

Variabilidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras

Ayna Isabel Salas Romero

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Diciembre, 2004

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 en Licenciatura.

presentado por:

Ayna Isabel Salas Romero

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2004

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

Ayna Isabel Salas Romero

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2004

Variabilidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras

Presentado por:

Ayna Isabel Salas Romero
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Aprobado:

Maria Mercedes Roca, Ph.D.
Asesora Principal

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

Melissa Castillo, Ing. Agr.
Asesora

Aurelio Revilla, M.S.A.
Decano Académico Interino

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador Área Temática

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

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerzas a cada momento.

A mi papá por ser mi inspiración durante estos cuatro años.

A mi mamá por ser mi ejemplo de vida.

A mis hermanos por su apoyo y cariño.

A Adriana V. por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

A M. Mercedes, M. del Pilar, M. José, M. Soledad y tía Lilian por darme todo el apoyo necesario.

A Melissa, mi asesora pero sobre todo amiga, por su amistad, ayuda y consejos durante mi cuarto año en Zamorano.

A mi asesora Dra. María Mercedes por su tiempo y la oportunidad de realizar esta tesis.

A mis amigas de toda la vida Daniela y Gabriela por mantener la amistad a pesar de la distancia.

A Fanny por su amistad sincera, apoyo, regaños y por siempre arrancarme una sonrisa aún en los peores momentos.

A Paola por estar siempre conmigo cuando más la necesitaba.

A mi mejor amigo, Luis Badani, por enseñarme a disfrutar cada momento en esta vida.

A Erick por su amistad y por cada uno de los detalles que alegraron mis días.

A Luis por llenar esta etapa de mi vida de aprendizaje y buenos recuerdos.

A mis amigos Fausto, Rene, Javier Botto, Gustavo, Gonzalo, Verónica, Francisco por todos los buenos momentos que compartimos durante estos cuatro años.

A Thelma por su alegría y confianza.

A Guillermo por su cariño y comprensión.

A todas las personas de Zamorano que no están entre estas líneas pero que fueron fundamentales durante estos años para la culminación de mis estudios.

RESUMEN

Salas, Ayna. 2004. Variabilidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 20 p.

La epidemia del Amarillamiento Letal del Cocotero está actualmente activa en México, Florida, Honduras y varias islas del Caribe. Existen programas de replantación con variedades resistentes desarrolladas en Jamaica en la década de los setenta, pero en muchas zonas de Jamaica, Florida y posiblemente Honduras se ha registrado un alto porcentaje de mortalidad de dichas variedades. Estos focos de infección son conocidos como “hot spots” y existe la posibilidad de que este fenómeno sea causado por un patotipo diferente o una mutación del fitoplasma causante de la enfermedad. En los programas regionales de manejo del Amarillamiento Letal del Cocotero, se considera una prioridad el estudio de la variabilidad genética del patógeno con técnicas moleculares como los RFLP. El objetivo de este trabajo fue estudiar si en Honduras existe un foco de infección de la enfermedad donde, al igual que en otros países, se ha roto la resistencia de las variedades tolerantes replantadas. Se analizaron muestras recolectadas en las costas norte de Honduras en las zonas de Tela, Miami, La Ensenada, Tornabé, El Progreso y la isla de Guanajaque fueron comparadas con muestras de Jamaica, México, Cuba y Estados Unidos (Florida). Se extrajo ADN de las muestras seguida por un análisis molecular (PCR directa) utilizando los cebadores universales P1 y P7, y por PCR anidada (nPCR) con los primers grupo específicos LY16s y LY16s/23Sr. Los productos de la amplificación por nPCR fueron cortados por seis enzimas de restricción que han mostrado polimorfismos en estudios pasados (*Alu I*, *Dde I*, *Hinf I*, *Msp I*, *Rsa I* y *Taq I*). Se encontraron diferentes perfiles en las muestras de Jamaica y Cuba, resultantes de las digestiones con la enzima *Alu I*. En la digestión con la enzima *Msp I* se encontró un polimorfismo en una muestra proveniente de Tornabé, y utilizando la enzima *Rsa I* se encontró un perfil diferente en la muestra de la Ensenada. Los resultados sugieren que existe una variabilidad genética dentro de los aislamientos o patotipos de ALC analizados. Sin embargo ninguno es igual a los patotipos encontrados en los focos de infección de Jamaica o Cuba, que podrían ser causantes del rompimiento de la resistencia en algunas zonas afectadas por el ALC. Es necesario seguir con más estudios de este tipo para establecer las implicaciones biológicas de las diferencias genéticas encontradas.

Palabras clave: *Cocos nucifera*, enzimas de restricción, pérdida de resistencia, RFLP,.

CONTENIDO

	Portadilla.....	Ii
	Autoría.....	Iii
	Página de firmas	Iv
	Dedicatoria.....	v
	Agradecimientos.....	vi
	Resumen.....	vii
	Contenido.....	viii
	Índice de cuadros.....	x
	Índice de figuras.....	xi
	Índice de anexos.....	xii
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	El Amarillamiento Letal del Cocotero	1
1.1.1	Historia.....	1
1.1.2	Síntomas.....	1
1.1.3	Agente causal y vector.....	1
1.1.4	Impacto de la enfermedad.....	2
1.2	Utilización de las técnicas moleculares en el diagnóstico.....	2
1.2.1	Uso de RFLP's.....	3
1.2.2	Enzimas de restricción.....	3
1.3	Estudios realizados.....	4
2.	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo general.....	5
2.2	Objetivos específicos.....	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1	Muestreo.....	6
3.1.1	Lugares de muestreo.....	6
3.1.2	Método de muestreo.....	7
3.2	Extracción de ADN.....	7
3.3	Amplificación de ADN.....	7
3.4	Utilización de las enzimas de restricción	8
3.4.1	Selección de las enzimas de restricción utilizadas.....	8
3.4.2	Digestión de las muestras.....	8
3.4.3	Geles de poliacrilamida.....	9

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
5.	CONCLUSIONES.....	20
6.	RECOMENDACIONES.....	21
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	22
8.	ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Tiempos de los ciclos del programa del termociclador.....	7
2.	Muestras recolectadas en Mayo de 2004 y los resultados de amplificaciones de ADN.....	10
3.	Polimorfismos encontrados en ADN de fitoplasma causante del ALC con diferentes enzimas de restricción.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Mapa de Honduras mostrando la zona muestreada.....	6
2.	Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción <i>Alu</i> I.....	13
3.	Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción <i>Dde</i> I.....	14
4.	Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción <i>Msp</i> I.....	15
5.	Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción <i>Hinf</i> I.....	16
6.	Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción <i>Rsa</i> I.....	17
7.	Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción <i>Taq</i> I.....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Protocolo de extracción de ADN Doyle & Doyle (1990).....	23
2.	Secuencias de cebadores utilizados.....	23
3.	Mezcla para PCR directa.....	24
4.	Protocolo para digestión con enzimas de restricción.....	24
5.	Sistema de nomenclatura utilizado par nombrar muestras recolectadas.....	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

1.1.1 Historia

Los primeros registros de una enfermedad con síntomas similares al amarillamiento letal provienen de inicios del Siglo XIX en las islas occidentales del Caribe. La enfermedad fue diagnosticada como tal en Florida (Key West) en 1950, en Jamaica en los años 60 y posteriormente en la región de Miami en 1971 (Chinchilla 2003).

