

BIBLIOTECA WILSON POPKOW
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 28
TEGUCIGALPA HONDURAS

Diagnóstico molecular y evaluación de la resistencia de los híbridos MAPAN al Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Honduras

Bárbara Harrison Alvergue

MICROISIS:	_____
FECHA:	_____
ENCARGADO:	_____

Zamorano
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Abril, 2000

Zamorano
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Diagnóstico molecular y evaluación de la
resistencia de los híbridos MAPAN al
Amarillamiento Letal del Cacaotero (ALC)
en Honduras**

Tesis presentada como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agrónomo
en el grado académico de Licenciatura.

Por:

Bárbara Harrison Alvergue

Honduras: Abril, 2000

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



Bárbara Harrison Alvergne

Zamorano, Honduras
Abril, 2000

DEDICATORIA

A Virginia.

A la casualidad, más que al destino.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Flor, quien, con su apoyo y amor, logré que volviera a creer en mí.

A mi padre, Ricardo, por el esfuerzo realizado para permitirme culminar la carrera y por su fe en mí.

A mis hermanos, Federico y Andrea, a quienes admiro y quiero.

A Julio Escoto y Alfredo Rueda por su ayuda en la realización de este proyecto.

A la Red Salvemos el Coco por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, en especial a Cáritas de Honduras.

Al Instituto Max Plank, al CICY y, en especial, al Dr. Rhode por haber hecho posible mi mejor experiencia como profesional, hasta ahora.

Al personal de Protección Vegetal: Lourdes, Estela, Karla, Carolina, Chlmíno y doña María, no sólo por su ayuda, sino también por su buena voluntad acompañada siempre de una sonrisa.

A Francisco por su apoyo e incondicional cariño en la distancia, por permitirme ser yo, sin pretensiones de ningún tipo, cuando estamos juntos, por compartir mis ilusiones, en fin, por su nobleza y corazón.

A Marisabel, Andrea C., Erick, Andrea K., Maricela, José Luis, María Luisa, Ana Rosa, Rodrigo y Zoila por estos cuatro años de andanzas y recuerdos.

A mis amigos del Zamorano, con quienes hicimos historia, nuestra historia.

A mis asesores por sus consejos y enseñanza.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco a mi padre por permitirme culminar este proyecto.

Agradezco a la DSE por financiar mis estudios durante los tres años del Programa Agrónomo.

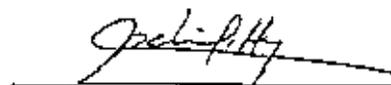
Agradezco a la FHIA/AID por el financiamiento brindado para continuar mis estudios en el Programa Ingeniero Agrónomo.

RESUMEN

Harrison, Bárbara. 2000. Diagnóstico molecular y evaluación de la resistencia de los híbridos MAPAN al Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Honduras. Proyecto Especial del Programa Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 49 p.

El Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) es una enfermedad devastadora que se reportó en Honduras por primera vez en 1995. Se calcula que ha aniquilado el 60% de las poblaciones de cocoteros Alto del Atlántico (*Cocos nucifera*) en el litoral Norte e Islas de la Bahía y se estima que acabe con 90% de la población de estas palmas. Esta enfermedad presenta una sintomatología similar a la de otras enfermedades del cocotero, por lo que un diagnóstico molecular es la única manera confiable de detectar la presencia del fitoplasma causante y estudiar su epidemiología. En este estudio se optimizó el método de diagnóstico molecular de la enfermedad para obtener resultados y emitir conclusiones confiables. Se utilizaron dos primers, los P1 & P7, universales para la detección de fitoplasmas, y los LYF1 & LYR1, específicos para la detección del fitoplasma de ALC ocurente en Florida, EE.UU. Debido a que el ALC no tiene cura, es necesario iniciar programas de replantación con variedades de coco resistentes. En la plantación de híbridos resistentes MAPAN en Salado Lis Lis, propiedad de la Standard Fruit Company, se registró una alta mortalidad de las palmas después del Huracán Mitch, situación que puso en duda la resistencia de estos híbridos a la enfermedad. Por lo anterior, se realizó un muestreo en el que se determinó que, aunque la enfermedad está presente en la plantación, su incidencia se encuentra dentro de los límites aceptables para el híbrido (20%). El insecto vector de la enfermedad, *Myndus crudus*, se encuentra ampliamente distribuido en la Costa Atlántica del país, pero no se descarta la presencia de otros vectores, por lo que se recolectaron e identificaron otros posibles vectores. Se utilizó la técnica de RFLPs para comparar el fitoplasma de distintas procedencias de Honduras, pero no se encontró diferencia alguna.

Palabras claves: *Cocos nucifera*, fitoplasma, híbridos MAPAN, *Myndus crudus*, primers, RFLPs.



Dr. Abelino Pitty

NOTA DE PRENSA

VARIEDADES RESISTENTES: ÚNICA SOLUCIÓN VIABLE PARA EL MANEJO DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

El Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) llegó a Honduras en 1995 continuando con su devastador paso por las costas caribeñas. Afortunadamente, se han desarrollado híbridos resistentes a la enfermedad, tales como el MAPAN, utilizado ya para replantaciones de localidades como Salado Lis Lis y Cuero y Salado en fincas propiedad de la Standard Fruit Company.

En Honduras, se estima que el ALC arrasará con el 90% de las Palmas Alto del Atlántico, variedad predominante en la Costa Atlántica. Este problema se agrava si además del deterioro del paisaje, se considera que las comunidades garífunas dependen de estas palmas, en gran proporción, para su dieta y cultura en general.

El vector de la enfermedad es la chicharrita *Myndus crudus*, distribuida ampliamente en el territorio hondureño. Los inmaduros de este insecto habitan las raíces de todo tipo de pastos, lo que no permite controlar la enfermedad atacando al vector.

La enfermedad del ALC es causada por un fitoplasma, organismo similar a una bacteria, pero sin pared celular que puede controlarse por algún tiempo con antibióticos de la familia de las Tetraciclinas; sin embargo, el tratamiento es caro y la muerte de la palma ocurre eventualmente. Hasta el momento se cree que la única solución viable para la replantación de las zonas afectadas son los híbridos resistentes.

Sin embargo, durante un estudio realizado sobre el ALC surgieron dudas con respecto a la resistencia de los híbridos cuando aproximadamente el 70% de los especímenes de la finca Salado Lis Lis presentaron síntomas que, en su momento, fueron atribuidos al ALC.

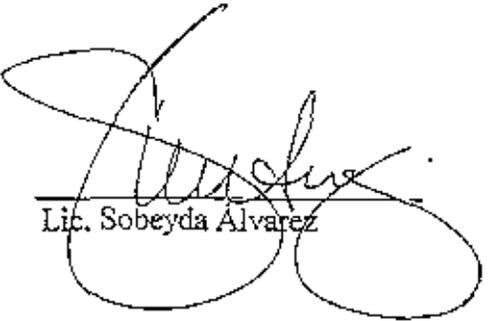
Zamorano, única institución en Honduras que cuenta con el equipo adecuado para realizar diagnósticos moleculares realizó un estudio para verificar la causa de los síntomas detectados en las plantas afectadas.

Para determinar la posible incidencia del ALC en la plantación se realizó un muestreo al azar. De un total de 21 muestras analizadas, solamente al 19% se le detectó el fitoplasma. Si se considera que los híbridos tienen un 80% de resistencia, esta incidencia se encuentra dentro de los límites aceptables.

Sin embargo, ante la incógnita de qué estaba causando los síntomas, se tomaron muestras de 14 híbridos enfermos. Se analizaron las muestras, pero en ninguna se detectó el fitoplasma.

Con el resultado anterior se concluyó que, aunque la enfermedad está presente en la plantación en un 19%, la mayor causa de mortalidad probablemente es atribuible a un factor abiótico.

Aunque los costos económicos y sociales que ha ocasionado la enfermedad en Honduras son altos, no todo está perdido. La replantación con híbridos resultará cara y los resultados se verán de mediano a largo plazo, sin embargo es, hoy por hoy, la única solución viable.



Lic. Sobeyda Álvarez

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
	Índice de cuadros	xii
	Índice de figuras	xiv
	Índice de anexos	xv
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	OBJETIVOS	4
1.1.1	● Objetivo General	4
1.1.2	Objetivos Específicos	4
2	REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1	COCOTERO (<i>Cocos nucifera</i>)	5
2.1.1	Taxonomía	5
2.1.2	Descripción botánica	5
2.1.3	Importancia	6
2.2	FITOPLASMA DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)	6
2.2.1	Agente causal	6
2.2.2	Síntomas	7
2.2.3	Dispersión	9
2.3	VECTOR DEL ALC: <i>Myndus crudus</i>	10
2.3.1	Descripción	10
2.3.2	Ciclo de vida	11
2.3.3	Confirmación del <i>Myndus crudus</i> como vector	11
2.3.4	Transmisión del ALC	13
2.4	RESISTENCIA VARIETAL AL ALC	14
2.4.1	Origen de la enfermedad	14
2.4.2	Varietades de cocotero	14
2.4.3	Características diferenciales de los genotipos altos	14
2.4.4	Enano Malayo (EM): Variedad resistente	15
2.4.5	Producción de híbridos resistentes	15
2.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	17
2.5.1	La técnica "Polimerase Chain Reaction" (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa	17
2.5.2	"Restriction Fragment Length Polimorphism" (RFLPs) o Fragmentos Polimórficos de Restricción	19

3	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE DIAGNÓSTICO	22
3.1.1	Nomenclatura de las muestras.....	22
3.1.2	Obtención de las muestras.....	22
3.1.3	Conservación de las muestras	22
3.1.4	Extracción de ADN.....	23
3.1.5	Amplificación de ADN.....	23
3.2	DETECCIÓN DEL FITOPLASMA EN EL VECTOR REPORTADO <i>Myndus crudus</i> Y DETERMINACIÓN DE POSIBLES VECTORES ..	24
3.2.1	Recolección de insectos	24
3.2.2	Identificación de insectos.....	24
3.2.3	Prueba de PCR a insectos.....	25
3.3	EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS HÍBRIDOS MAPAN	25
3.3.1	Metodología de muestreo	25
3.3.2	Obtención de las muestras.....	25
3.3.3	Diagnóstico	26
3.4	COMPARACIÓN DE DISTINTOS AISLAMIENTOS DE ADN DEL FITOPLASMA DEL ALC UTILIZANDO RFLPs	26
3.4.1	Enzimas de restricción utilizadas con cada primer	26
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE DIAGNÓSTICO	28
4.1.1	Obtención de las muestras.....	28
4.1.2	Conservación de las muestras	28
4.1.3	Extracción de ADN.....	29
4.1.4	Amplificación de ADN.....	30
4.2	DETECCIÓN DEL FITOPLASMA EN EL VECTOR REPORTADO <i>Myndus crudus</i> Y DETERMINACIÓN DE POSIBLES VECTORES ..	31
4.2.1	Identificación de insectos	31
4.2.2	Prueba de PCR a insectos	32
4.3	EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS HÍBRIDOS MAPAN	32
4.4	COMPARACIÓN DE DISTINTOS AISLAMIENTOS DE ADN DEL FITOPLASMA DEL ALC UTILIZANDO RFLPs	37
4.4.1	Pruebas con RFLPs a muestras de distintas procedencias de Honduras	37
5	CONCLUSIONES	39
5	RECOMENDACIONES	40
7	BIBLIOGRAFÍA	41
8	ANEXOS	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Año en que se reportó por primera vez una enfermedad con sintomatología típica al ALC y el nombre que se le dio en distintos países de los continentes americano y africano	10
2.	Hospederos reportados de ninfas de <i>Myndus crudus</i>	11
3.	Diferencias entre las variedades de cocoteros Alto del Atlántico y Alto del Pacífico.....	15
4.	Comparación entre híbridos MAPAN y Enanos Malayos	17
5.	Secuencias de algunos primers desarrollados a partir del gen 6S rRNA para el diagnóstico de fitoplasmas	19
6.	Secuencia de los primers específicos desarrollados para la detección del fitoplasma del ALC.....	19
7.	Secuencia de nucleótidos y tamaño del producto de PCR de los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1	23
8.	Microorganismo del que proviene cada enzima de restricción, buffer correspondiente y sitio de restricción	27
9.	Resultados de la amplificación de ADN de las muestras provenientes de tejido del tallo obtenido y conservado de diferentes maneras.....	29
10.	Muestras de AND en solución y ADN no resuspendible cuatro meses después de su extracción.....	30
11.	Resultados de la amplificación de tres muestras con los primers LYF1 & LYR1 utilizando la reacción completa de un "PCR beads Ready To Go" y media reacción.....	31
12.	Taxonomía de los insectos encontrados en el envés de las hojas de palmas de cocotero.....	31
13.	Incidencia del fitoplasma del ALC en las finca Salado Lis Lis detectado con los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1 en el muestreo al azar.....	32

14.	Descripción y diagnóstico de las muestras tomadas al azar en la finca Salado Lis Lis el 23/01/2000	33
15.	Incidencia del fitoplasma del ALC en la finca Salado Lis Lis detectado con los primers P1 & P/ y LYF1 & LYR1 en ambos muestras por síntomas.....	35
16.	Descripción y diagnóstico de las muestras tomadas por presencia de síntomas en las finca Salado Lis Lis durante el primer muestreo (23/01/2000).....	35
17.	Descripción y diagnóstico de las muestras tomadas por presencia de síntomas en las finca Salado Lis Lis durante el primer muestreo (15/02/2000).....	36
18.	Número de bandas obtenidas al digerir un producto de PCR positivo para el ALC con las diferentes enzimas.....	37

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Imagen del fitoplasma del ALC visto en un microscopio electrónico.....	7
2.	Secuencia de los síntomas en Cocoteros Altos del Atlántico infectados con ALC. (a) Caída de cocos de todos los tamaños. (b) Necrosis de las inflorescencias. (c), (d) y (e) Amarillamiento progresivo desde la base de la corona. (f) muerte de la planta síntoma conocido como "poste telefónico"	8
3.	<i>Myndus crudus</i> adulto	10
4.	Comparación entre (a) un Enano Malayo y (b) un híbrido MAPAN	16
5.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
6.	Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLPs) o Fragmentos Polimórficos de Restricción	20
7.	Resultados de la amplificación de ADN con los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1 de algunas muestras tomadas al azar durante el muestreo en Salado Lis Lis. Las flechas señalan las muestras con resultados positivos con P1 & P7, pero negativas con LYF1 & LYR1...	34
8.	Perfil de restricción de las procedencias de Tornabé, Cayos Cochinos, Cuero y Salado y Salado Lis Lis con la enzima <i>Afu</i> I	38
9.	Perfil de restricción de las procedencias de Tornabé, Cayos Cochinos, Cuero y Salado y Salado Lis Lis con la enzima <i>EcoR</i> I	38
10.	Perfil de restricción de las procedencias de Tornabé, Cayos Cochinos, Cuero y Salado y Salado Lis Lis con la enzima <i>Bam</i> H I	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Abreviaturas utilizadas para nombrar las procedencias de las muestras.....	44
2.	Método para la recolección de muestras de aserrín de coco.....	45
3.	Protocolos para la extracción de ADN.....	46
4.	Programas para el termociclador.....	48
5.	Materiales para electroforesis	49

1. INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera*), una planta de la familia Palmae, monocotiledónea, es característica de los paisajes tropicales alrededor del mundo. Esta planta llegó al Caribe y posteriormente al resto de América, hace aproximadamente 450 años. Su origen se ubica en la Islas del Pacífico en la zona Sureccidental de Asia y África Occidental (Urbina, 1997).

