501 GTGGGGATGG ATCACCTCCT TTCTAAGGAA ATTTTTTAAA ATCATCATCT
1551 TCAGTTTTGA AAGACTTAAG TTAATTTAAA AAAATAAGTT TTTCTTTTTT
1601 TTCATTAGTT AATTCTTTTA ATATAATATT CTTTAAGATT TTAAGGGCCT
1651 ATAGCTCAGT TGGTTAGAGC ACACGCCTGA TAAGCGTGAG GTCGGTGGTT
1701 CAAGTCCATT TAGGCCACC AGTCTAAATG TACTGAAAAT CAAAAAGTT
1751 CTTTGAAAAG TAGATAAACA ACGTAAATTC TCAAAATAAT GAAGAAAAAA
1801 GGGCGTCA
```

Florida coconut LY phytoplasma (Juno Beach) rDNA operon 2
(P1/P7 product), Length: 1808 December 21, 2000..

```
1 AGTTTGATCC TGGCTCAGGA TTAACGCTGG CGGCGTGCTT AATACATGCA
51 AGTCGAACGG AAATCTTTTA GATTTTAGTG GCGAACGGGT GAGTAACACG
101 TAAGCAACCT GCCTTTAAGA CGAGAATAAC AATTGGAAAC AGTTGCTAAG
151 GCTGGATAGG AAATAAAAAAG GAATCTTTTT ATTTTTAAAA GACCTTTTTTC
201 GGAAGGTATG CTTAAAGAGG GGCTTGCGTC ACATTAGTTA GTTGGTAGGG
251 TAAAGGCCTA CCAAGACGAT GATGTGTAGC TGGACTGAGA GGTGGAACAG
301 CCACATTGGG ACTGAGACAC GGCCCAAACCT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG
351 GGAATTTTCG GCAATGGAGG AAACCTCTGAC CGAGCAACGC CGCGTGAACG
401 ACGAAGTACT TCGGTATGTA AAGTTCTTTT ATTGAAGAAG AAACAATAGT
451 GGAAAAACTA TCTTGACGTT ATTCAATGAA TAAGCCCCGG CTAACTATGT
501 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC ATAGGGGGCG AGCGTTATCC GGAATTATTG
551 GGCGTAAAGG GTGCGTAGGC GGTTTAATAA GTCTCTAGTT TAATTTCAAC
601 GCTTAACGTT GTCCTGCTAG AGAAACTGTT TAACTAGAGT GAGATAGAGG
651 TAAGCGGAAT TCCATGTGTA GCGGTAAAAAT GTGTAAATAT ATGGAGGAAC
```



```

|||||
1701 CAAGTCCATTAGGCCACCAGTCTAAATGTACTGAAAATCAAAAAAGTT 1750
1751 CTTTGAAAAGTAGATAAACACGTAATTTCTCAAAAATAATGAAGAAAAAA 1800
|||||
1751 CTTTGAAAAGTAGATAAACACGTAATTTCTCAAAAATAATGAAGAAAAAA 1800