Actualmente, la enfermedad se encuentra en gran parte del Caribe (Jamaica, Gran Caimán, Cuba, República Dominicana, Haití, Bahamas), México, Belice, Estados Unidos (Florida y Texas), y más recientemente en Honduras y Guatemala.

La epidemia del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) ha destruido más del 90% de la población de palma de coco (*Cocos nucifera*) de la variedad alto del atlántico en el litoral atlántico hondureño desde 1995.

1.1.2 Síntomas

En la variedad de cocotero alto del atlántico, el primer síntoma es normalmente la caída prematura de los frutos en todos los estados de desarrollo. Inicialmente, la necrosis en la inflorescencia puede ser parcial, pero con el paso del tiempo toda la inflorescencia aparece necrótica. Posteriormente, las hojas toman una coloración amarillenta empezando por las más viejas y progresando hacia las más jóvenes. Eventualmente las hojas afectadas se secan, toman una coloración café claro y permanecen colgando del tronco por algún tiempo. La fase final en la secuencia de síntomas ocurre cuando la región cercana al meristemo en el cogollo muere y se pudre, lo que ocasiona que la corona de hojas caiga, quedando únicamente el tronco en pie (Howard y Harrison 1999).

1.1.3 Agente causal y vector

El agente causal es un fitoplasma. Estos organismos carecen de una verdadera pared celular como en las bacterias, por lo cual son insensibles al antibiótico penicilina. No obstante, el grupo de las tetraciclinas ha sido usado para reversar los síntomas en palmas infectadas con el amarillamiento letal. Los fitoplasmas se localizan principalmente en el floema, y las concentraciones más altas ocurren en las áreas meristemáticas, tejidos que son importadores de azúcares (Chinchilla 2003).

En América, el vector del organismo causal ha sido identificado como *Myndus crudus*, aunque la evidencia de que este es el único vector es muy leve. Este insecto adquiere el fitoplasma durante su alimentación en palmas infectadas. Las formas inmaduras del vector viven asociadas a varias gramíneas y al alcanzar la madurez pasan a alimentarse del follaje de las palmas (Howard y Harrison 1999).

1.1.4 Impacto de la enfermedad

El impacto de esta enfermedad en Honduras se ha percibido principalmente en los aspectos sociales, económicos y ambientales. En múltiples comunidades étnicas del litoral atlántico de Honduras, la pérdida de las palmas de coco representa un grave problema ya que estos grupos dependen de ellas en términos de subsistencia, alimentación y recreación. En Honduras las exportaciones de coco como fruta fresca han , y la muerte de las palmas por ALC representa una gran pérdida a esta creciente industria. El ambiente se vió afectado también por esta epidemia, ya que se perdieron palmas que permitían mantener un equilibrio en los agro ecosistemas costeros (Ardón *et al.* 2001).

Para contrarrestar esta enfermedad se debe conocer su epidemiología. Se han realizado intentos de control mediante la preplantación de palmas resistentes, sin embargo se ha encontrado que algunas de estas variedades pueden presentar susceptibilidad, por lo que el control mediante variedades resistentes no sería suficiente (Ardón *et al.* 2001).

Hasta la fecha la manera más eficiente de manejar esta enfermedad se basa en la utilización de variedades tolerantes, como el enano malayo o el híbrido Maypan que se encontraron resistentes a la enfermedad en Jamaica. Sin embargo, estudios posteriores realizados en la universidad de Florida registraron que en un ensayo de resistencia el 70% de los enanos malayos y el 83% de los híbridos Maypan fueron infectados por el ALC (Broschat *et al.* 2002). De igual manera en ciertas localidades de Jamaica, en las que se replantó con estas variedades durante los años 60, se han perdido en los últimos 10 años más de dos tercios de éstas a causa del ALC (Harrison *et al.* 2002). Estas zonas, donde se ha registrado una alta mortalidad de las variedades que se consideraban resistentes se han denominado focos de alta infección (“hot spots”).

Existen principalmente tres hipótesis que podrían explicar esta ruptura de resistencia:

- Cambios en el genotipo del fitoplasma.
- Cambios en la dinámica poblacional del vector.
- Factores ambientales.

1.2 UTILIZACION DE TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO

En los últimos años se ha optado por utilizar las herramientas de la biotecnología para el diagnóstico de enfermedades difíciles de estudiar mediante métodos tradicionales . El ALC no es una excepción; la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) detectan una región conservada del genoma (gen 16S rDNA) del fitoplasma causante de esta enfermedad.

Las técnicas moleculares se han utilizado para estudiar la primera de las hipótesis planteada. Se han optimizado marcadores moleculares para estudiar variabilidad genética en el fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero.

1.2.1 Uso de RFLP

Una marcador muy utilizado para estudiar la variabilidad genética de los organismos es el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP por sus siglas en inglés (Restriction Fragment Length Polymorphism). Para este se utilizan enzimas de restricción que cortan el ADN en segmentos específicos de distinta longitud, cuya cuales después van a mostrar las diferencias genéticas que existen entre las muestras estudiadas. (Razin y Yoveg 1995).

Para realizar estas pruebas se necesita amplificar el ADN a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con la PCR se amplificará el gen 16S rDNA utilizando los cebadores universales P1/P7 y luego los cebadores grupo específicos LY16s y 16s/23Sr que reconocerán únicamente el grupo de los fitoplasmas del caribe (Razin y Yogev 1995).

1.2.2 Enzimas de restricción

También conocidas como endonucleasas, las enzimas de restricción cortan los enlaces fosfodiéster a partir de una secuencia que reconocen. Las endonucleasas son extraídas de bacterias en las que actúan como defensa para degradar el material genético extraño que entre a la célula (Rivera 2004).

Estas enzimas se han nombrado a partir de las bacterias de las que son extraídas; su nombre está dado según el género y la especie de la bacteria de donde se aisló por primera vez esta enzima. La primera letra representa el género de la bacteria, las próximas dos indican la especie, una cuarta letra indica la cepa, y un número al final indica la cantidad de enzimas que se han aislado de esa cepa. Ej:

Eco RI → E = género *Escherichia*
 co = especie *coli*
 R = cepa RV 13
 I = primera enzima aislada de esta cepa.