La planta del cocotero se explota principalmente para la extracción de aceite de la copra (carne de coco o endosperma de la semilla). Además del aceite, la carne de coco es insumo importante en la manufactura de dulces, crema, leche de coco y variedad de productos comestibles.

Según Urbina (1997), una característica importante de esta palmera es su resistencia, no solamente a suelos salinos, sino también a la brisa salada, condición que en otras palmas produce secado de las hojas. Esta característica coloca al cocotero en una situación privilegiada en relación a otras oleaginosas.

Por otro lado, una de las mayores limitantes de esta planta es su susceptibilidad a ataques por una gran variedad de patógenos. Según Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia (1998) los problemas fitosanitarios más comunes que afectan al cocotero en Honduras son: la pudrición del cogollo (*Phytophthora palmivora*), el anillo rojo causado por un nemátodo (*Rhadinaphelenchus cocophilus*) y el "Hartrot" causado por un Tripanosoma (*Phytomonas*); sin embargo, el más importante en la actualidad es el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), una devastadora enfermedad causada por un fitoplasma. En América existen reportes de la enfermedad en Jamaica, Islas Gran Caimán, Cuba, Haití, República Dominicana, Bahamas, Estados Unidos, México, Belice y Honduras (Villanueva, *et al.*, s.f.) y es posible que ya está en Guatemala. Aunque la enfermedad fue reportada como un serio problema en la cuenca del Caribe en la década de los 70's, se reportó en Honduras hasta 1995 en las Islas de la Bahía. De ahí se desplazó, en 1996, a tierra firme, específicamente al municipio de Santa Fe, departamento de Colón. El ALC se ha ido dispersando al Este, a otros municipios de Colón, tales como Trujillo, Aguan, Limón, Triona y Baltate, y al Oeste al departamento de Atlántida, no solamente en tierra firme, sino que saltó a Cayos Cochinos¹. Se espera que eventualmente la enfermedad

¹ RAUDALES, S.T. 2000. Charla sobre ALC en Honduras. Tela, Honduras, SENASA. (Comunicación Personal)

cubra todo el territorio hondureño, por lo que es necesario impulsar planes de replantación incluso en los lugares donde todavía no ha llegado la enfermedad.

La enfermedad es transmitida por la chicharrita *Myndus crudus*. Debido a que este insecto es endémico al cocotero en el país, existen dos hipótesis principales acerca de como llegaron vectores infectados a Honduras. La primera dice que, debido a que sus estadios inmaduros habitan y se alimentan de las raíces de pastos, ninfas infectadas vinieron en pastos importados de Miami o México durante la construcción de hoteles en Roatán, Islas de la Bahía. Por otro lado, se cree que individuos infectados del vector fueron simplemente arrastrados por el viento hasta territorio hondureño.

En las comunidades garifunas, en las que aproximadamente el 75% de sus habitantes vive en extrema pobreza, los pobladores dependen en gran parte de su alimentación en los productos que ellos mismos producen. El coco constituye parte fundamental en la dieta y cultura de estas comunidades, pero desde 1995, esta importante fuente alimentaria ha sido devastado por el ALC (Catholic Relief Services Honduras/Caritas de Honduras, sin publicar).

La sintomatología del ALC incluye la caída de linternos de todos los tamaños, la necrosis de las inflorescencias, un amarillamiento progresivo desde las hojas bajas y, finalmente, la muerte de la corona, dejando solamente el estípico con un aspecto de poste telefónico. Esta sintomatología es muy similar a la del anillo rojo y la del "Harrot", por lo que el método de diagnóstico basado en síntomas visuales no es confiable. El desarrollo de métodos apropiados para distinguir e identificar las enfermedades presentes es de suma importancia. Las pruebas moleculares, además de constituir un método de diagnóstico muy preciso, permiten el estudio de la epidemiología de la enfermedad y la caracterización del patógeno, pasos indispensables para el desarrollo de un manejo integrado de la enfermedad. Además, debido a que los fitoplasmas no pueden ser cultivados en medios artificiales, lo que facilitaría su diagnóstico, las pruebas moleculares adquieren aun mayor importancia.

Una vez que la planta contrae la enfermedad, la muerte de la palma ocurre en un período de 6 a 9 meses y su posterior dispersión es sumamente rápida.

El ALC hoy en día no tiene cura. Solamente se conoce el tratamiento en base a inyecciones de oxitetraciclina que retrasa la aparición de los síntomas y puede causar remisión de los mismos en etapas tempranas de la infección. Su efecto dura de tres a cuatro meses, momento en el cual debe volverse a aplicar. Esta técnica se utiliza con fines de investigación como herramienta de diagnóstico para confirmar la etiología de un fitoplasma. Como estrategia de control, se usa solamente en palmas ornamentales de alto valor económico debido a su costo elevado y su poca eficacia para controlar una epidemia.

La única solución viable hasta la fecha es la replantación con material resistente a la enfermedad. Se conoce que los Cocoteros Altos del Atlántico de Honduras son altamente susceptibles al ALC, mientras que las variedades enanas, como el Malayo Amarillo,

Malayo Rojo y Malayo Verde, presentan un alto grado de resistencia. El problema para la adopción de las variedades enanas radica en que las comunidades costeras han utilizado siempre la variedad Alto del Atlántico, con características agronómicas muy específicas y diferentes a la de los Enanos Malayos. Estos últimos, por otro lado, se consideran para las replantaciones por el bajo costo y fácil disponibilidad de su semilla. Además de variedades resistentes, desde la década del 70, cuando inició la epidemia del ALC en Jamaica, se han desarrollado híbridos resistentes mediante el cruce entre Cocoteros Altos del Pacífico y variedades enanas. Los Cocoteros Altos del Pacífico presentan un grado de resistencia alrededor del 40% (Berlin, s.f.) y poseen características del fruto de calidad similar a las del Alto del Atlántico, que son muy apreciadas por las comunidades costeras. Ejemplos de híbridos desarrollados incluyen el MAYPAN, un cruce entre Enano Malayo y Alto de Panamá (un tipo de Alto del Pacífico), el MAPAN y el MAREN, dos híbridos producidos en Costa Rica. El MAYPAN, desarrollado en Jamaica, y las variedades enanas han sido utilizados con mucho éxito en la rehabilitación de plantaciones de cocoteros en varias islas del Caribe. El MAPAN y el MAREN han sido utilizados por la Standard Fruit Company para resembrar sus plantaciones en las localidades de Salado Lis Lis y Cuero y Salado. Sin embargo, la plantación de Salado Lis Lis está siendo afectada por una sintomatología similar a la del ALC. Actualmente, existe un fuerte programa en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en México que se ocupa de la evaluación y promoción de estas palmas (Harriss, 1999).

Es importante determinar si la cepa del patógeno es la misma en Honduras y en los lugares donde se han desarrollado los híbridos y variedades resistentes para predecir si presentarán el mismo grado de resistencia y producción bajo condiciones locales. Para lograr esto es necesario establecer ensayos de resistencia varietal en plantaciones en bloque en zonas de alta y mediana incidencia (Harriss, 1999). Es importante también caracterizar muestras del fitoplasma de distintas procedencias de Honduras y posteriormente, compararlas con muestras provenientes de otros países, tales como Jamaica, Haití, Estados Unidos, México y otros lugares afectados. Utilizando enzimas de restricción, se ha encontrado ciertas diferencias entre el fitoplasma del ALC ocurrente en Miami y el fitoplasma de Jamaica².

Actualmente, en Honduras, existen diferentes instituciones y organizaciones que trabajan en las áreas de investigación, extensión/difusión y rehabilitación en comunidades afectadas por el ALC, tales como FHIA y la "Red Salvemos el Coco", conformada por:

- Pastoral Social - Cáritas de Honduras
- Pastoral Social - Cáritas de Trujillo
- PROLANSATF (Fundación para la Protección de Lancetilla, Punta Sal y Texiguat)
- CONPAH (Confederación de Pueblos Autóctonos)
- CDH (Centro Independiente para el Desarrollo de Honduras)
- Cooperativa Alianza Garinagu
- APROSA (Asociación de Profesionales de Sangreleya)
- FUCAGUA (Fundación Capiro, Calentura y Guaymoreto)

² HARRISON, N. 1999. Conversación sobre ALC. Florida, EE.UU
, Universidad de Florida. (Comunicación Personal)

- OFRAMEH (Organización Fraternal Negra de Honduras)
- BAYAN (Asociación de Desarrollo Bahá'í)
- Programa Nacional del Coco – Dirección de Ciencia y Tecnología Agraria (DICTA) y Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (SENASA)
- Zamorano
(Catholic Relief Services Honduras/Cáritas de Honduras, sin publicar).

Una de las principales preocupaciones tratadas por la Red actualmente, es la variedad a utilizar para la replantación de las zonas afectadas. En un principio se creyó ciegamente en los híbridos, sin embargo, luego del problema surgido con los híbridos en Salatio Lis Lis, se crearon preocupaciones sobre su desempeño. Es ahí donde surgió el interés de Zamorano por clarificar la situación.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Estudiar la epidemiología del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras, utilizando técnicas moleculares, para apoyar el desarrollo de un manejo de la enfermedad.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Optimizar el método de diagnóstico molecular para el fitoplasma del ALC.
2. Evaluar la resistencia de los híbridos MAPAN al ALC.
3. Confirmar la presencia del fitoplasma en el vector reportado, *Myndus crudus*, en Honduras e identificar otros posibles vectores.
4. Detectar el fitoplasma en plantas jóvenes asintomáticas.
5. Caracterizar parcialmente el fitoplasma del ALC ocurrente en Honduras por medio de Enzimas de Restricción o "Restriction Fragment Length Polimorphisms" (RFLPs).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 COCOTERO (*Cocos nucifera*)

2.1.1 Taxonomía

La ubicación taxonómica del cocotero, según Robert y Zizumbo (1990), es la siguiente:

Reino: Vegetal

División: Tracheophyta

Sub-división: Pteropsidae

Clase: Angiospermae

Sub-clase: Monocotiloneae

Orden: Arecales

Familia: Palmaceae

Tribu: Ceroxelinae

Género: *Cocos*

Especie: *Cocos nucifera* L.

La familia *Palmae* es una de las monocotiledóneas más importantes. El género *Cocos* es monotípico debido a que solamente contiene la especie *C. nucifera* (Robert y Zizumbo, 1990).

2.1.2 Descripción botánica

La palma de coco puede vivir hasta 100 años. Tiene un solo tronco, de 20 a 30 m de altura, color gris y marcado por cicatrices en forma de anillo dejadas por hojas caídas.

Tiene hojas pinadas de 4 a 6 m de largo.

Las inflorescencias, provenientes de las axilas de las hojas, emergen envueltas por una espata. Las flores femeninas se sitúan en la base de la inflorescencia, mientras que las masculinas lo hacen en el ápice. Las flores están compuestas de pétalos lanceolados, seis estambres y un ovario de tres carpelos. La polinización cruzada ocurre con ayuda del viento o insectos.

El fruto pesa entre 1 y 2 kg. Es una drupa con un epicarpo delgado y liso, un mesocarpo fibroso con un grosor de 2 a 8 cm y un endocarpo leñoso. La semilla es rica en reservas localizadas en un endospermo, parte sólido (carne del coco) y parte líquido. Durante la germinación, la radícula sale a través de uno de los tres poros germinativos.

2.1.3 Importancia

Pequeños agricultores mantienen la producción de coco en más de 80 países subdesarrollados alrededor del mundo (Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998). En los trópicos se considera al cocotero la principal fuente de obtención de aceite (Robert y Zizumbo, 1990). Esta importancia se deriva de los siguientes beneficios que acompañan el cultivo del cocotero:

- Tolerancia a variedad de condiciones agroclimáticas
- Producción continua hasta por 60 años
- Constante provisión de productos de utilidad a las familias
- Mantenimiento de la plantación sin necesidad de inversión de capital
- Procesamiento artesanal del producto provee ingreso familiar extra

(Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998).