1801 GGGCGTCA 1808
|||||
1801 GGGCGTCA 1808

```

Anexo 13. Detalle de los resultados del cuarto muestreo realizado en la plantación Salado Lis Lis

Reporte de los resultados obtenidos de las muestras recolectadas durante el cuarto muestreo en la plantación de Salado Lis Lis. Junio, 2000.

Número	Escala	Síntomas			Observaciones	Resultados	
		Cocos	Inflorescencias	Hojas		P1/P7	LYR1/LYF1
4 SLL ALC 1	3	No hay	No se observa	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 2	3	Caídos	No se observa	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 3	3	Caídos	Normales	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 4	3	Caídos	Necrótica	1/3 secas		-	
4 SLL ALC 5	3	No parido	No se observa	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 6	4	No hay	No se observa	Marchitas		-	
4 SLL ALC 7	4	No hay	Necrótica	2/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 8	3	No hay	Necrótica	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 9	3	No parido	No se observa	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 10	3	No hay	Necrótica	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 11	3	No hay	Necrótica	1/3 amarillas		+	+
4 SLL ALC 12	3	Caídos	Necrótica	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 13	3	Caídos	Necrótica	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 14	4	Caídos	Necrótica	1/3 secas		-	

4 SLL ALC 15	3	Caídos	Necrótica	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 16	4	Caídos	Necrótica	1/3 secas		-	
4 SLL ALC 17	4	No hay	Necrótica	2/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 18	2	Caídos	Necrótica	Normales	Aserrín e inflorescencia	-	
4 SLL ALC 19	2	No hay	Normales	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 20	3	No hay	Necrótica	1/3 marchitas		-	
4 SLL ALC 21	4	Caídos	Necrótica	1/3 secas		-	
4 SLL ALC 22	4	Normales	Necrótica	1/3 secas, 1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 23	4	No hay	Necrótica	1/3 marchitas		-	
4 SLL ALC 24	4	Pequeños con roña	Seca	1/3 marchitas		-	
4 SLL ALC 25	2	Normales	Necrótica	Normales		-	
4 SLL ALC 26	3	Normales	Necrótica	Amarillas		-	
4 SLL ALC 27	2	Caídos	Necrótica	Normales		-	
4 SLL ALC 28	3	Caídos	Necrótica	1/3 bronceadas		-	
4 SLL ALC 29	3	Normales	Necrótica	1/3 bronceadas		-	
4 SLL ALC 30	4	Normales	No se observa	2/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 31	3	Caídos	Necrótica	1/3 bronceadas		-	
4 SLL ALC 32	3	Caídos	Necrótica	1/3 bronceadas		-	
4 SLL ALC 33	3	Caídos	Necrótica	1/3 bronceadas		-	
4 SLL ALC 34	1	Caídos	No se observa	Normales		-	
4 SLL ALC 35	2	Caídos	Necrótica	Normales		-	
4 SLL ALC 36	2	Normales	Necrótica	Normales	Inflorescencia	-	

4 SLL ALC 37	4	Normales	No se observa	2/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 38	3	No hay	Necrótica	1/3 amarillas	Inflorescencia	+	+
4 SLL ALC 39	2	No hay	Necrótica	Normales		-	
4 SLL ALC 40	4	Caídos	Necrótica	Secas	Inflorescencia	+	-
4 SLL ALC 41	2	Caídos	Necrótica	Normales	Inflorescencia	-	
4 SLL ALC 42	2	No hay	Necrótica	Normales		-	
4 SLL ALC 43	3	Normales	Seca	Normales	Inflorescencia	-	
4 SLL ALC 44	4	No parido	Necrótica	2/3 amarillas	Inflorescencia	-	
4 SLL ALC 45	4	Pequeños	Necrótica	2/3 amarillas	Inflorescencia	-	
4 SLL ALC 46	3	No hay	Necrótica	1/3 amarillas	Inflorescencia	+	+
4 SLL ALC 47	3	Caídos	Necrótica	1/3 amarillas		-	
4 SLL ALC 48	3	No hay	Seca	Normales		-	
4 SLL ALC 49	2	No hay	Necrótica	Normales	Inflorescencia	-	
4 SLL ALC 50	3	No hay	Necrótica	1/3 amarillas	Inflorescencia	-	

Escala: 0) asintomático, 1) caída de cocos, 2) inflorescencias necróticas, 3) 1/3 del follaje amarillo e inflorescencias secas, 4) todo el follaje amarillo o seco y 5) poste telefónico.

Anexo 14. Secuencia del contaminante amplificado por los iniciadores P1 y P7 en Fort Lauderdale Research and Education Center.

Unknown prokaryote 16S rRNA gene sequence primed from coconut
Palm 4-4-00..