Se pueden establecer tres tipos de enzimas de restricción; las enzimas de tipo I cortan en un sitio cercano al sitio de restricción, a una distancia que varía aleatoriamente, y por ello no se suelen emplear para ADN recombinante. Las de tipo II reconocen y cortan en la secuencia específica, y son las más empleadas en protocolos de restricción como el de este estudio. Las enzimas de restricción de tipo III son similares a las de tipo II en cuanto a la precisión del lugar de corte, pero se diferencian de éstas en que sólo cortan entre nucleótidos del mismo tipo, por ejemplo entre dos adeninas (Rivera 2004).

1.3 ESTUDIOS REALIZADOS

En vista de la importancia económica y biológica que tiene ésta se han realizado estudios acerca de la variabilidad genética del fitoplasma que la causa. Se encontró que la cepa que afecta a Jamaica es diferente a las encontrados en Florida al digerirse con la enzima *Hinf* I, el producto de PCR amplificado por los pares de cebadores P1/P7 y después LY16Sf/LY16-23Sr (Harrison *et al.* 2002).

En las Honduras Castillo (2001) realizó con muestras de la costa Atlántica el mismo estudio para identificar posibles polimorfismos, de 14 muestras analizadas, se encontró diferencia en uno de los perfiles con la enzima *Hinf* I en una de las muestras tomadas en Honduras. El resto de las muestras tienen perfiles idénticos al “patotipo clásico” de Florida. Es importante establecer si en Honduras existe un foco de infección en el cual la resistencia se esta perdiendo debido a la variación en el genotipo del fitoplasma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- ✓ Establecer si existe un foco de infección del ALC en Honduras donde la resistencia de las variedades tolerantes se ha roto.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudiar la variabilidad genética, comparando aislamientos hondureños con patotipos de otros países.
- ✓ Generar polimorfismos indicativos de esta variabilidad genética por medio de técnicas moleculares (marcadores moleculares RFLP'S), utilizando seis enzimas de restricción que han mostrado polimorfismos en estudios anteriores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO

3.1.1 Lugares de muestreo

Se realizaron dos recolecciones de palmas sintomáticas en abril y mayo de 2004 en las zonas de Tela, Miami, La Ensenada, Tornabé y El Progreso, ubicadas en la costa atlántica de Honduras y la Isla de Guanaja. Se seleccionaron plantas que mostraran los síntomas del Amarillamiento Letal del Cocotero, como hojas amarillentas o caída de los frutos.



Figura 1. Mapa de Honduras mostrando la zona muestreada.

Las muestras de otros países vinieron de:

Jamaica, cortesía del Sr. Basil Been, Jamaican Coconut Industry Board.

Estados Unidos, cortesía del Dr. Nigel Harrison, Fort Lauderdale Research and Education Center, Universidad de Florida.

México, cortesía del Dr. Carlos Oropeza, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
Cuba, cortesía de Dra. Raixa Llauguer, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

3.1.2 Método de muestreo

Para la toma de muestras se utilizó el manual de muestreo optimizado por Castillo en el 2001. Se tomaron muestras de aserrín e inflorescencia; las muestras de inflorescencia fueron más fáciles de procesar ya que se obtuvo más ADN y fueron más fáciles de macerar. Estas no siempre pueden utilizarse debido a la altura en que se encuentran, la necrosis que presentan o su ausencia en la planta muestreada, si esta es demasiado joven.

Se utilizó un taladro con una broca desinfectada con una solución de cloro al 3%, después de cada muestra para evitar la contaminación entre plantas. Para la posterior identificación de las palmas muestreadas se marcó el tronco con el mismo número que se le asignó a la muestra. El aserrín obtenido fue conservado en una solución de tampón CTAB con 0.2% de β -mercaptoetanol, el cual fue elaborado en el laboratorio de diagnóstico molecular en Zamorano. Después de muestreada la palma presenta una herida pequeña, que debe ser sellada con plastilina para evitar posibles infecciones o entrada de insectos. Se recogieron datos de procedencia, síntomas, edad y variedad.

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó mediante una centrifugación diferencial. El protocolo utilizado para este proceso es el de Doyle y Doyle (1990), optimizado en Zamorano para la extracción de fitoplasma de cocotero, por Harrison (2000) (Anexo 1).

Para comprobar la calidad del ADN extraído y determinar las muestras a utilizarse en los siguientes análisis se realizó una electroforesis horizontal. Se utilizó una gel de agarosa al 1% preparada con TBE 0.5X. Después de cargada la gel con 2 μ l de muestra y 8 μ l de tampón de carga se corrió a 85V, usando TBE 0.5X como tampón de corrida. La tinción de la gel se realizó en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 15 minutos. Posteriormente se observó y fotografió bajo luz ultravioleta utilizando el sistema Kodak EDAS 290.

3.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN

Los cebadores utilizados para la amplificación inicial fueron P1/P7 a una concentración de 25 ng/ μ l. Se realizó la mezcla de la PCR según el protocolo detallado en el Anexo 3. El programa utilizado se describe en el cuadro 1.

Cuadro 1. Programa del termociclador para PCR directa.

Ciclos	Temperatura (° C)		
	94	55	72
1	2:00 *	1:20	1:00
30	0:30	1:20	2:00
1	0:30	1:20	8:00

* Expresado en minutos.

Después de esta amplificación, las muestras se analizaron por electroforesis en un tanque horizontal utilizando 2µl de tampón de carga y 5µl de producto de PCR. Se cargaron en una gel de agarosa al 1% y se corrió a 85V. Se tiñó en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 µg/µl durante 15 min., para luego observar y fotografiar en un transiluminador. Las muestras fueron reamplificadas por PCR anidada (nPCR), los cebadores utilizados en esta reamplificación del producto de PCR fueron los grupo específicos LY16s y LY16s/23sr (Anexo 2). Las muestras se diluyeron dependiendo de la intensidad de las bandas encontradas después de correr nuevamente las muestras en un tanque de electroforesis horizontal. Las que presentaron bandas visibles se diluyeron 1:100 y las que no presentaron banda 1:40. Para la amplificación se utilizaron 3µl de esta dilución ya que el volumen final sería 50µl.

Se volvió a realizar una electroforesis horizontal con el producto de la última amplificación para comprobar si no existió contaminación o problemas en el proceso. Así solamente se seleccionaron las muestras positivas para la amplificación anidada.

3.4. UTILIZACIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

3.4.1 Selección de las enzimas de restricción utilizadas

Las enzimas de restricción utilizadas en este estudio fueron *Alu I*, *Hinf I*, *Dde I*, *Taq I*, *Msp I* y *Rsa I*. Esto se determinó tomando en cuenta estudios anteriores (Castillo 2001) y la disponibilidad de enzimas en el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano.