2.2 FITOPLASMA DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)

2.2.1 Agente causal

En 1967, los investigadores Doi, Teranaka, Yora y Asuyama (citado por Agrios, 1995), observaron al microscopio electrónico microorganismos similares a los micoplasmas, pero sin pared celular, en los tubos cribosos del floema de plantas infectadas con enfermedades del tipo "amarillamiento" (ver Figura 1). Hasta entonces se pensaba que los agentes causales de estas enfermedades eran virus. Además de la detección de esos microorganismos en las plantas, también se encontró en los insectos vectores de las enfermedades (Agrios, 1995). Ahora se conocen fitoplasmas asociados con enfermedades de más de 300 especies de plantas (Tyman, *et al.* 1997). El nombre Amarillamiento Letal fue aplicado por primera vez por Nutman y Roberts en 1955 (citado por Robert y Zizumbo, 1990).

Dos características propias de los fitoplasmas, que los permiten diferenciar de otros tipos de microorganismos son: su susceptibilidad al tratamiento con los antibióticos de la familia de las tetraciclinas, mas no al tratamiento con penicilina, suprimiéndose los síntomas de la enfermedad por algunos meses y el hecho de que no pueden cultivarse en medios artificiales (Agrios, 1995). La aplicación de antibióticos a los árboles es más exitosa cuando se inyectan directamente al tronco, ya sea por presión o flujo por gravedad y tiene mejor resultado si se aplica durante los primeros estadios de la enfermedad (Agrios, 1995).

Las células de los fitoplasmas carecen de pared celular, están rodeadas por una membrana "unitaria" compuesta de tres capas y poseen citoplasma, ribosomas y

filamentos de material nuclear. Su forma va de esferoidal a ovoide o de irregularmente tubular a filamentosa (Agueros, 1995). La falta de pared celular verdadera se debe a que los fitoplasmas carecen de la habilidad necesaria para sintetizar las sustancias requeridas para formar la pared celular (Castaño-Zapata, 1994).



Foto: Compendium of fruit diseases (1994).

Figura 1. Imagen del fitoplasma del ALC visto en un microscopio electrónico.

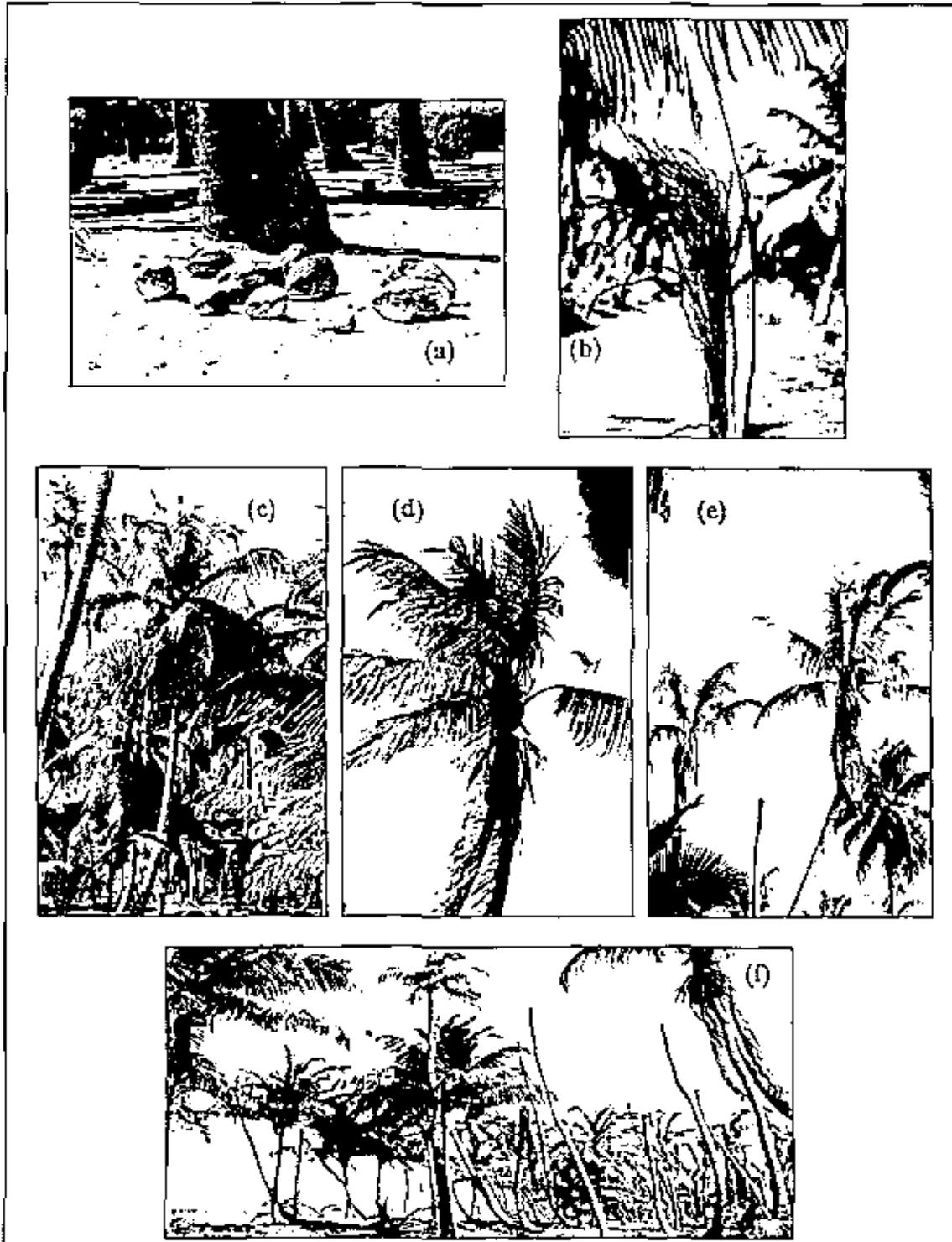
2.2.2 Síntomas

El patógeno aparece en un inicio en las células jóvenes del floema. La necrosis en las inflorescencias aún cerradas se manifiesta con puntas ennegrecidas y la mayoría de flores masculinas muertas y negras (Agueros, 1995). Las palmas mueren de 6 a 9 meses después de la aparición del primer síntoma (Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998).

Los primeros síntomas específicos en las palmeras infectadas con ALC están relacionados con tejidos en crecimiento activo:

- Caída prematura de nueces de todos los tamaños
- Necrosis de las inflorescencias inmaduras
- Muerte de terminaciones radiculares en crecimiento activo
- Amarillamiento y necrosis de las frondas comenzando de las más viejas
- Necrosis eventual de la hoja bandera
- Necrosis de los tejidos alrededor del meristema, donde se desarrolla una pudrición interna maloliente

(ver Figura 2) (Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998).



Fotos: MML Doyle

Figura 2. Secuencia de los síntomas en Cocoteros Altos de Atlántico infectados con ALC. (a) Caída de cocos de todos los tamaños. (b) Necrosis de las inflorescencias. (c), (d) y (e) Amarillamiento progresivo desde la base de la corona. (f) Muerte de la planta, síntoma conocido como "poste telefónico".

Diferentes actividades fisiológicas que se ven entorpecidas por el agente causal de la enfermedad son causantes de los distintos síntomas. El aborto de frutos y la necrosis de las inflorescencias se podrían deber a una disminución en el suministro de nutrimentos, ya que los fitoplasmas están confinados a los tubos cribosos del floema y las células vecinas, aumentando así el contenido de sólidos de las exudaciones del mismo. Estos primeros síntomas podrían deberse también a un desbalance hormonal. El amarillamiento de las hojas puede deberse al cierre de estomas, provocando una deficiencia de nutrimentos y fotosíntesis en general, o una disminución en el suministro de citocininas y giberelinas, ocasionando síntomas típicos de senescencia. La necrosis en la raíz puede deberse a la disminución en el transporte de nutrimentos a esta parte de la planta por el daño en el floema (Robert y Zizumbo, 1990). En resumen, según Casallo-Zapata (1994): "Los fitoplasmas provocan la formación de polisacáridos que bloquean parcialmente el movimiento de la savia, impidiendo la distribución normal de fitohormonas y enzimas". lo que provoca los síntomas.

Varios investigadores han mostrado que las plantas jóvenes, menores de tres años son raramente afectadas por el ALC bajo condiciones de campo (Alvarado, s.f.).

2.2.3 Dispersión

Una enfermedad con la sintomatología del ALC en América fue por primera vez descrita en las Islas Gran Caimán en 1834. El primer reporte de la enfermedad como tal fue en Jamaica en 1891. Desde entonces se ha reportado por todo el Caribe con diferentes nombres. En África existe esta y otras enfermedades causadas por un fitoplasma desde 1917 y, al igual que en América Latina, se han ido dispersando a otros países (ver Cuadro 1) (Robert y Zizumbo, 1990).

Las enfermedades de tipo Amarillamiento Letal en coco han matado aproximadamente a 15 millones de palmas de coco (Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998).

La distribución del ALC es un claro ejemplo de la distribución por salto que se considera típica de la dispersión por viento. La propagación ocurre de dos maneras:

- a) Dispersión radial o en focos. En su mayoría, el ALC se produce dentro de una zona local de unos 100 m de diámetro alrededor de un foco de alta incidencia de la enfermedad. Dentro de esta zona, la dispersión no es continua, sino que infecta un árbol y pasa por alto algunos antes de atacar a otro. Esto causa que los focos de la enfermedad sean difusos.
- b) Dispersión en "saltos". La enfermedad puede producirse brincando 100 km o más antes de establecerse un nuevo foco de infección (Robert y Zizumbo, 1990; Alvarado, s.f.).

Cuadro 1. Año en que se reportó por primera vez una enfermedad con sintomatología típica del ALC y el nombre que se le dio en distintos países de los continentes americano y africano.

Continente	País	Año de reporte del ALC	Nombre que se le dio a la enfermedad
América	Isla Caimán	1834	Desconocido
	Jamaica	1891	West end bud-rot
	Cuba	1870	Pudrición del cogollo
	Haití	1920	Desconocido
	República Dominicana	1929	Desconocido
	Bahamas	1946	Desconocido
	Estados Unidos	1937	Desconocido
	México	1977	Amarillamiento Letal
	Belice	1990	Amarillamiento Letal
	Honduras	1995	Amarillamiento Letal
África	Ghana	1932	Desconocido
	Togo	1932	Desconocido
	Camerún	1937	Kribi
	Nigeria	1951	Desconocido

Fuente: Robert y Zizumbo (1990); L. Alvarado (s.f.).

2.3 VECTOR DEL ALC: *Myndus crudus*

2.3.1 Descripción

La chicharrita o saltahojas *M. crudus* es un insecto de aproximadamente 4.5 mm de largo, con alas formando un triángulo, como techo de dos aguas, transparentes con venación café. El cuerpo es color pajizo. Poseen dimorfismo sexual, las hembras son más grandes y oscuras que los machos³ (ver Figura 3).

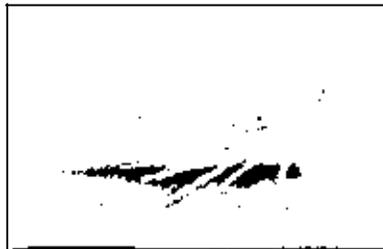


Foto: Compendium of fruit diseases (1994).

Figura 3. *Myndus crudus* adulto.

³ LASTRES, L. 1999. Charla sobre *Myndus crudus*, vector del ALC. Choluteca, Honduras. (Comunicación Personal).

2.3.2 Ciclo de vida

El *M. Crudus* tiene un ciclo de vida paurometábolo (Nault y Rodríguez, 1985), pasando por las etapas de huevo (11 días), ninfa (41 días) y adulto (50 días). Durante la etapa de ninfa o inmaduro, el insecto es subterráneo, permaneciendo en las raíces de pastos (Villanueva, *et al.*, s.f.; Nault y Rodríguez, 1985), dificultando así su detección, reconocimiento y control (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Hospederos reportados de ninfas de *Myndus crudus*.

Nombre científico	Nombre común	Familia
<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Pasto Guinea	Gramínea
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Coyolillo	Ciperácea
<i>Stenotaphrum secundatum</i> (Walt) O. Kuntze	Pasto San Agustín	Gramínea
<i>Cynodon plectostachyus</i> Pilger	Pasto Estrella de África	Gramínea
<i>Brachiaria mutica</i> (Forsk) Stapf.	Pasto Pará	Gramínea
<i>Digitaria decumbens</i> Stent.	Pasto Pangola	Gramínea
<i>Chloris petrea</i> Swartz	Barba de Judío	Gramínea
<i>Chloris inflata</i> Link.	-----	Gramínea
<i>Andropogon bicornis</i> L.	Cola de zorro	Gramínea
<i>Cyperus</i> sp.	Coyolillo	Ciperácea
<i>Fimbristylis spathaceae</i> Roth.	Junquillo, Tule	Ciperácea
<i>Paspalum notatum</i> Flugge	Bahía	Gramínea
<i>Cenchrus</i> sp.	Mozote	Gramínea
<i>Cynodon dactylon</i>	-----	Gramínea
<i>Verbena scabra</i> Vahl	-----	Vervénaceae

Fuente: Robert y Zizumba (1990); Villanueva, *et al.* (s.f.); Alvarado (s.f.).

Durante la etapa de adulto, como es característica propia de los cixidos, el *M. crudus* permanece en el envés de las hojas de monocotiledóneas (Nault y Rodríguez, 1985).

Los fitoplasmas se desarrollan en el tracto digestivo, la hemolinfa, glándulas salivales e intracelularmente en varios de los órganos corporales de los insectos vectores (Agrios, 1995). Existe transmisión de la enfermedad del ALC de una generación de insectos a la siguiente de manera transovárica, multiplicándose, en forma exponencial, el número de vectores a través del tiempo (Castaño-Zapata, 1994).