```

1 AGTTTGATCC TGGCTCAGGA TTAACGCTGG CGGCGTGCCT AATACATGCA
51 AGTCGAACGC ACTGTGGTTC AACTGATTTG AAGAGCCTGC TCTGATATGA
101 CGATGAACAT TGCAGTGAGT GGCGAACGGG TGAGTAACAC GTGGGAAACC
151 TACCTCTTAG CGGGGGATAA CATCTGGAAA CAGATGCTAA TACCGCATAA
201 CACTAGCAAC CGCATGGTTG CTA CTGAAA GATGGTTCTG CTATCACTAA
251 GAGATGGTCC CGCGGCGCAT TAGTTAGTTG GTGAGGTAAT GGCTCACCAA
301 GACGATGATG CGTAGCCGAG TTGAGAGACT GATCGGCCAC AATGGGACTG
351 AGACACGGCC CATACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCACAA
401 TGGACGAAAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG TGTGTGATGA AGGGTTTCGG
451 CTCGTA AAAAC ACTGTTGTAA GAGAAGAATA GCATCAAGAG TAACTGCTTG
501 GTGTGTGACG GTATCTTACC AGAAAGGAAC GGCTAAATAC GTGCCAGCAG

```

551 CCGCGGTAAT ACGTATGTTC CAAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA
 601 GCGAGCGCAG ACGGTTTTTTT AAGTCCGAAG TGAAAGCCCA CAGCTTAACT
 651 GTGGAAGTGC TTTGGAAACT GGATGACTTG AGTGCAGTAG AGGAGAGTGG
 701 AATTCCATGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATATGGAGG AACACCAGTG
 751 GCGAAGGCGG CTCTCTGGAC TGTAAGTAC GATTGAGGCTC GAAAGTGTGG
 801 GTAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACACCGTA AACGATGAGT
 851 GCTAGATGTT TGGGGGTTTC CGCCCCTAAG TGTCGCAGCT AACGCATTAA
 901 GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GACCGCAAGG TTGAAACTCA AAGGAATTGA
 951 CGGGGACCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACGCG
 1001 AAGAACCTTA CCAGGTCTTG ACATCCTTTG ATCACGCCAG AAATGGCGCT
 1051 TTCCCTTCGG GGACAAAGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT
 1101 GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTATTACTA
 1151 GTTGCCAGCA TTCAGTTGGG CACTCTAGTG AGACTGCCGG TGACAAACCG
 1201 GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT
 1251 ACACACGTGC TACAATGGCA AGTACAACGA GTCGCTAACC CGCGAGGGTA
 1301 CGCAAATCTC TTAAAGCTTG TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC
 1351 CTACATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GTCGCGGTGA
 1401 ATACGTTCTC GGGGTTTGTA CACACCGCCC GTCAAACCAC GAAAGTGGAC
 1451 AATACCGGAA AGCGATAGCC TAACTGCGCA AGCAGAGGGA ATCGTCTAAG
 1501 GTAGGGTCGA TGATTGGGGT TAAGTCGTAA CAAGGTATCC CTACCGGAAG
 1551 GTGGGGATGG ATCACCTCCT TTCT

Anexo 15. Glosario de términos

Ácido desoxirribonucleico (ADN): polímero nucleotídico que lleva la información genética en virus, bacterias y organismos superiores (Moctezuma y Kahl, 2000).

Ácido ribonucleico (ARN): ácido orgánico compuesto de los nucleótidos adenina, citosina, guanina y uracilo.

Agarosa: sustancia purificada de algas marinas que se disuelve en agua hirviendo y luego se solidifica en un gel, cuando la solución se enfría (Kreuzer y Massey, 1996).

Buffer de carga: mezcla de colorantes en una solución viscosa de glicerol, sacarosa o ficoll, usada para incrementar la densidad de las muestras de ADN, ARN o proteínas antes de colocarlas en los pozos de la gel (Moctezuma y Kahl, 2000).

Electroforesis: movimiento de moléculas cargadas en solución a través de un campo eléctrico; método para separar una molécula cargada en un campo eléctrico y en un soporte (gel) exponiendo diferencias en la carga eléctrica, en la forma y el tamaño de las

molécula. El soporte gelificado generalmente se hace en agar, agarosa, almidón o poliacrilamida (Moctezuma y Kahl, 2000).

Enzimas de restricción: cualquier enzima bacteriana que reconoce secuencias nucleotídicas blanco específicas en ADN de doble cadena, cataliza el rompimiento de enlaces internos entre nucleótidos específicos en esos sitios, produciendo un rompimiento en la doble cadena (Moctezuma y Kahl, 2000).

Epidemiología: estudio de los factores que influyen los aumentos o disminución en la cantidad de la enfermedad en una población a través del tiempo (Castaño – Zapata, 1994).

Escalera molecular: mezcla de fragmentos de ácidos nucleicos con masa molecular conocida, usados para la determinación del peso molecular de las moléculas de ácidos nucleicos después de su separación por electroforesis (Moctezuma y Kahl, 2000).

Fitoplasma: organismos similares a micoplasmas (OSM), carentes de pared celular, que no crecen sobre medios de cultivo y son susceptibles al tratamiento con oxitetraciclinas.

Iniciadores ("primers"): oligonucleótido que complementa a región corta o larga de moléculas de ADN o ARN; estos oligonucleótidos proveen el extremo 3'OH como sustrato al que cualquier enzima ADN polimerasa puede adicionar nucleótidos en dirección 5' - 3' (Moctezuma y Kahl, 2000).

Marcadores moleculares: son una herramienta para el análisis genómico, con los cuales se busca identificar y medir la variabilidad genética de un organismo (Aranda 2000).

nPCR: proceso que requiere de dos amplificaciones consecutivas, en la primera se usan un par de iniciadores y en la segunda otro par de iniciadores cuyo sitio de ligamiento se encuentra dentro de la secuencia amplificada por el primer par de iniciadores, es decir que el fragmento amplificado en la primera amplificación se usa como muestra para la segunda amplificación (Jackson *et.al.*, 1991).

PCR: procedimiento de síntesis y duplicación *In vitro* mediante el cual fragmentos de ADN mayores de 15 kilobases de longitud pueden amplificarse alrededor de 10^8 veces (Moctezuma y Kahl, 2000).

Poliacrilamida: polímero de acrilamida que se mezcla con bisacrilamida y un catalizador para preparar una gel, la cual se corre verticalmente (Kreuzer y Massey, 1996).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's): la variación de la longitud de los fragmentos de ADN, producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de

ADN's genómicos de dos o más individuos de una especie (Moctezuma y Kahl, 2000).

Vector: agente transmisor de una enfermedad.