3.4.2 Digestión de las muestras

Se utilizó el producto de la PCR anidada (nPCR) para la digestión con las enzimas seleccionadas de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo 4. Una vez preparadas las digestiones del día I se incubaron a 37°C por 12 horas. Al día siguiente se realizó la mezcla para el día II, se agregaron 5 µl de esta a las digestiones y se encubaron por dos horas. Finalmente para desactivar las enzimas se dio encubaron las muestras a 67°C por 5 minutos.

3.4.3 Geles de poliacrilamida

Las geles de poliacrilamida (SIGMA[®]) al 8% preparadas tienen como base una solución al 30% de acrilamida: 29:1. Se utilizó como catalizador TEMED y una solución al 1% de persulfato de amonio. Esta solución se vertió entre los vidrios para electroforesis vertical con separadores de 1.5 mm. Se dejó reposar una hora hasta que la gel polimerizó. Las celdas obtenidas después de retirar el peine fueron lavadas con tampón TBE 1X.. Se realizó una pre-corrída de la gel durante 30 min. a 250 V.

Se cargó la gel con 10 μ l de producto de digestión y 2 μ l de tampón de carga, para este tipo de gel se utilizaron puntas planas. Después de este proceso se tiñeron las geles con bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 15 min. y se destiñeron en agua durante 10 min. antes de ser fotografiadas en un transiluminador con el sistema Kodak EDAS 290.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la primera amplificación con los cebadores universales para fitoplasmas P1 /P7 se obtuvieron bandas muy tenues las cuales no daban la información suficiente como para establecer si eran positivas al ALC. Para poderlas analizar se realizó una reamplificación (nPCR) con los cebadores grupo específicos LY16S y LY16/23sr lo cual resultó en bandas claras que permitirían realizar las digestiones con las enzimas de restricción escogidas. En el siguiente cuadro se presentan los resultados de las amplificaciones de ADN de las muestras recolectadas en mayo 2004 en los alrededores de Tela, Honduras.

Cuadro 2. Muestras recolectadas en mayo de 2004 y los resultados de amplificaciones de ADN.

Número	Síntomas			Observaciones	Resultados	
	Frutos	Inflorescencia	Hojas		P1/P7	LY16s LY16/23sr
NuevaGo ALC 19	Inmadura	Inmaduras	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 20	Inmadura	Inmaduras	Amarilla	Híbrido	-	-
Ensenada ALC 21	No	No	Amarilla	Híbrido joven	-	+
Ensenada ALC 22	No	No	Amarilla	Híbrido joven	+	+
Ensenada ALC 23	No	Sí	Amarilla	Híbrido joven	-	-
Ensenada ALC 24	No	Sí	Amarilla	Híbrido joven	-	-
Ensenada ALC 24b	No	Sí	Amarilla	Híbrido joven	-	-
Ensenada ALC 25	No	No	Amarilla	Híbrido joven	-	-
Ensenada ALC 26	Sí	Sí	Amarilla	Híbrido joven	-	-
Ensenada ALC 27	Sí	Sí	Amarilla	Híbrido joven	-	-
Ensenada ALC 28	No	No	Amarilla	Híbrido joven	+	+
Triunfo ALC 29	No	No	Amarilla	Alto del Pacífico	-	-
Triunfo ALC 30	No	No	Amarilla y necrótica	Alto del Pacífico	+	+
Triunfo ALC 31	No	No	Necrótica	Alto del Pacífico	+	-

Cuadro 2. continuación.

Número	Síntomas			Observaciones	Resultado	
	Frutos	Inflorescencia	Hojas		P1/P7	LY16s y LY16/23sr
Triunfo ALC 32	No	No	Necrótica	Alto del Pacífico	-	-
Triunfo ALC 33	No	No	Necrótica	Híbrido	-	-
Miami ALC 1	No	Necrótica	Amarilla	Enano Amarillo	-	+
Miami ALC 2	No	No	Amarilla	Alto del Atlántico	-	+
Barra vieja ALC 3	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	+	+
Tornabe ALC 4	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	+	+
Tornabe ALC 5	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	+	+
Tornabe ALC 6	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	-	+
Tornabe ALC 6	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	+	+
Tornabe ALC 7	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	+	+
Tornabe ALC 8	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido joven	-	+
NuevaGo ALC 9	Caídos	Necróticas	Amarilla y necrótica	Híbrido	+	+
NuevaGo ALC 10	Caídos	Necróticas	Amarilla y caídas	Híbrido	-	+
NuevaGo ALC 11	Caídos	Necróticas	Amarilla	Híbrido	-	+
NuevaGo ALC 12	Caídos	Necróticas	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 13	No	No	Amarillas	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 14	No	No	Amarilla y necrótica	Híbrido	-	+
NuevaGo ALC 15	No	Inmadura	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 15b	No	Inmadura	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 16	No	No	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 17	Sí	Sí	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 17b	Sí	Sí	Amarilla	Híbrido	-	-
NuevaGo ALC 18	Caídos	Sí	Amarilla	Híbrido	-	-

Las muestras de la zona de Nueva Go tomadas en la plantación perteneciente al Grupo Cressida no presentaron la enfermedad a pesar de que los síntomas eran muy parecidos a los que se encuentran en plantas con ALC. Los síntomas de amarillamiento encontrados en este caso se deben estudiar ya que pueden ser atribuidos.

Después de las selecciones realizadas por medio de los resultados de las amplificaciones las muestras sometidas a las digestiones con las enzimas de restricción fueron las siguientes:

2 Barra vieja ALC 3
2 Tornabé ALC 4
2 Tornabé ALC 5
2 Ensenada ALC 22
2 Ensenada ALC 28
2 Triunfo ALC 30

De un muestreo anterior se pudieron obtener:

1 Cocolito ALC 2F
1 San Juan ALC 5
1 Miami ALC 7

Las muestras internacionales analizadas fueron:

Jamaica:

Jam ALC 2
Jam ALC 3
Jam ALC 5

Mexico:

Jt Mx 1

Cuba:

Cuba 164

Como controles:

Positivos: ADN de palmas (*cocus nucifera*) provenientes de Florida.

LYCR

LY Juno

Negativo:

Catharantus roseus

La nomenclatura utilizada en las muestras nacionales se estableció según el sistema adoptado por el laboratorio de diagnóstico molecular de Zamorano (Anexo 5).

Las enzimas que se utilizaron fueron : *Alu I*, *Dde I*, *Hinf I*, *Msp*, *Rsa* y *Taq I*.