2.3.3 Confirmación del *Myndus crudus* como vector

Según Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia (1998): "Repetidas pruebas con *M. crudus* (Homoptera: Cixiidae) han dado evidencia contundente de que esta especie es vector del

ALC y probablemente sea la única". A continuación se presentan una serie de evidencias que confirman al *M. crudus* como vector:

- Extensos muestreos confirman que se alimentan de palmas susceptibles.
- La distribución geográfica del insecto coincidió con alta incidencia de la enfermedad.
- Una reducción en la dispersión de la enfermedad fue asociada con una supresión de las poblaciones de *M. crudus* al aplicar con insecticidas extensas zonas de Florida, Estados Unidos.
- Bajo condiciones de laboratorio, en la Universidad de Florida se transmitió, en repetidas ocasiones, el fitoplasma a palmas expuestas al insecto. Palmas que no estuvieron expuestas, permanecieron libres de la enfermedad. Sin embargo, otros investigadores no han podido repetir este experimento.
- Pruebas en base a detección de ADN han demostrado que *M. crudus* adquiere el fitoplasma causante del ALC al alimentarse en palmas enfermas (Howard y Harrison, 1999).

Los insectos se vuelven vectores infecciosos con mayor eficiencia cuando se alimentan de hojas y tallos jóvenes de plantas infectadas a diferencia de cuando se alimentan de tejido senescente. Además de volverse infecciosos al consumir tejidos de plantas infectadas, pueden hacerlo al ser inyectados con extractos de plantas (Agrios, 1995).

Los insectos vectores de fitoplasmas son saltahojas que se alimentan del floema miembros de las familias Cicadellidae, Coccidae, Fulgoroidea, y Psilloidea, que transmiten el fitoplasma de manera persistente (Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998). Se han reportado otros cívidos como vectores de otros fitoplasmas, tales como *Hyalosthes obsolens* Signoret, que transmite el fitoplasma del tomato big bud y *Ollarius atkinsoni* Myers, vector del phormium yellow leaf (Nault y Rodríguez, 1985).

Según Nault y Rodríguez (1985), el *M. crudus* es un vector ineficiente del fitoplasma causante del ALC, pero es tan abundante en los cocoteros, que una baja tasa de transmisión es consistente con la incidencia observada del ALC. Por el contrario, también se dice que es un vector muy eficiente, ya que propaga la enfermedad a una alta tasa de dispersión aún cuando solamente el 1% de la población de adultos adquiere el fitoplasma⁴.

En un entonces, también se creyeron vectores del ALC los insectos *Ollarianus balli* Van Duzee y *Planicephalus flavicostus* Stahl (Nault y Rodríguez, 1985). Recientemente se confirmó que *Ollarianus* sp. es el vector de la Escoba de Bruja del frijol gandul⁵ y es un posible candidato como vector del fitoplasma causante de la Hoja Pequeña de la Gliricidia (Saballos, 1999).

⁴ HOWARD, F.W. 1999. Vectores de fitoplasmas. Florida, EE.UU., Universidad de Florida. (Comunicación personal)

⁵ DOYLE, M.M. 2000. Vectores de fitoplasmas. Fco. Morazán, Honduras, Zamorano. (Comunicación Personal)

2.3.4 Transmisión del ALC

La transmisión de los fitoplasmas es circulariva (Mount y Lacy, 1982). Los períodos necesarios para que el insecto transmita el fitoplasma son los siguientes:

- a) Período de adquisición durante la alimentación de una palma infectada.
- b) Período de latencia, en el que el fitoplasma pasa del intestino del insecto a la hemolinfa y a las glándulas salivales, invadiendo las células del insecto hospedero.
- c) Período de inoculación, donde la enfermedad es transmitida debido a posterior alimentación del insecto de una planta sana.

(Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998).

Por lo general, se considera que el período de latencia de un fitoplasma en un insecto es de 10 a 45 días (Agrios, 1995). Antes del cumplimiento de este período, las glándulas salivales del insecto vector permanecen libres de infectividad (McCoy, 1983). Una vez adquirida la enfermedad, la propagación de la misma dentro del vector es circulariva (Castaño-Zapata, 1994).

Se considera que los fitoplasmas pueden reproducirse tanto en los exudados del floema de las plantas como en la hemolinfa del insecto debido a la cantidad de similitudes que existen entre ambos. Ambos transportan metabolitos y productos asimilados a lo largo de sus respectivos organismos y ambos contienen una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos, resultando en presiones osmóticas similares (McCoy, 1983).

Hasta ahora, no ha sido confirmada otra forma de transmisión del ALC. Según Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia (1998): "No existe evidencia de que las enfermedades causadas por fitoplasmas son transmitidas por semillas". Esau (1995), citado por Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia (1998), reporta que no hay conexiones vasculares entre el embrión y los tejidos de la planta madre y según Maramosch (1976), citado por Proceedings of the workshop on lethal disease of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia (1998), el lugar donde se produce la semilla en plantas infectadas es usualmente estéril. Si embargo, según estudios realizados por Harrison y Córdova ya se ha detectado la presencia del fitoplasma del ALC en el embrión de palmas enfermas⁶. Saballos (1999) reportó la presencia del fitoplasma de la Enfermedad de la Hoja Pequeña de la Gliricidia (EHPG) en las semillas provenientes de árboles infectados; el estudio fue validado por Campaña (sin publicar). Esto último puede ser explicado porque existe una ventana de tiempo en la que puede haber conexiones vasculares entre el fruto y el resto de la planta, pero es muy poco probable⁷.

⁶ CORDOVA, I. 1999. Estudios sobre la transmisión por semilla del ALC. Mérida, Méx., Centro de Investigación Científica de Yucatán (Comunicación personal)

⁷ HARRIES, H. 2000. Guía al ensayo de resistencia varietal al ALC. Mérida, Méx., Centro de Investigación Científica de Yucatán (Comunicación personal)

2.4 RESISTENCIA VARIETAL AL ALC

2.4.1 Origen de la enfermedad

Según Robert y Zizumbo (1990), existen dos teorías principales acerca del origen de la enfermedad:

- a) Origen en Oceanía • el Sur-Este de Asia. En esta región se han desarrollado cultivares resistentes, como el Enano Malayo y algunos tipos altos y cultivares presentan cierto grado de resistencia que puede ser producto de la selección de los agricultores a través del tiempo.
- b) Evolución en la región caribeña. Las palmas susceptibles al ALC en América fueron introducidas en un inicio a la Región Caribeña y la mayoría de las palmas nativas son resistentes o inmunes. Además, el insecto vector es originario de América y se encuentra tanto en palmas nativas como en las introducidas.

2.4.2 Variedades de cocotero

Los cocoteros del Atlántico se originaron de una plantación original en Mozambique y fueron introducidos por los españoles en el siglo XVI a América. Los del Pacífico, en cambio fueron introducidos también por los españoles, pero provenientes de varios sitios. Ambas poblaciones permanecieron aisladas probablemente por 500 años, hasta la creación del Canal de Panamá y el ferrocarril del istmo de Tehuantepec, a principios del Siglo XX (Robert y Zizumbo, 1990). Esta teoría no ha sido comprobada, por el contrario, es objeto de debates en el ámbito científico.

En México, el Alto del Atlántico ha mostrado una susceptibilidad al ALC cercana al 100%. Por otro lado, las variedades del Pacífico, o Alto del Pacífico, aunque no han sido expuestas a la enfermedad, por experimentos realizados en Jamaica, se espera presenten una resistencia del 50% al 80% (Robert y Zizumbo, 1990). Estas últimas han sido la base para la generación y producción de híbridos comerciales resistentes en Jamaica. Existen también los ecotipos resistentes procedentes de Malasia y Filipinas, conocidos con Enano Malayo, Enano Filipino-Malayo, entre otros (Robert y Zizumbo, 1990).

2.4.3 Características diferenciales de los genotipos altos

Debido al aislamiento genético en el que se han mantenido las variedades altas de cocotero, presentan algunas diferencias, como se aprecia en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Diferencias entre las variedades de cocoteros Alto del Atlántico y Alto del Pacífico.

Característica	Variedad	
	Alto del Atlántico	Alto del Pacífico
Apariencia del fruto	Verde, largo, Angular	Verde, bronce o amarillento, esférico
Mesocarpo	Grueso, fibroso	Delgado
Semilla	Alargada, puntiaguda, hueso grueso	Grande, casi esférica, Hueso delgado
Endosperma	Grueso	Delgado
Cantidad de agua	Menor	Mayor
Contenido de aceite	Mayor	Menor
Patrón de floración	Polinización cruzada	Polinización cruzada, a veces autogamia
Tallo	Delgado, curvado, cicatrices de las hojas irregulares	Robusto, erecto, base grande
Hojas	Largas, cuelgan cuando verdes	Menos largas, raras veces cuelgan cuando verdes
Resistencia al ALC	4-10%	50-80%

Fuente: Robert y Zizumbo (1990), Harris (1999).

2.4.4 Enano Malayo (EM): Variedad resistente

En Jamaica, desde que llegó la enfermedad, en los años 70s se observó que una plantación de palmas enanas con frutos rojos e introducidos de Malasia, era resistente al ALC. Estas palmas habían sido introducidas por sus características de precocidad y enanismo (ver Figura 4), característica deseable en una zona azotada muy a menudo por huracanes. Aunque el nivel de resistencia del EM alto y es capaz de mantener un rendimiento constante, cualidad necesaria para un programa de resiembra, posee ciertas características que lo hacen menos popular entre los agricultores, como una menor calidad de copra, una menor robustez que las variedades altas y un fenotipo de baja aceptación. Por estas razones se consideró necesaria la producción de híbridos (Robert y Zizumbo, 1990).

2.4.5 Producción de híbridos resistentes

La única solución sostenible a la problemática del ALC es la replantación de palmas de coco resistentes (Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998).

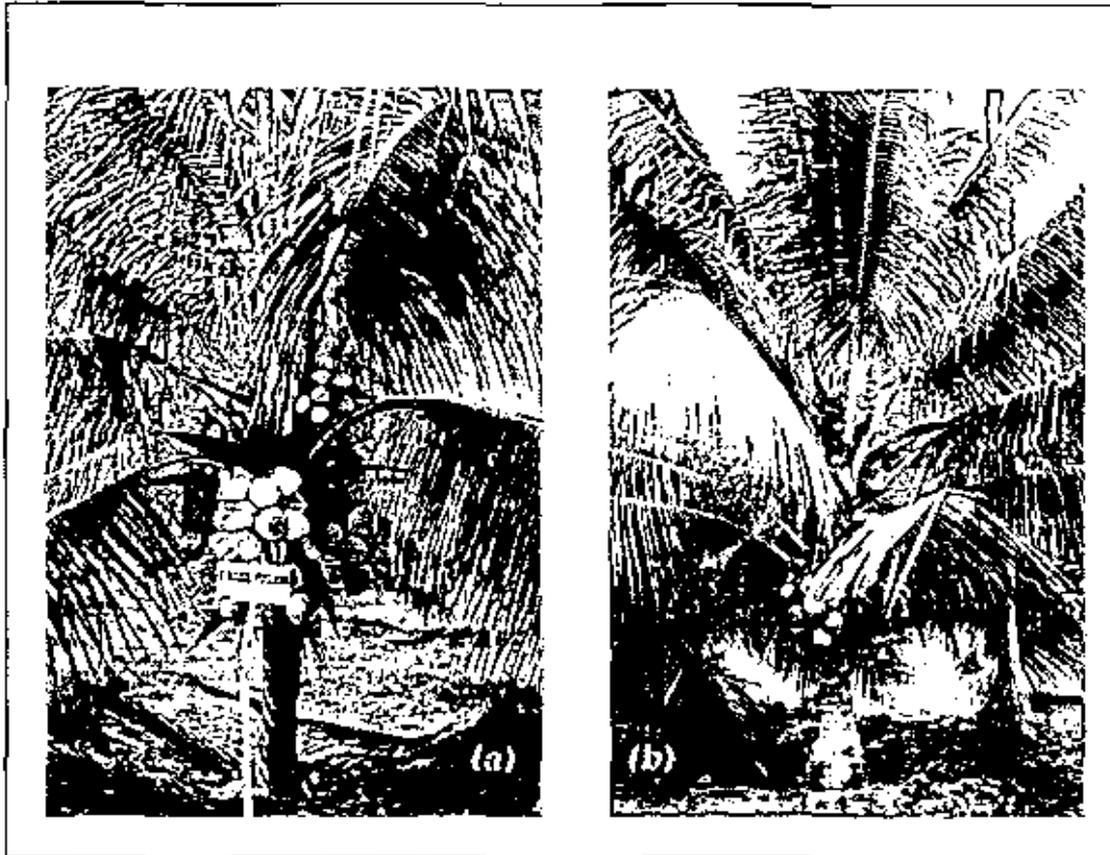
El primer híbrido resistente producido comercialmente fue el MAYPAN en Jamaica, producto del cruce EM x Alto de Panamá, un tipo de "Alto del Pacífico" (Robert y Zizumbo, 1990).

El primer híbrido resistente producido comercialmente fue el MAYPAN en Jamaica, producto del cruce EM x Alto de Panamá, un tipo de "Alto del Pacífico" (Robert y Zizumbo, 1990).

En Costa Rica se han evaluado tres híbridos principales:

- MAREN (Enano Malayo x Alto de Renell)
- MAPAN (Enano Malayo x Alto de Panamá) → igual al MAYPAN de Jamaica
- MAWAT (Enano Malayo x Alto del Oeste Africano)

(Illingworth, 1999).



Fotos: M.M. Doyle

Figura 4. Comparación entre (a) un Enano Malayo y (b) un híbrido MAPAN.

Illingworth (1999) considera que la resistencia al ALC del híbrido MAPAN podría alcanzar el 90%, aunque un 80% es aceptable.