Las digestiones con la enzima *Alu I* presentaron perfiles parecidos con excepción de la muestra Jam ALC 2, proveniente de Jamaica en donde ya se han encontrado variabilidad genética del fitoplasma según La diferencia en este perfil fue muy clara ya que se presentaron varias bandas que no fueron visibles en las otras muestras. En este caso se encontró la variación en solo una de las tres muestras obtenidas de Jamaica, esto puede indicar que existe mas de un patotipo en Jamaica ya que las muestras Jam ALC 3 y Jam ALC 5 presentan perfiles idénticos a los hondureños.

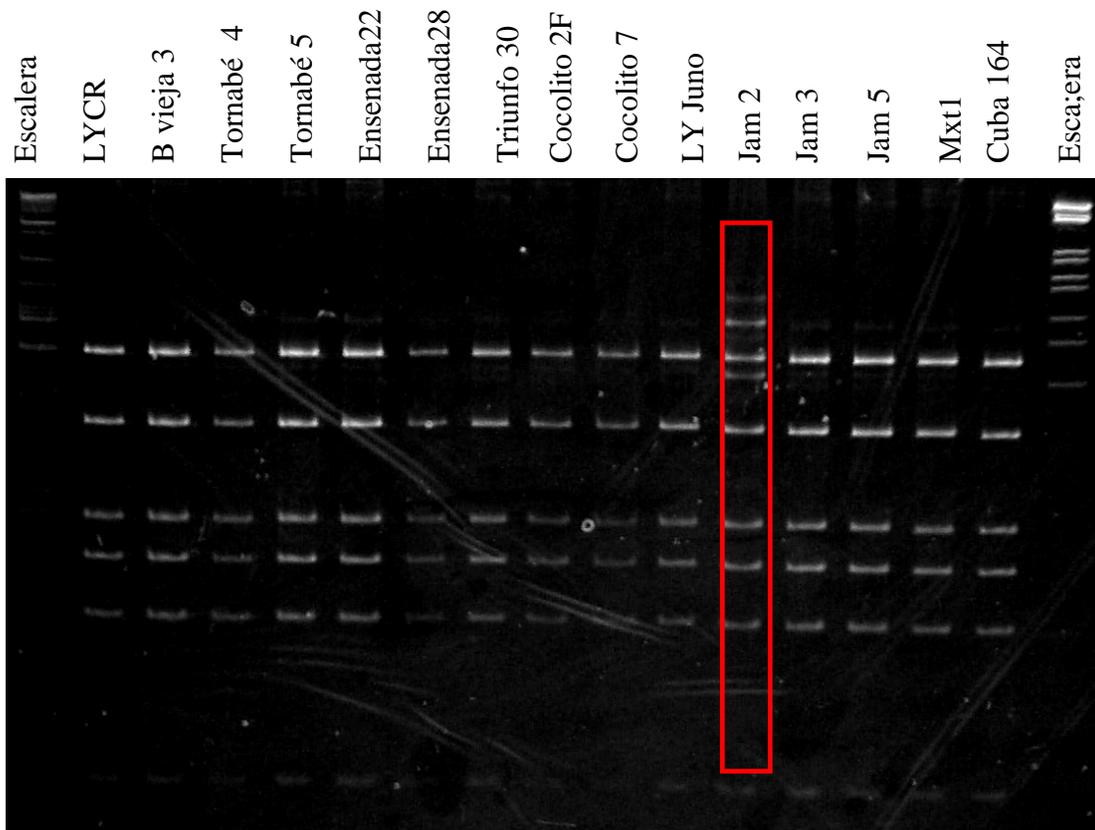


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción *Alu I*.

La enzima *Dde* I presentó un perfil con 8 bandas el cual fue idéntico para todas las muestras.

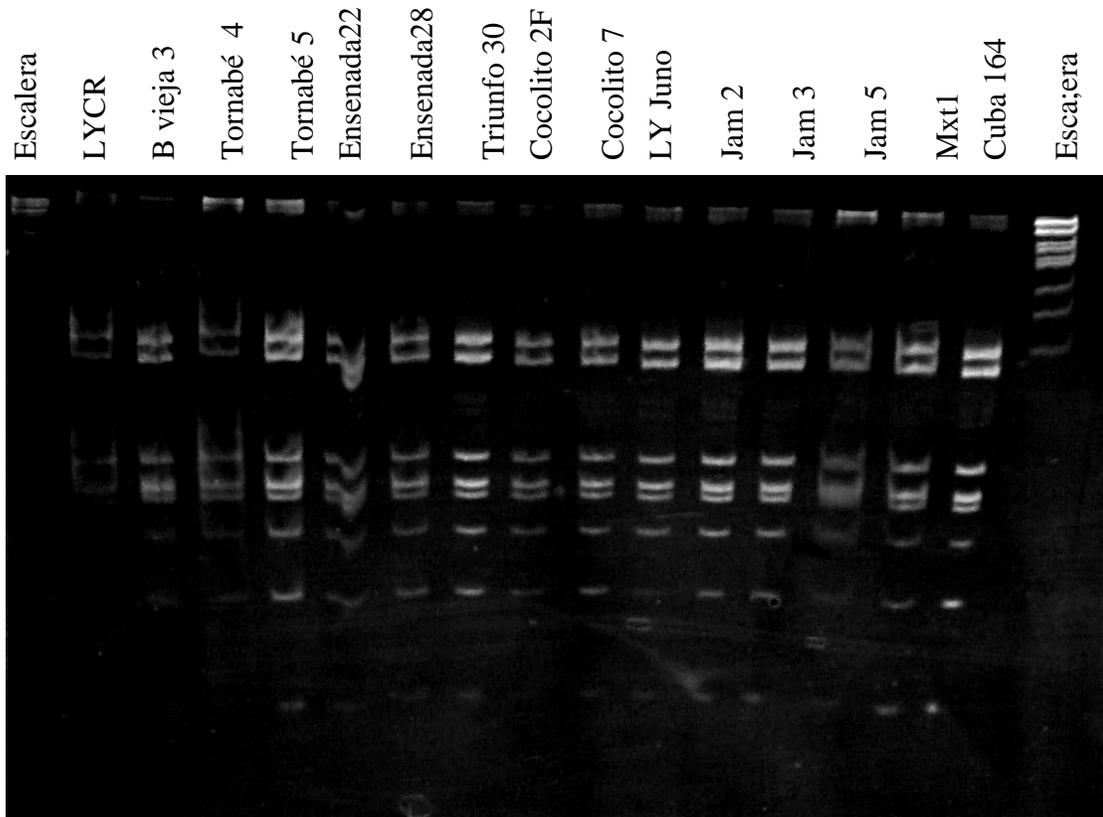


Figura 3. Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción *Dde* I.

Los perfiles resultantes de la digestión con la enzima *Msp* I presentaron diferencias en la muestra Tornabé ALC 4. En esta se encontró una banda adicional a las que se presentan en los perfiles de las demás muestras tanto internacionales como nacionales. Como control negativo en esta gel se incorporó ADN de *Catharantus roseus*, ya que esta especie es un hospedero de fitoplasmas, pero no del causante del ALC. Al no generar perfiles de restricción, se estableció que las endonucleasas no estaban contaminadas.

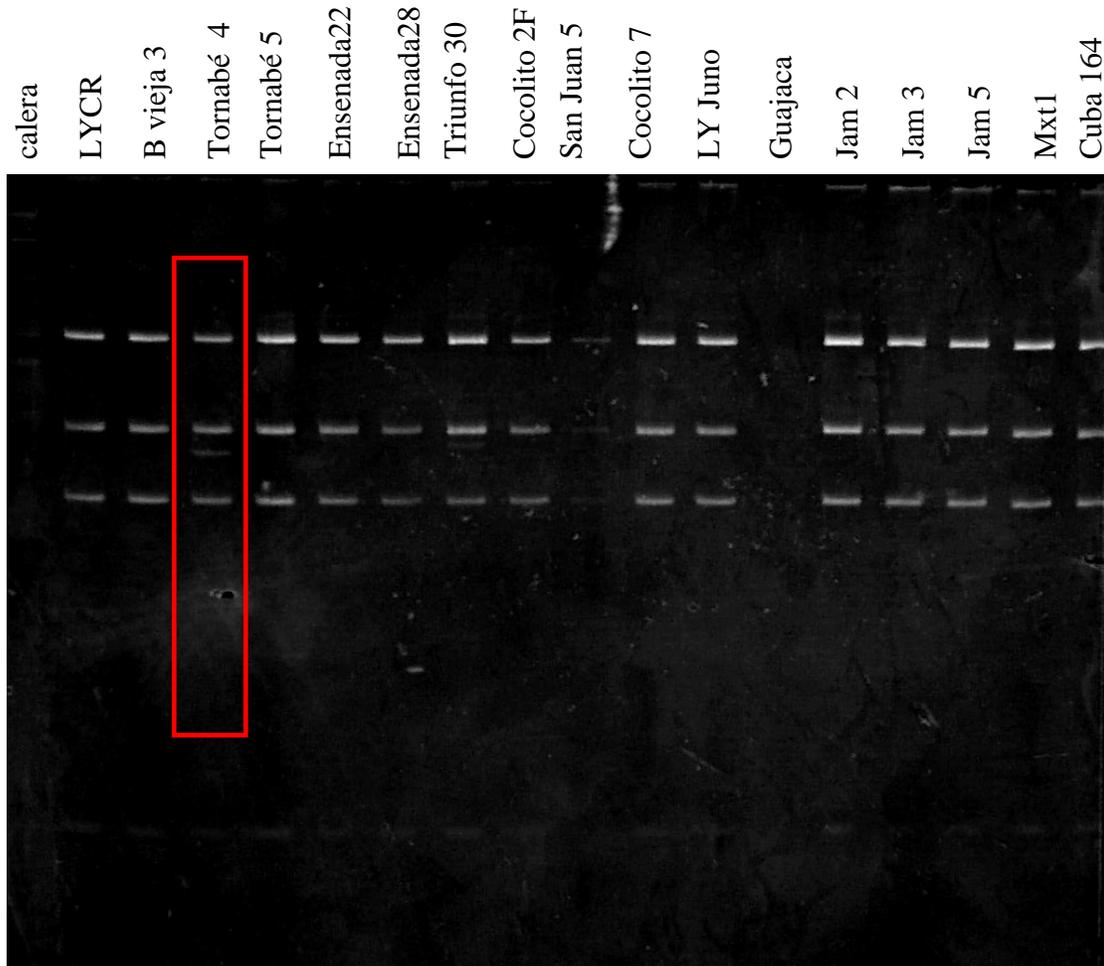


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción *Msp* I.

Las digestiones con la enzima *Hinf* I mostraron diferencia en las muestras de Jamaica y Cuba con respecto a las hondureñas. Las muestras de Jamaica y Cuba fueron recolectadas en dos focos de infección, donde la resistencia de las variedades enano malayo e híbrido maypan se ha roto. Estas muestras presentaron perfiles idénticos entre sí, esto deberse por la cercanía geográfica que existen entre las costas de estos países. Las diferencias de los perfiles de Jamaica ya han sido reportados en otros estudios (Harrison *et al* 2002). En las muestras recolectadas en Honduras los perfiles fueron uniformes, al contrario de estudios anteriores en los cuales se encontró diferencia con esta enzima en una muestra provenientes de la costa atlántica Hondureña en el sector de la Ensenada (Castillo 2001). Es importante observar que las muestras de Jamaica presentaron el mismo perfil en esta digestión a diferencia de las digestión con la enzima *Alu* I. En esta gel se pudo notar que la muestra San Juan 5 no tienen bandas definidas, con este antecedente se decidió eliminar la muestra del estudio.

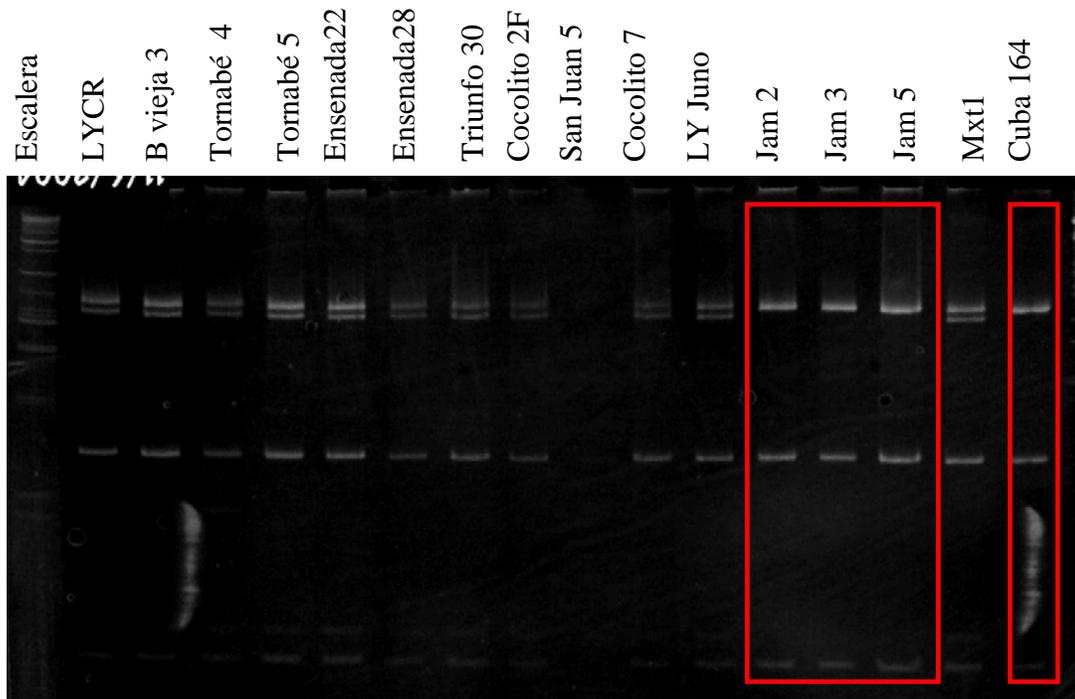


Figura 5. Gel de policacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción *Hinf*I.