Los cocos híbridos MAPAN, combinan las mejores características de ambos padres (ver Cuadro 4), por lo que su aceptación es mejor entre los habitantes de la Costa Atlántica. Sin embargo, su mayor limitante es el alto costo de adquisición de la semilla.

Cuadro 4. Comparación entre híbridos MAPAN y Enanos Malayos.

Característica	Híbridos MAPAN	Enanos Malayos
Maduración	3-5 años	3-5 años
Altura de la palma adulta	40 m	30 m
Color de la nuez	Dorado	Verde, amarillo o rojo
Número de nueces	Alto	Alto
Tamaño de nuez	Mayor	Menor
Contenido de copra de la nuez	Mayor	Menor
Contenido de agua de la nuez	Mayor	Menor
Estípites	Ensanchado en la base	Diámetro continuo desde la base
Resistencia al ALC	90%	80%
Disponibilidad de semilla	Baja	Alta
Rusticidad	Mayor	Menor

Fuente: Illingworth (1999).

2.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.5.1 La técnica "Polimerase Chain Reaction" (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa

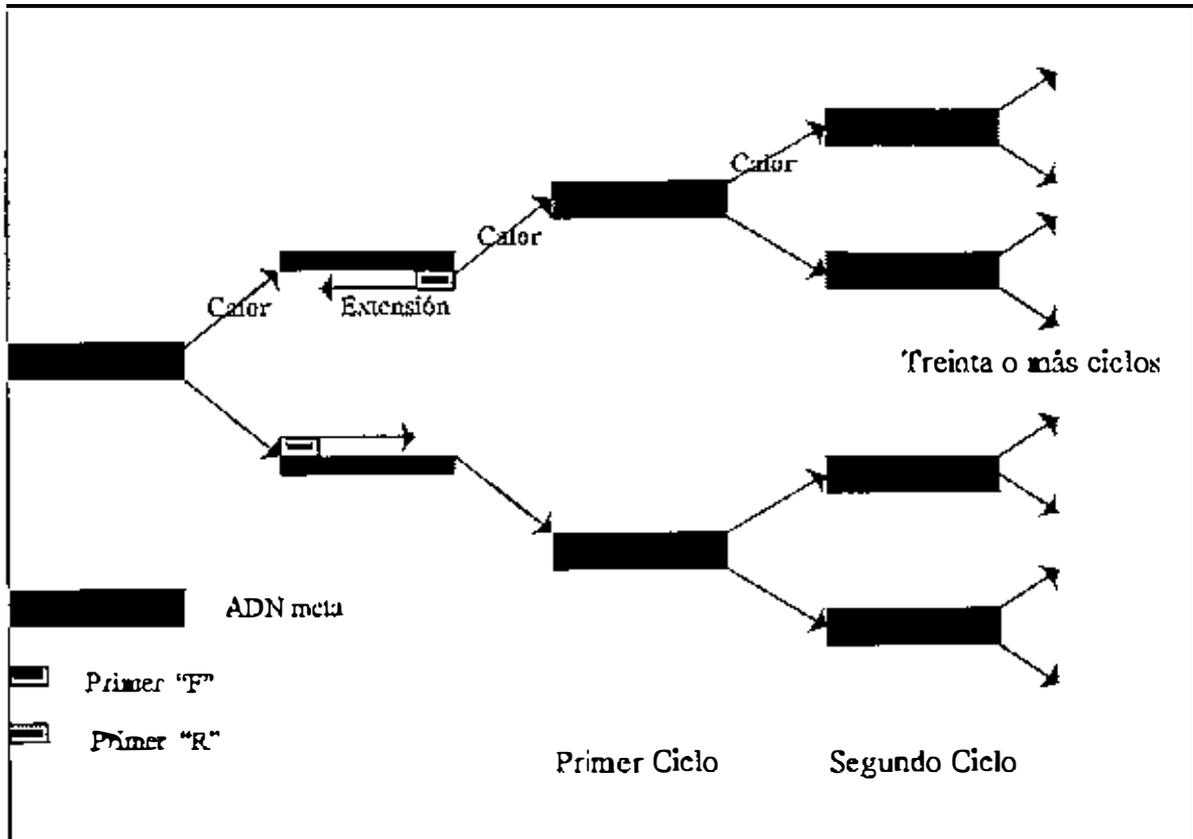
El PCR fue aplicado por primera vez, de manera exitosa, en el diagnóstico de patógenos de plantas con métodos descritos para la detección del Virus del Mosaico Común del Frijol (VMCF) (Mills, 1994).

El principio de la técnica PCR es la amplificación exponencial de una secuencia meta de ADN, tal y como se muestran en la Figura 5.

Debido a que los fitoplasmas no pueden ser cultivados en medios artificiales, su diagnóstico se ha basado principalmente en pruebas moleculares e hibridaciones de ADN (Gundersen y Lee, 1996). Las reacciones de PCR utilizando "primers"⁸ específicos o universales, derivados de secuencias del gen 16S rRNA ha proporcionado un diagnóstico altamente sensible para la detección de un amplio rango de fitoplasmas en plantas infectadas o en insectos vectores (ver Cuadro 5) (Lee, *et al.*, 1998). Sin embargo, los pares de primers seleccionados pueden afectar la especificidad de la amplificación (Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia, 1998). La sensibilidad de los primers universales basados en la detección de cierta secuencia del gen 16S rRNA es limitada para la detección de fitoplasmas debido a que secuencias no propias del fitoplasma son

⁸ "primer" = palabra en inglés para imprimidor, iniciador, echador.

their importance in Southeast Asia, 1998). La sensibilidad de los primers universales basados en la detección de cierta secuencia del gen 16S rRNA es limitada para la detección de fitoplasmas debido a que secuencias no propias del fitoplasma son frecuentemente coamplificadas (Gundersen y Lee, 1996). Lo ideal es el diseño de primers que distingan los fitoplasmas del cocotero de fitoplasmas que afectan otras plantas y, de ser posible, diferencien los distintos fitoplasmas que atacan al cocotero (Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia 1998).



Fuente: Saballos (1999).

Figura 5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

De los primers en el Cuadro 5, si se considera necesario realizar PCR anidado, según Lee, *et. al.* (1998), se pueden utilizar las siguientes combinaciones:

- PCR: R16mF2 & R16mR1; PCR anidado: R16F2n/R16R2.
- PCR: P1 & P7 ; PCR anidado: R16F2n/R16R2.

También se han desarrollado primers a partir de una secuencia de ADN genómico del fitoplasma, como los primers LYF1 & LYR1, desarrollados por N. Harrison de la Universidad de Florida (ver Cuadro 6).

Cuadro 5. Secuencias de algunos primers universales desarrollados a partir del gen 16S rRNA para el diagnóstico de fitoplasmas.

Primer	Secuencia (5' - 3')	Autores
R16mF2	CAT GCA AGT CGA ACG GA	n.d.*
R16mR1	CIT AAC CCA ATC ATC GAC	n.d.
R16F2n	GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG	n.d.
R16R2	TGA CGG GCG GTG TAC AAA CCC G	n.d.
LD16-1	CGG AAA CCT TCG GGT TTT AG	Harrison & Oropeza
LDSR	GGT GCC ATA TAT ATTAGA	Tymon & Jones
Rohde forward primer	GAG TACTAAGTG TCGGGCAA	Rohde
Rohde reverse primer	AAA AAC TCG CGT TTC AGC TAC	Rohde
rpF1	GGA CAT AAG TTA GGT GAA TTT	n.d.
rpR1	ACGATATTT AGTTCT TTT TGG	n.d.
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT AGG ATT	Deng & Hiruki
P7	TTCTCG GCTACT TCC TGC	Deng & Hiruki

*n.d. = no hay datos

Fuente: Proceedings of the workshop on lethal diseases of coconut caused by phytoplasma and their importance in Southeast Asia (1998): Lee, *et al.*, (1998).

Cuadro 6. Secuencia de los primers específicos desarrollados para la detección del fitoplasma del ALC.

Primer	Secuencia (5' - 3')	Autores
LYFI	CAT ATT TTA TTT CCT TTG CAA TCT G	Harrison
LYRI	CAGTTT ACTTICTAA TAG TTTTGC T	Harrison

2.5.2 "Restriction Fragment Length Polimorphism" (RFLPs) o Fragmentos Polimórficos de Restricción

El análisis utilizando enzimas de restricción determina el nivel de homología de la secuencia de ADN expresado en porcentaje de homología. El principio de la técnica es la separación de fragmentos de ADN de acuerdo a tamaño, pero no puede distinguir entre dos fragmentos de tamaño similar pero distinta secuencia (Mills, 1994).

La técnica consiste en la digestión de ADN con enzimas o endonucleasas de restricción, las cuales cortan el ADN en sitios específicos de reconocimiento (ver Figura 6). Los

La técnica consiste en la digestión de ADN con enzimas o endonucleasas de restricción, las cuales cortan el ADN en sitios específicos de reconocimiento (ver Figura 6). Los fragmentos que resultan del corte son separados de acuerdo a tamaño al correr las muestras en una gel de electroforesis (Mills, 1994).

Según Lec, *et al.* (1998), ya sea por secuenciación directa de ADN o por análisis de productos amplificados de PCR del gen 16S rRNA utilizando RFLP, los fitoplasmas pueden ser diferenciados y clasificados. Según Tymon, *et al.* (1998), el gen 16S rRNA ha sido utilizado para estudios de filogenia y taxonomía en la clasificación de fitoplasmas, pero opinan que aunque el análisis por RFLP es conveniente para distinguir entre fitoplasmas muy relacionados, no lo es para determinar su posición taxonómica o filogenética de uno respecto al otro.

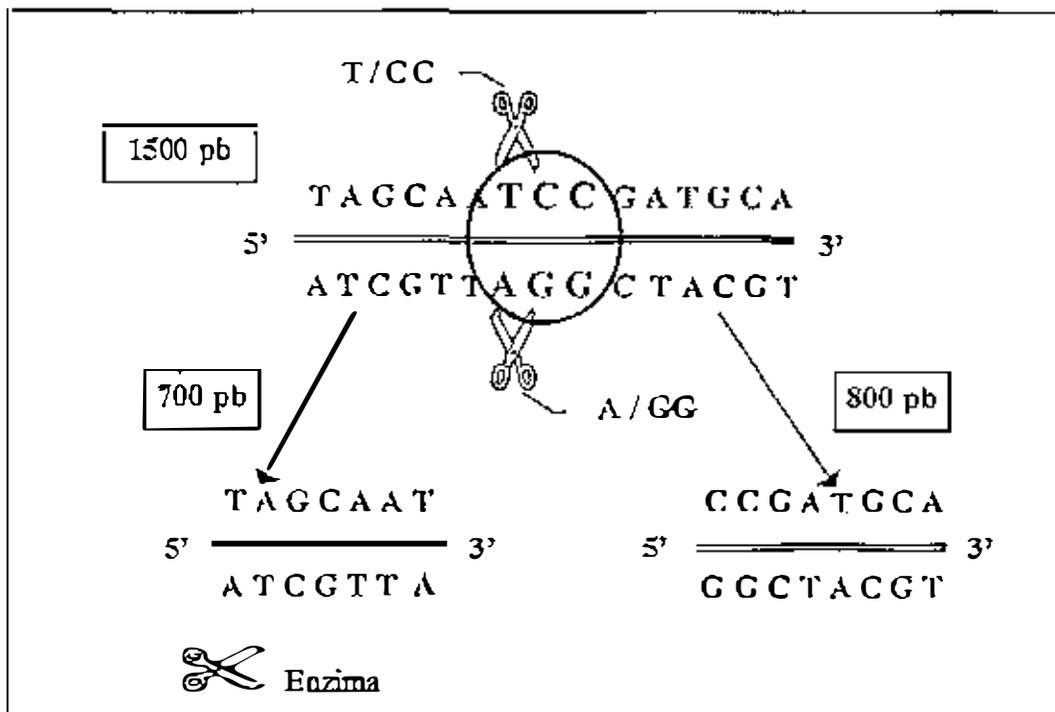


Figura 6. Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLPs) o Fragmentos Polimórficos de Restricción

Diferencias importantes entre la epidemiología y la susceptibilidad varietal sugirieron diferencias entre los patógenos de enfermedades de tipo amarillamiento letal del cocotero en los distintos continentes, americano y africano, y también entre el Este y el Oeste de África (Tymon, *et al.*, 1997). Luego, utilizando la hibridación de ADN y análisis por RFLP del gen 16S rRNA, se demostró que los patógenos encontrados causantes de las enfermedades de tipo "amarillamiento" en palma en el Caribe, en el Este y en el Oeste de África, aunque similares, son genéticamente diferentes, formando cada uno un subgrupo dentro del grupo principal de los fitoplasmas del coco. La similitud entre los fitoplasmas del ALC en Florida, el Coconut Lethal Yellowing, subsrain

substrain Ghanaian Cape St. Paul Wilt disease • “LDG” son homólogos aproximadamente entre un 94.8% y 97.98% (Tyron, *et al.*, 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

3.1.1 Nomenclatura de las muestras

Para la nomenclatura de las muestras se consideró el nombre de la enfermedad, el sitio de recolección, el número del viaje realizado a ese sitio y el número de muestra obtenido en dicho viaje de recolección.

Ejemplo: 2SLL-AL6 significa que es la sexta muestra de ALC obtenida durante el segundo viaje a Salado Lis Lis. En el Anexo 1 se indican las abreviaturas utilizadas para cada uno de los sitios de recolección visitados.

3.1.2 Obtención de las muestras

La importancia de evaluar diferentes métodos de obtención y conservación de las muestras es para facilitar el envío de las muestras al laboratorio.

Se probó el muestreo de tres tipos de tejido para evaluar con cuál se obtenían los mejores resultados. Los tejidos recolectados fueron el tejido inmaduro recién diferenciado que se encuentra alrededor del meristema apical o corazón de la palma, la base del raquis de las hojas y aserrín del tronco (ver Anexo 2).

Para la obtención de las muestras de aserrín, se desinfectó el taladro o el pépico con alcohol al 70% para luego flamearlo con un soplete y dejar enfriar.

3.1.3 Conservación de las muestras

Las muestras de palmito y de raquis se almacenaron directamente en una hielera.

Con el método tradicional de conservación del aserrín en buffer CTAB de extracción 1 + β -mercapto-etanol al 2 % es necesario que sea personal capacitado el que obtenga las muestras y tener acceso a los reactivos necesarios para preparar el buffer, y no así cualquier particular que esté interesado en una diagnóstico.

Se evaluaron diferentes métodos de obtención y conservación de aserrín. Se muestrearon cinco palmas con síntomas clásicos al ALC. De cada palma, se obtuvieron tres muestras, tratadas de la siguiente manera:

- Aserrín obtenido con taladro y conservado en tubos Falcon en una solución de 25 ml de buffer CTAB de extracción 1 con β -mercapto-etanol al 2 % como antioxidante (ver Anexo 2).
- Aserrín obtenido con taladro y almacenado directamente en bolsas plásticas sin ningún buffer antioxidante.
- Aserrín obtenido con trépano y almacenado directamente en bolsas plásticas sin ningún buffer antioxidante.

En los tres casos, las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente.

3.1.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método de extracción con CTAB modificado por Harrison (ver Anexo 3). Mediante observaciones, se evaluó: la cantidad de tejido inicial de aserrín a macerar (50 y 100 mg), la velocidad de la centrifuga (5,000 y 12,000 rpm) en las fases de precipitación de lípidos, de ácidos nucleicos y de ADN y el tiempo de cada centrifugación (5 y 10 min). La resuspensión final del ADN extraído se hizo en agua destilada estéril.

3.1.5 Amplificación de ADN

Para la amplificación del ADN del ALC se utilizaron dos pares de primers:

- P1 & P7: primers universales, basados en una secuencia de ARN ribosomal (rRNA), para la detección de fitoplasmas.
- LYF1 & LYR1: primers específicos desarrollados por N.A. Harrison de la Universidad de Florida para la detección del fitoplasma del ALC presente en la Florida, Estados Unidos, detectan una secuencia de ADN genómico.

Cuadro 7. Secuencia de nucleótidos y tamaño del producto de PCR para los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1.

Primer	Secuencia (5'–3')	Tamaño del producto de PCR (kb)
P1	AAGAGTTTG ATC CTG GCT AGG ATT	1.8
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	
LYF1	CATATTTTA TTT CCTTTG CAA TCTG	1.0
LYR1	CAGTIT ACTTCTAA TAG TTTTGCT	

Para los primers LYF1 & LYR1 se evaluó el uso de una perla completa de "PCR bead Ready to Go [®]" (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) para la amplificación de ADN y reacciones de media perla.

Cada perla contiene aproximadamente:

- 1.5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa
- 1.5 mM de MgCl₂
- 50 mM de KCl
- 10 mM de Tris-HCl (pH 9.0)
- 200 µM de cada didcoxinucleótido trifosfato
- Estabilizadores como Albúmina de Suero Bovino (BSA)

Cada perla se diluyó en:

- 22 µl de agua destilada estéril
- 1 µl del primer LYF1
- 1 µl del primer LYR1

Para la reacción completa, se le agregó 1 µl de ADN de la muestra a la mezcla de reactivos. Para la amplificación utilizando la mitad de la concentración de los reactivos, de la mezcla inicial se traspasaron 12 µl a otro tubo de microcentrifuga y a cada mitad de la reacción se le agregó 1 µl de ADN de la respectiva muestra. Las muestras 1T01, 1T02 y 1T03 se analizaron con ambos procedimientos.

Los resultados de la amplificación de ADN fueron visualizados por un transiluminador, luego de separación electroforética a 95 voltios realizada en una gel de agarosa al 0.75 % conteniendo bromuro de etidio al 2%. La gel fue cargada con 6 µl de muestra y 2 µl de buffer de carga.

3.2 DETECCIÓN DEL FITOPLASMA EN EL VECTOR REPORTADO *Myndus crudus* Y DETERMINACIÓN DE POSIBLES VECTORES

En esta fase se recolectaron especímenes de *Myndus crudus* y de otros insectos chupadores de savia en las localidades de Santa Fe, Tela, Trujillo y Salado Lis Lis en la costa atlántica hondureña.

3.2.1 Recolección de insectos

Los insectos fueron recolectados en el envés de frondas de palmos de cocotero. Se encerraron folíolos en bolsas transparentes y se golpearon para desprender los insectos, teniendo cuidado de mantener la base de la bolsa hacia arriba por la tendencia que tienen los insectos de volar hacia esa dirección. Se almacenaron en frascos con cianol al 70 %.

3.2.2 Identificación de insectos

Los insectos fueron identificados por el Dr. Ronald Cave de la sección de Protección Vegetal de Zamorano, Honduras y otros especialistas contactados por él.

3.2.3 Prueba de PCR a insectos

El ADN de insectos se extrajo utilizando el método Doyle & Doyle para insectos (ver Anexo 3). La amplificación del ADN se realizó utilizando los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1. Además de que la concentración de ADN obtenido de los insectos fue baja, no se pudo realizar PCR anidado por no tener disponibilidad de los primers necesarios. Los primers LYF1 & LYR1 detectan una secuencia de ADN genómico, mientras que los P1 & P7 detectan una secuencia de ARN ribosomal.

3.3 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS HÍBRIDOS MAPAN AL ALC

Esta investigación se realizó en una plantación de híbridos MAPAN de la Standard Fruit Company. La finca Salado Lis Lis, como se le denomina, contaba con una plantación de Altos del Atlántico que sucumbió al ALC hace aproximadamente 5 años, sin embargo ellos, adelantándose a la epidemia, habían comenzado a sembrar híbridos hace aproximadamente ocho años. Actualmente, cuenta con una población de 15,000 híbridos de edades entre tres y ocho años. El material de siembra utilizado fue comprado a la Hacienda Victoria en Costa Rica.

En la finca Salado Lis Lis se presentó una alta mortalidad de los híbridos en los últimos dos años, luego del Huracán Mitch. Dichas plantas presentaron una sintomatología similar a la del ALC por lo que se consideró necesario el análisis de muestras por métodos moleculares, luego de un muestreo representativo.

3.3.1 Metodología de muestreo

En esta línea se realizaron dos muestreos utilizando diferentes metodologías. En el primer muestreo se tomaron 21 muestras al azar sistematizado y siete muestras de palmas con características específicas, tales como presencia de síntomas clásicos de ALC (caída de frutos, necrosis de inflorescencias y amarillamiento progresivo desde las hojas bajas) y palmas de la variedad Alto del Atlántico sanas. En el segundo muestreo, realizado por M. Dollet, del CIRAD en Montpellier, Francia y M.M. Doyle de Zamorano, Honduras, se tomaron muestras de siete cocoteros con síntomas de amarillamiento severo y de tres palmas sanas. Durante este muestreo se introdujo la variante de la desinfestación, con un soplete, de la superficie del tronco en el sitio donde se extrajo la muestra y la tala de varias palmas para estudiar otras posibles causas del amarillamiento, como hongos, nemátodos o Phytomonas.

El muestreo al azar se realizó, principalmente, para determinar la incidencia del ALC en la finca. Por otro lado, los muestreos en base a sintomatología se realizaron para confirmar o desmentir la responsabilidad del ALC como agente causal de los síntomas presentes en la finca.

3.3.2 Obtención de las muestras

En ambos muestreos, el tejido recolectado de cada árbol muestreado fue aserrín, el cual se conservó en 25 ml de buffer CTAB de extracción 1 + β -mercapto-etanol al 2 %.

3.3.3. Diagnóstico

El ADN de las muestras se extrajo utilizando el método de extracción con CTAB (Doyle & Doyle) modificado por Harrison (ver Anexo 3) y se amplificó el ADN extraído utilizando los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1 (ver Anexo 4). Después de realizar el PCR, los productos fueron separados por electroforesis a 95 voltios en geles de agarosa al 0.75% conteniendo 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. Posteriormente se visualizaron las geles en un transiluminador para la interpretación de resultados.

3.4 COMPARACIÓN DE DISTINTOS AISLAMIENTOS DE ADN DEL FITOPLASMA DEL ALC UTILIZANDO RFLPs

Se utilizaron enzimas de restricción para detectar diferencias en la secuencia de ADN de muestras de las localidades hondureñas de Salado Lis Lis, Tornabé, Cayos Cochinos y Cuero Salado.

3.4.1 Enzimas de restricción utilizadas con cada primer

Las enzimas de restricción disponibles para realizar el estudio fueron *Bam*H I, *Hinf* I, *Alu* I, *Pst* I, *Eco*R I, *Rsa* I y *Hind* III. Cada una de estas enzimas se colocó en presencia del producto de PCR de un control positivo proveniente de la localidad de Tornabé (ITOTAL1) con los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1. Las enzimas de restricción se colocaron de acuerdo a las especificaciones dictadas por el fabricante:

- Para las enzimas del fabricante GibcoBRL® (*Alu* I, *Bam*H I y *Hinf* I):
Se prepararon reacciones de 20 μ l conteniendo 10 μ l de producto de PCR, 7 μ l de agua destilada estéril, 2 μ l del buffer correspondiente indicado para cada enzima (ver Cuadro 8) y 1 μ l de la enzima de restricción. Se incubó durante 4 horas a 37° C.
- Para las enzimas del fabricante Promega® (*Eco*R I, *Hind* III, *Rsa* I y *Pst* I):
Inicialmente se prepararon reacciones de 20 μ l conteniendo 1 μ l de producto de PCR, 16.3 μ l de agua destilada estéril, 2 μ l del buffer correspondiente indicado para cada enzima (ver Cuadro 8), 0.2 μ l de Suero Albúmina Bovina (BSA) a una concentración de 10 μ g/ μ l y 0.5 μ l de la enzima de restricción. Se mezclaron bien y se incubaron durante 4 horas a 37° C. Sin embargo, debido a que con este protocolo no se obtuvieron buenos resultados, se modificaron las cantidades a 1 μ l de producto de PCR, 15.6 μ l de agua destilada estéril, 2 μ l de buffer, 0.4 μ l de BSA y 1 μ l de enzima, conservando un volumen final de 20 μ l.

Los resultados de la digestión de las enzimas se corrieron en una gel de agarosa al 1.5 % en un tanque de electroforesis a 70 voltios. La gel se cargó con 6 μ l del producto de la digestión de enzimas con 2 μ l de buffer de carga.

Cuadro 8. Microorganismo del que proviene cada enzima de restricción, buffer correspondiente y sitio de restricción.

Enzima de Restricción	Microorganismo del que proviene ¹	Buffer correspondiente ¹	Sitio de restricción ¹
<i>EcoR</i> I	<i>Escherichia coli</i> RY 13	10x Buffer H	5'...G / AATT C...3' 3'...C TTAA / G...5'
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	10x Buffer H	5'...C / TGCA C...3' 3'...G ACGT / G...5'
<i>Rsa</i> I	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	10x Buffer C	5'...GT / AC...3' 3'...CA / TG...5'
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	10x Buffer E	5'...A / AGCT T...3' 3'...T TCGA / A...5'
<i>Bam</i> H I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	React® 3	5'...G / GATC C...3' 3'...C CTAG / G...5'
<i>Hinf</i> I	<i>Haemophilus influenzae</i>	React® 2	5'...G / ANT C...3' 3'...C TNA / G...5'
<i>Alu</i> I	<i>Arthrobacter Luteus</i>	React® 1	5'...AG / CT...3' 3'...TC / GA...5'

¹ Literatura adjunta con cada enzima de restricción

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

4.1.1 Obtención de las muestras

De la muestra ISLL-AL2, una muestra con síntomas clásicos de ALC, se extrajo tejido de aserrín con un taladro eléctrico, conservado en CTAB con β -mercapto-etanol al 2%; tejido del raquis de la hoja y tejido del corazón. El tejido proveniente del aserrín y del palmito resultaron positivos al analizarlos con los primers P1 & P7, mientras que las muestras de raquis arrojaron resultados negativos. Esto último se debe a que el tejido del raquis es altamente lignificado, lo cual dificulta la maceración del tejido y no permite la obtención de una buena concentración de ADN.

En base al resultado anterior, se decidió implementar en este estudio la metodología de obtención de muestra de aserrín para la extracción de ADN, debido a las siguientes ventajas que presenta en relación con el corazón de la palma:

- No es necesario sacrificar a la planta para la obtención de la muestra.
- Facilidad de obtención (el aserrín se obtiene a la altura del muestreador).
- Facilidad de conservación (el tejido no necesita de refrigeración).

4.1.2 Conservación de las muestras

Se obtuvieron mejores resultados al conservar las muestras en buffer CTAB de extracción 1 + β -mercapto-etanol. Se observaron ciertas diferencias en la detección del fitoplasma en una misma muestra con los primers P1 & P7 y los LYF1 & LYR1 (ver Cuadro 9).

Debido a estos resultados se prosiguió el estudio de tesis obteniendo muestras de tejido de tronco y conservándulo en buffer CTAB de extracción 1 + β -mercapto-etanol al 2%.

Se concluyó que al conservar el aserrín en una sustancia antioxidante, se logra una buena extracción de ADN y posterior diagnóstico. Sin embargo, dado a que se detectó el fitoplasma en algunas muestras de aserrín sin antioxidante, este método de conservación puede utilizarse en casos de emergencia en los que el material será llevado lo más pronto posible al laboratorio para su extracción y/o no se cuente con los reactivos necesarios para formular un buffer.