Una muestra Hondureña, 2 Ensenada AIC 2, presentó un perfil diferente después de la digestión con la enzima *Rsa* I. Esta muestra es de la playa la Ensenada, lugar en donde se encontró variabilidad genética del fitoplasma en estudios anteriores, pero en ese caso fue con una enzima diferente (Castillo 2001). Esto puede indicar que existen otras variedades de fitoplasma en esta zona, por eso es de gran importancia realizar más estudios en este lugar.

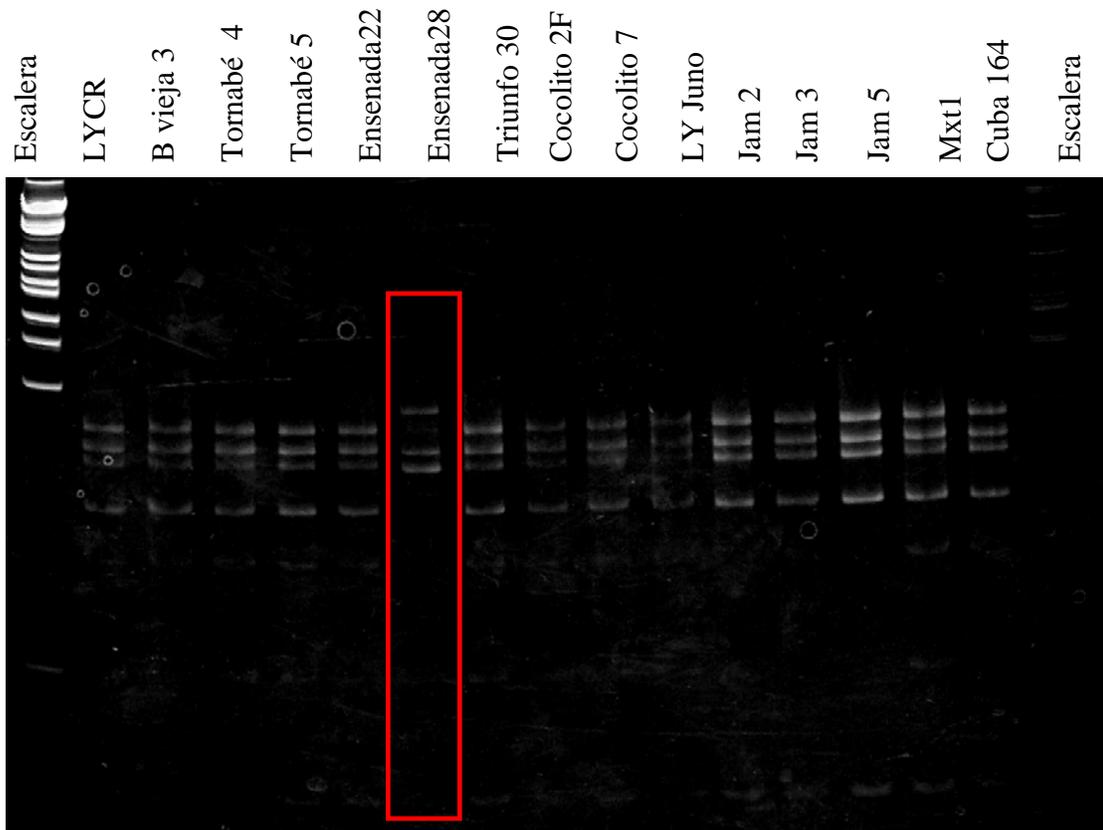


Figura 6. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción *Rsa* I.

La enzima *Taq* I no generó perfiles diferentes en ninguna de las muestras.

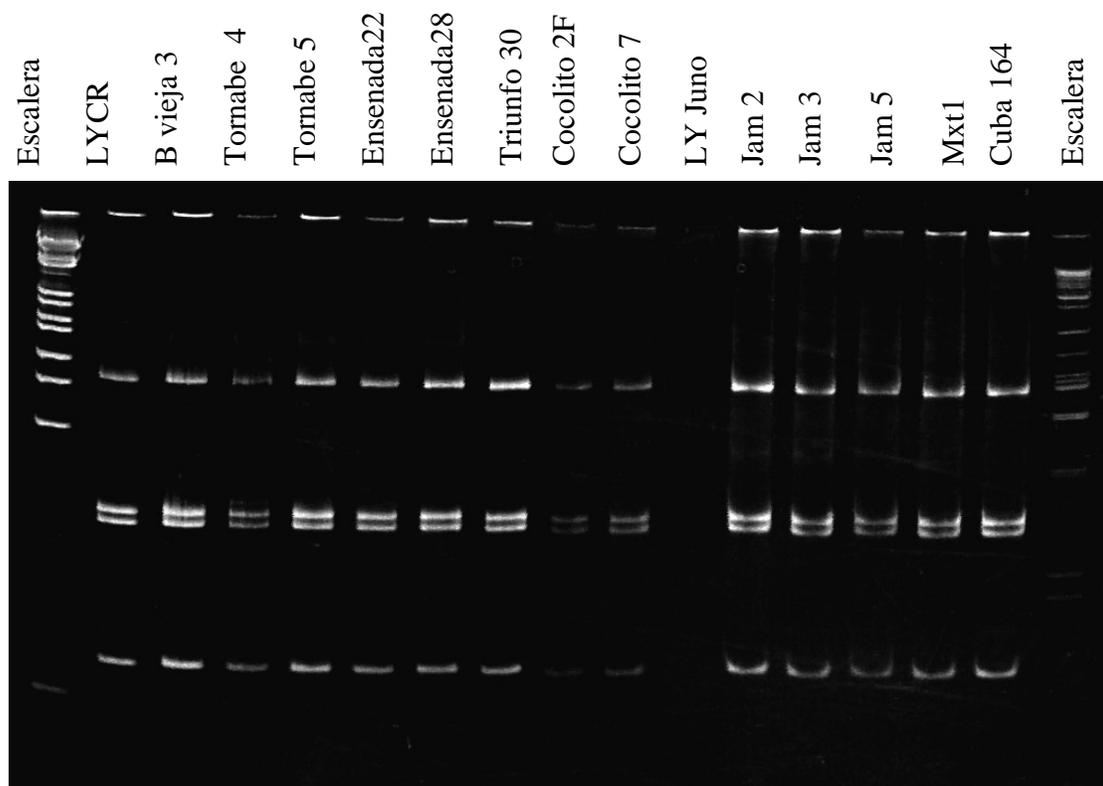


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando las digestiones con la enzima de restricción *Taq* I.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados encontrados con las diferentes digestiones, se especifica si la muestra fue o no tomada en cuenta en la digestión y si ésta mostró un perfil diferente con respecto a las demás.