También, debido a que se mostraron discrepancias al utilizar los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1, se continuó amplificando todas las muestras con ambos primers. Las

discrepancias observadas en este ensayo pudieron deberse a falsos positivos obtenidos por alguna fuente de contaminación en el laboratorio.

Cuadro 9. Resultados de la amplificación de ADN de las muestras provenientes de tejido del tallo obtenido y conservado de diferentes maneras.

Muestra	Obtención de aserrín con	Conservación del aserrín	Resultados de PCR con	
			P1 & P7	LYF1 & LYR1
3To-AL1.1	Taladro eléctrico	CTAB1 + β -mercapto-etanol al 2%	+	-
3To-AL1.2	Taladro eléctrico	sin buffer antioxidante	-	-
3To-AL1.3	Trépano manual	sin buffer antioxidante	+	-
3To-AL2.1	Taladro eléctrico	CTAB1 + β -mercapto-etanol al 2%	+	+
3To-AL2.2	Taladro eléctrico	sin buffer antioxidante	-	-
3To-AL2.3	Trépano manual	sin buffer antioxidante	-	-
3To-AL3.1	Taladro eléctrico	CTAB1 + β -mercapto-etanol al 2%	+	+
3To-AL3.2	Taladro eléctrico	sin buffer antioxidante	+	-
3To-AL3.3	Trépano manual	sin buffer antioxidante	(banda tenue) +	-
3To-AL4.1	Taladro eléctrico	CTAB1 + β -mercapto-etanol al 2%	+	+
3To-AL4.2	Taladro eléctrico	sin buffer antioxidante	+	+
3To-AL4.3	Trépano manual	sin buffer antioxidante	+	+
3To-AL5.1	Taladro eléctrico	CTAB1 + β -mercapto-etanol al 2%	+	+
3To-AL5.2	Taladro eléctrico	sin buffer antioxidante	+	+
3To-AL5.3	Trépano manual	sin buffer antioxidante	+	+

4.1.3 Extracción de ADN

En esta fase de la optimización del método se realizaron observaciones que no fueron cuantificadas. Se observó que la mejor consistencia al macerar aserrín se obtuvo al utilizar 50 mg de tejido en 600 μ l de CTAB1 + β -mercapto-etanol al 2%; al aumentar a 100 mg la cantidad de tejido, el producto macerado quedó con una consistencia pastosa.

La mejor formación de "pellets"⁹ de ADN se observó al centrifugar durante 5 min a 12,000 rpm, en todas las fases que requieren centrifugación (precipitación de lípidos, precipitación de ácidos nucleicos y precipitación de ADN). Al aumentar el tiempo de centrifugación, se obtuvieron pellets "sucios", o sea, precipitación de material indeseable.

La resuspensión de ADN se realizó en 50 µl de agua destilada. Se observó que de 19 muestras analizadas cuatro meses después de su extracción, nueve presentaban un "pellet" no resuspendible (ver Cuadro 10). Debido a estos resultados, se recomienda realizar la resuspensión en TE Buffer, como lo indica el protocolo de extracción Doyle & Doyle (modificado por Harrison).

Cuadro 10. Muestras con ADN en solución y ADN no resuspendible cuatro meses después de su extracción.

Muestra	Sol*/NR**	Muestra	Sol*/NR**
ITr-AL1.1	NR	ITo-AL2.1	Sol
ITr-AL1.2	NR	ITo-AL2.2	Sol
ITr-AL1.3	NR	ITo-AL2.2	Sol
ISF-AL1.1	NR	ITo-AL2.3	Sol
ISF-AL1.2	NR	ITo-AL2.5	Sol
ISF-AL1.3	NR	ITo-AL3.1	Sol
ITo-AL1.1	Sol	ITo-AL3.2	Sol
ITo-AL1.3	Sol	ITo-AL3.4	NR
ITo-AL1.4	NR	ITo-AL3.5	NR
ITo-AL1.5	Sol		

*Sol - ADN en solución

**NR - ADN no resuspendible

4.1.4 Amplificación de ADN

Como se observa en el Cuadro 9, se presentaron algunas incongruencias entre los resultados obtenidos al amplificar el ADN con los primers P1 & P7 y al amplificar con LYF1 & LYR1, obteniéndose un mayor número de positivos con los P1 & P7. La razón de estas diferencias puede radicar en el hecho de que los primers P1 & P7 estén amplificando secuencias del gen 16S rRNA no específicas a los fitoplasmas.

Las muestras preliminares amplificadas utilizando los primers LYF1 & LYR1 con un "PCR bead Ready To Go" completo y media reacción, no presentaron diferencias en sus resultados, como se muestra en el Cuadro 11. Por lo anterior, se continuó con el estudio utilizando solamente media reacción para la amplificación de cada muestra.

⁹ "pellet" = gránulo, pelotita

Cuadro 11. Resultado de la amplificación de tres muestras con los primers LYF1 & LYR1 utilizando la reacción completa de una perla de "PCR beads Ready to Go" y media reacción.

Reacción completa/media	Muestra		
	ITo1	ITo2	ITo3
Completa	+	+	-
Media	+	+	-

4.2 DETECCIÓN DEL FITOPLASMA EN EL VECTOR REPORTADO *Myndus crudus* Y DETERMINACIÓN DE POSIBLES VECTORES

4.2.1 Identificación de insectos

Cuadro 12. Taxonomía de los insectos encontrados en el envés de las hojas de palmas de cocotero.

Orden	Familia	Género	Especie
Homoptera	Cixiidae	Myndus	<i>M. crudus</i>
Homoptera	Derbidae	Neocenchrea	-----
Homoptera	Derbidae	Neocenchrea	-----
Homoptera	Cicadellidae	Erythrogonia	<i>E. laudata</i>
Homoptera	Cicadellidae	-----	-----

Estos resultados confirman la presencia de *Myndus crudus* en territorio hondureño. Los insectos de la familia Derbidae probablemente no sean vectores del ALC, ya que no se conoce ningún insecto miembro de esta familia como vector de alguna enfermedad. Sin embargo, en África actualmente se realizan pruebas de transmisión de fitoplasmas del cocotero con insectos de esta familia¹⁰.

Los insectos de la familia Derbidae fueron enviados para su identificación a la Universidad de Florida, pero su clasificación a nivel de especie fue imposible debido a que, por su conservación en alcohol, los especímenes llegaron deteriorados. El último insecto recolectado se pudo identificar solamente a nivel de familia (Cicadellidae). Por lo anterior, es necesario conservar los especímenes secos para facilitar la labor de los taxónomos.

¹⁰ HOWARD, F.W. 1999. Vectores de Fitoplasmas. Florida, EE.UU., Universidad de Florida. (Comunicación personal).

4.2.2 Prueba de PCR a insectos

Se realizaron extracciones de ADN a 23 individuos de la especie *Myndus crudus*, de los cuales ninguno lanzó resultados positivos al ser amplificado su ADN, tanto con los primers P1 & P7 como con los LYF1 & LYR1. Estos resultados son razonables si se considera que solamente el 1% de la población de *M. crudus* adquiere el fitoplasma¹¹, aunque no se descartan falsos negativos debido a una baja concentración de ADN extraída del insecto. Otro factor que pudo haber influido negativamente en la detección del fitoplasma en los insectos es la recolección de los especímenes en envés de hojas de palmas jóvenes asintomáticas por razones logísticas, lo que disminuye la probabilidad de haber recolectado individuos infectados.

Se extrajo también el ADN a tres individuos de la especie *Erythronia laudata*, a tres individuos de una de las especies del género *Neocenchrea* y a un individuo de la otra especie del género *Neocenchrea*. Con ninguno se obtuvo resultados positivos al amplificar el ADN con ambos primers.

En estudios futuros, para compensar la baja concentración de ADN que se extrae de insectos, se puede realizar PCR anidado. Se ha reportado que se puede realizar PCR con los primers P1 & P7 y PCR anidado con los primers R16F2n & R16R2 cuya secuencia se describe en el Cuadro 5.

4.3 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS HÍBRIDOS MAPAN

En los Cuadros 14, 16 y 17 se muestran los resultados de los muestreos realizados en las Finca Salado Lis Lis, propiedad de la Standard Fruit Company, plantada con híbridos MAPAN, provenientes de la Hacienda Victoria, en Costa Rica.

En el muestreo al azar realizado en Salado Lis Lis, el 33% de las muestras amplificadas con P1 & P7 fueron positivas, pero sólo un 19% lo fueron con LYR1 & LYR1 (ver Cuadro 12). Sin embargo, en las tres muestras en que se observan discrepancias entre ambos primers, las bandas correspondientes al producto amplificado por P1 & P7 se ubican a una altura mayor a la correspondiente para el producto de 1.8 kb esperado para el ADN del fitoplasma.

Cuadro 13. Incidencia del fitoplasma del ALC en a finca Salado Lis Lis detectado con los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1 en el muestreo al azar.

Par de primers	Muestras tomadas	Resultados positivos	Incidencia del fitoplasma
P1 & P7	21	7	33%
LYF1 & LYR1	21	3	19%

¹¹ HOWARD, F.W. 1999. Vectores de Fitoplasmas. Florida, EE.UU., Universidad de Florida. (Comunicación personal).

Cuadro 14. Descripción y diagnóstico de las muestras tomadas al azar en la finca Salado Lis Lis el 28/01/2000.

Muestra	Edad planta (años)	Inflorescencia	Frutos	Hojas	Observaciones	Resultados	
						P1, P7	LYF1, LVRI
2SLL1	6	Necrótica	Caidos		Aplicación Ridomil	-	-
2SLL2	5	No parida		100% amarillas	En zona con alta humedad	-	-
2SLL3	3	No parida			Asintomática	-	-
2SLL4	4-5	No parida		100% amarillas	En zona con alta humedad	-	-
2SLL5	5	Recién parida			Asintomática	-	-
2SLL6	5	Recién parida			Asintomática	+*	-
2SLL7	5			Quedan 2 hojas superiores amarillas	Muerta	+	+
2SLL8	5	No cuaja floración	No cargada		Alto del Atlántico	+*	-
2SLL9	5	No parida		100% amarillas	En zona con alta humedad	-	-
2SLL10	4	No parida		Hojas bajas caídas		+	+
2SLL11	5	No parida			Asintomática	-	-
2SLL12	5		Cargada		Comienza a botar frutos	-	-
2SLL13	5	Recién parida			Asintomática	-	+
2SLL14	6		Cargada		En zona con alta humedad	-	-
2SLL15	3	No parida		Hojas bajas caídas		+	+
2SLL16	3	No parida			Asintomática	-	-
2SLL17	3	No parida			Asintomática; raquitica	+	+
2SLL18	4.5	No parida			Asintomática	+*	-
2SLL19	4.5	No parida			Asintomática	-	-
2SLL20	6		Cargada		Asintomática	-	-
2SLL21	6	Necrótica				-	-

* Producto de PCR de estas muestras es de mayor tamaño que las 1.8 kilobases esperadas.

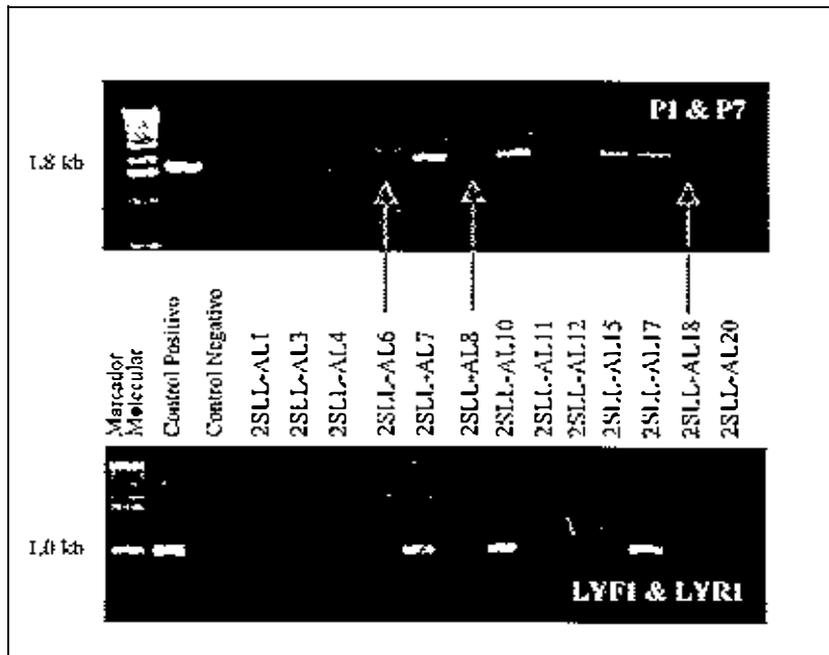


Figura 7. Resultados de la amplificación de ADN con los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1 de algunas muestras tomadas al azar durante el primer muestreo en Salado Lis Lis. Las flechas señalan las muestras con resultados positivos con P1 & P7, pero negativas con LYF1 & LYR1.

Los resultados de las tres muestras positivas con P1& P7, pero negativas con LYF1, LYR1, pueden explicarse, al igual como se menciona en la sección 4.1.2, en la posibilidad que los primers P1 & P7 estén amplificando secuencias del gen 16S rRNA de algún organismo contaminante que no sea el fitoplasma del ALC. Si se observa cuidadosamente la fotografía de la gel con los productos de PCR amplificados por P1 & P7 (Figura 7), se distingue que las muestras con discrepancias tienen una altura de bandas diferente, lo cual denota un producto amplificado de PCR de mayor tamaño que lo esperado para el fitoplasma, por lo que es una prueba de la posible amplificación de ADN de otro microorganismo.