Cuadro 3. Polimorfismos encontrados en ADN de fitoplasmas causantes del Amarillamiento Letal del Cocotero con diferentes enzimas de restricción.

	Alu I	Dde I	Msp I	Hinf I	Rsa I	Taq I
LYCR						
B Vieja 3						
Tornabé 4			*			
Tornabé 5						
Ensenada 22						
Ensenada 28					*	
Triufo 30						
Cocolito 2F						
San Juan 5	-	-			-	-
Cocolito 7						
LY Juno						
Guajaca	-	-		-	-	-
Jam 2	*			*		
Jam 3				*		
Jam 5				*		
Mxt1						
Cuba 164				*		

* = perfil diferente

- = muestra eliminada en la digestión por no presentar calidad necesaria o no ser válida para el estudio.

5. CONCLUSIONES

No todos los síntomas de amarillamiento en palmas son causados por el ALC. Pueden ser causados por otras enfermedades y/o factores abióticos como la falta o exceso de agua.

Las enzimas de restricción utilizadas generaron polimorfismos con diferentes patrones mostrando que si existe una variabilidad genética.

Las muestras de Cuba y Jamaica provenientes de los focos de infección tienen patrones diferentes a las encontradas en Honduras, lo que indica que en Honduras no existe un foco de infección igual al de estos países.

Se pudieron encontrar diferencias en las muestras recolectadas en las costas hondureñas al cortar las muestras con las enzimas *Msp* I y *Rsa* I. Estas diferencias no fueron encontradas en estudios anteriores lo cual establece la posibilidad de que el patotipo del patógeno que afecta a la zona estudiada sea diferente al que ha sido clasificado con anterioridad.

La zona de la Ensenada es de gran importancia para estudios de la ruptura de la resistencia, ya que se han encontrado fitoplasmas con perfiles diferentes en este y otro estudio anterior.

Aunque aún no es posible atribuir implicaciones biológicas a los polimorfismos encontrados, se ha observado que la mayoría de las muestras de Honduras presentan el patrón del patógeno “clásico” del ALC.

6. RECOMENDACIONES

Aunque aún no se han podido establecer las implicaciones biológicas de la variabilidad genética encontrada, se recomienda seguir con los programas de replantación con la variedad alto del pacífico mexicano y no con los enanos malayos híbridos.

Continuar el estudio en Honduras con más muestras, y especialmente en La Ensenada, donde se encontró más variabilidad genética.

Realizar un diagnóstico detallado del desempeño en el campo de las variedades replantadas en los últimos años en Honduras.

Continuar con la caracterización de los aislamientos donde se encontró variabilidad genética a través de secuenciación de muestras seleccionadas.

Incluir muestras de Honduras en el árbol filogenético del grupo de fitoplasmas de ALC.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ardón M; Roca M. M.; Bustamante M. 2001. Estudio preliminar sobre la percepción del impacto ambiental y socio-económico del Amarillamiento Letal del Cocotero en la costa caribe e islas de Honduras. P.74.

Broschat et al. 2002. Losses to lethal yellowing cast doubt on coconut cultivar resistance. Palms. Volume 46 (4): 185-189

Castillo, M. 2001 Estudio básico de la variabilidad genética del fitoplasma causante del amarillamiento letal del cocotero en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras.p. 80

Chinchilla, C. 2003. Amarillamiento letal del cocotero.(En línea) Consultado 19 agosto. 2004. Disponible en:<http://apepcr.tripod.com/Public/yellowing.htm>

Harrison N. A; Myrie W.; Jones P.; Carpio M.L; Castillo M.; Doyle M.M.; Oropeza C.2002. 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. Ann. Appl. Biol. 141: 183-193

Howard, F.W.; Harrison N.A. 1999. Lethal Yellowing of Palms. (En línea). Consultado 20 Septiembre. 2004.: <http://www.ftld.ufl.edu/lyfacts.htm>

Razin, S.; Yogevev, D. 1995. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma. Ed. por Shmuel Razin; Joseph G. Tully. California, EEUU Academic Press. p. 369.

Rivera, O. 2004. Enzimas de Restricción.(En línea). Consultado 19 agosto.2004. Disponible en : <http://www.uprm.edu/biology/cursos/biologiageneral/EnzimasDNA.htm>

8. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN Doyle & Doyle (1990).

1. Colocar en el mortero aproximadamente un gramo del tejido a extraer y agregar 600 µl de CTAB 1.
2. Agregar 0.1 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 15 min.
5. Añadir (igual volumen) 600µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, mezclar Bien.
6. Centrifugar por 5 min a 10,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga, evitando la interfase.
8. Añadir 1/10 del volumen de CTAB 2.
9. Repetir pasos 5,6 y 7.
10. Añadir 2/3 del volumen de isopropanol frío, mezclar bien.
11. Centrifugar por 10 min. a 10,000 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 tampón 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 10,000 rpm.
17. Repetir paso 12.
18. Agregar 500 µl de etanol al 70% frío.
19. Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm.
20. Repetir pasos 12 y 13.
21. Resuspender el precipitado en 50 µl de TE 0.2X.
22. Almacenar a 4°C.

Anexo 2

Secuencias de cebadores P1/P7 y LY16s/ LY16s/23sr.

P1: 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3'

P7: 5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3'

LY16s: 5' CAT GCA AGT CGA ACG GAA ATC 3'

LY16s/23sr: 5' TTG AGA ATT TAC GTT GTT TAT CTA C 3'

Anexo 3

Mezcla para PCR Directa

ADN	2.0 μ l
Tampon B	1.5 μ l
dNTP's	1.5 μ l
MgCl ₂	0.9 μ l
P1	0.7 μ l
P7	0.7 μ l
Taq	0.1 μ l
ADE	7.6 μ l
	<hr/>
	15 μ l

Anexo 4

Protocolo para digestión con enzimas de restricción.

Día 1

ADE	8.0 μ l
Tampón	1.5 μ l
Enzima	5.0 μ l
Producto PCR	5.0 μ l

Día 2

ADE	4.0 μ l
Tampón	0.5 μ l
Enzima	0.5 μ l

Anexo 5

Sistema de Nomenclatura utilizado para nombrar las muestras recolectadas.

Viaje	2
Sitio de muestreo	Miami
Enfermedad	ALC
Numero de muestra	1