Por lo anterior, se toman como resultados del muestreo los obtenidos con LYF1 & LYR1. Se concluye que, aunque se detectó un 19% de incidencia de ADN del fitoplasma, no es una prueba fehaciente de que sea la incidencia de la enfermedad, porque no se pudo confirmar que el fitoplasma estuviera causando los síntomas. Por el contrario, en ese mismo muestreo, de las seis muestras tomadas por la presencia de síntomas considerados clásicos del ALC en palmeras híbridas, ninguna resultó positiva al amplificar su ADN tanto con los primers P1 & P7, como con los LYR1 & LYF1. Los mismos resultados se obtuvieron del segundo muestreo por síntomas, en el que de siete muestras analizadas en ninguna se detectó el fitoplasma (ver Cuadro 15). Esto, además indica, una vez más, la poca confiabilidad de un diagnóstico visual.

Cuadro 15. Incidencia del fitoplasma del ALC en a finca Salado Lis Lis detectado con los primers P1 & P7 y LYF1 & LYR1 en ambos muestreos por síntomas.

Par de primers	Muestras tomadas	Resultados positivos	Incidencia del fitoplasma
P1 & P7	13	0	0%
LYF1 & LTR1	13	0	0%

Cuadro 16. Descripción y diagnóstico de las muestras tomadas por presencia de síntomas en la finca Salado Lis Lis durante el primer muestreo (28/1/2000).

Muestra	Edad planta (años)	Inflorescencia emergida	Frutos	Hojas	Observaciones	Resultados	
						P1, P7	LYF1, LYR1
2SLL22	6	Necrótica	Caidos	Hojas bajas amarillas	Híbrido	+	-
2SLL23	6	Necrótica	Caidos	Hojas bajas secas	Híbrido	-	-
2SLL24	6	Necrótica	Caidos	Hojas bajas secas	Híbrido	-	-
2SLL25	6	Necrótica	Caidos		Híbrido	-	-
2SLL26	6		Botando		Híbrido	-	-
2SLL27	6	Necrótica	Caidos	Hojas bajas caídas	Híbrido	-	-
2SLL28	50-60				Alto del Atlántico asintomático	+	+

Los resultados de muestreo al azar y los muestreos por síntomas (Cuadros 16 y 17) llevan a concluir que la causa de mortalidad de estos híbridos es algún factor abiótico que está causando la aparición de síntomas que pueden confundirse con los provocados por el ALC. Sin embargo, la enfermedad sí está atacando la plantación, ya que el muestreo al azar revela la presencia de la enfermedad en algunos híbridos, aunque una mortalidad de hasta 20% de los híbridos es aceptable.

Cuadro 17. Descripción y diagnóstico de las muestras tomadas por presencia de síntomas en la finca Salado Lis Lis durante el segundo muestreo (15/2/2000).

Muestra	Edad planta (años)	Inflorescencia	Frutos	Hojas	Observaciones	Resultados	
						P1, P7	LYF1, LYR1
3SLL1	6	Necrótica	Caidos	100% amarillas	Tratada con Tetraciclina	-	-
3SLL2	6-8		Cargada		Tratada con boost	-	-
3SLL3	6-8	Necrótica	Caidos	amarillamiento leve	Tratada con tetraciclina	-	-
3SLL4	6-8	Necrótica	Caidos		Tratada con tetraciclina	-	-
3SLL5	6-8	Necrótica	Caidos	Bajeras necróticas		-	-
3SLL6	6-8	Necrótica (aparente)	Botando	Verdes	Tratada con tetraciclina	-	-
3SLL7	6-8		Cargada (cocos verdes)		Asintomática	-	-
3SLL8	6-8		Cargada (cocos amarillos)			-	-
3SLL9	6-8	Necrótica	Caidos	100% amarillas	Tratada con tetraciclina	-	-
3SLL10	3	No parida		100% amarillas		-	-

El muestreo al azar descarta la suposición de que la enfermedad no ataca plantas inmaduras, como se ha reportado en la literatura. De las cuatro muestras diagnosticadas positivas para la presencia del fitoplasma del ALC con LYF1 & LYR1 en el muestreo al azar, tres fueron de palmas inmaduras. Es necesario investigar si el periodo de latencia es mayor en estas palmas y realizar observaciones para determinar cuáles son los primeros síntomas visibles de la infección por ALC.

También se detectó el fitoplasma del ALC en cinco muestras de palmas menores de dos años con síntomas de amarillamiento severo; tres en Cayos Cochinos y dos en la plantación de Cuero y Salado. Esto confirma, una vez más, que puede existir infección y mortalidad en palmas jóvenes a causa del ALC.

4.4 COMPARACIÓN DE DISTINTOS AISLAMIENTOS DE ADN DEL FITOPLASMA DEL ALC UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y RFLPs

En el Cuadro 18 se presentan los resultados de las pruebas preliminares con las enzimas de restricción utilizadas.

Cuadro 18. Número de bandas obtenidas al digerir un producto de PCR positivo para ALC con las diferentes enzimas.

Enzima	No. de bandas	
	PI, P7	LYF1, LYR1
<i>Bam</i> H I	1	2
<i>Hinf</i> I	0	0
<i>Alu</i> I	4	1*
<i>Pst</i> I	1*	1*
<i>Eco</i> R I	2	2
<i>Rsa</i> I	¿?	3
<i>Hind</i> III	1*	1*

*Se observa una banda a la altura del producto de PCR propio del primer, 1.8 kb para P1, P7 y 1.0 kb para LYF, LYR1.

¿? No se pudo interpretar los resultados por presencia de bandas muy tenues.

La visualización de la digestión realizada por algunas enzimas dio como resultado sólo una banda a diferente altura del producto de PCR esperado. Esto pudo deberse a que, por limitaciones en el tamaño de la gel, no se dejó correr mayor distancia el ADN. Por lo anterior.

4.4.1 Pruebas con RFLPs a muestras de distintas procedencias de Honduras

No se detectó diferencias entre muestras procedentes de las localidades de Salado Lis Lis, Tomabé, Cuero Salado y Cayos Cochinos (figuras 8, 9 y 10). Sin embargo, estos resultados no descartan la probabilidad de una diferencia entre los fitoplasmas provenientes de tres localidades, ya que solamente se analizó el segmento de ADN amplificado por los primers P1 & P7, y no así todo el genoma del fitoplasma.

Con los primers LYF1 & LYR1 se obtuvieron bandas muy tenues que no permiten emitir conclusiones, incluso al duplicar la concentración de los reactivos y la cantidad de ADN para la digestión por enzimas.

No se pudo obtener el peso molecular de las bandas obtenidas con las enzimas por no contar con un marcador molecular adecuado.

Es necesario contar con un mayor número de primers para analizar un mayor número de secuencias de ADN o ARN del fitoplasma.

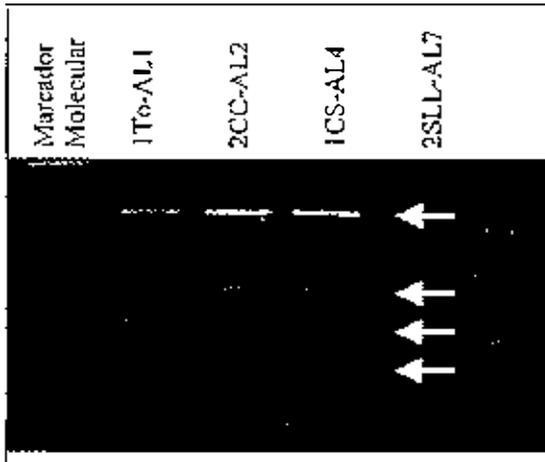


Figura 8. Perfil de restricción de las procedencias de Tomabé, Cayos Cochinos, Cuero y Salado y Salado Lis Lis con la enzima *Alu* I.

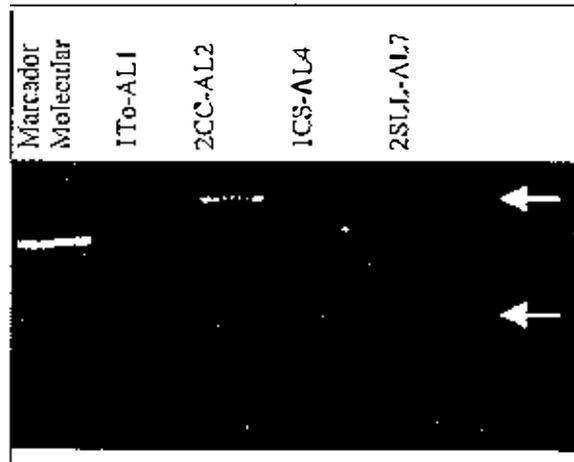


Figura 9. Perfil de restricción de las procedencias de Tomabé, Cayos Cochinos, Cuero Salado y Salado Lis Lis con la enzima *EcoR* I.

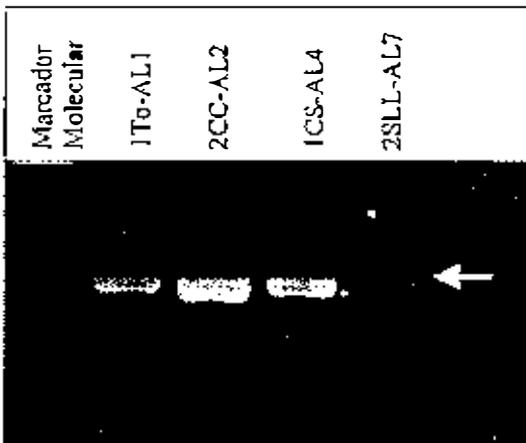


Figura 10. Perfil de restricción de las procedencias de Tomabé, Cayos Cochinos, Cuero Salado y Salado Lis Lis con la enzima *BamH* I.

5. CONCLUSIONES

Las muestras obtenidas en forma de aserrín del tejido del tronco deben ser almacenadas en un buffer con un antioxidante. Al desinfectar la superficie del tronco en el lugar donde se obtiene la muestra, los resultados del diagnóstico se vuelven aún más confiables. Una vez cumplidas estas dos condiciones, el diagnóstico de muestras en forma de aserrín constituye una manera viable de establecer un diagnóstico sin la necesidad de destruir la planta. Pero debido a que este constituye un método de muestreo realizable con personal especializado, para el envío de muestras por parte de personas no especializadas, se deberán obtener las muestras de tejidos tales como el corazón de la palma o los folíolos de la base de hojas tiernas.

El uso de los primers LYF1 & LYR1 es más confiable que el uso de P1 & P7, ya que permiten asegurarse que lo diagnosticado es, en efecto, el fitoplasma del ALC y no alguna secuencia de otro organismo. Sin embargo, para los diagnósticos, es preferible continuar utilizando ambos pares de primers para obtener resultados más confiables.

El uso de la mitad de la reacción del producto comercial "PCR beads Ready to Go[®]" es igualmente confiable para el diagnóstico de muestras que el uso de la reacción completa, cuando se utilizan los primers LYF1 & LYR1. Esto tiene implicaciones económicas positivas.

El vector reportado del ALC en América, *Mynodus crudus* existe también en Honduras, aunque no se logró confirmar la presencia del fitoplasma del ALC en el insecto.

La sintomatología similar a la del ALC que se observa en la plantación de híbridos resistentes MAPAN de la Standard Fruit Company en Salado Lis Lis está siendo causada probablemente por un factor abiótico y no por ALC, como se creyó en un principio. Aunque el fitoplasma está presente en la plantación, su incidencia es menor a lo esperado (19%), si se considera que los híbridos productos del cruce entre un Enano Malayo y un Alto del Pacífico tienen una resistencia natural del 80% a la enfermedad (Berlin, s.f.). Sin embargo, no se logró determinar la incidencia de la enfermedad ya que no se confirmó si la detección del fitoplasma implica manifestación de los síntomas de la enfermedad.

El fitoplasma del ALC, contrario a lo que se reporta en alguna literatura, sí ataca palmeras inmaduras.

6. RECOMENDACIONES

Evaluar diferentes métodos de conservación del tejido, tales como detergentes caseiros con la adición de antioxidantes naturales como limón. De lograrse los anterior, se facilitaría la logística en el envío de muestras al laboratorio para su diagnóstico.

Obtener otros primers que permitan la realización de PCR anidado para la detección del fitoplasma del ALC en insectos. Por ejemplo, se pueden evaluar pares de primers basados en el gen 16S rRNA, tales como:

- R16mF2 & R16mR1 y R16F2n/R16R2
- P1 & P7 y R16F2n/R16R2.

Realizar un inventario de los insectos que se encuentren alimentándose del cocotero. Los especímenes deberán ser introducidos a un frasco letal luego de ser atrapados para facilitar su posterior identificación.

Realizar ensayos de transmisión del fitoplasma del ALC con los insectos recolectados, identificados y que se consideren posibles vectores de la enfermedad. Puede considerarse llevar a los ensayos en otras especies de palmas susceptibles al ALC con las que se pueda trabajar mejor.

Realizar un mapeo de cada una de las palmas muestreadas y diagnosticadas para darles un seguimiento y obtener aproximaciones del tiempo de latencia de la enfermedad en el cocotero.

Aunque todavía se necesitan evaluaciones, la resiembra con híbridos es una alternativa viable, siempre y cuando se identifique el factor de mortalidad en la finca Salado Lis Lis y pueda prevenirse en otras localidades.

Para obtener mejores resultado, en próximas pruebas que se realicen con enzimas de restricción, se recomienda utilizar marcadores moleculares menores de 1 kb y correr las muestras en geles de poliacrilamida para obtener una mejor resolución de las bandas y una mayor distancia recorrida por el ADN.

7. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. Mexico D.F., México. Limusa. 838 p.
- ALVARADO, L. s.f. Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Tegucigalpa, Hond.. Dirección de Ciencia y Tecnología Agropccuaria. s.p.
- BERLIN, C. s.f. Coconut palms in Belize: Lethal Yellowing. www.ambergiscaye.com/cocopalms/ly.html
- CASTAÑO-ZAPATA, J. 1994. Principios básicos de la fitopatología. 2 ed. Zamorano, Hond., Zamorano Academic Press. 518 p.
- COMPENDIUM OF TROPICAL FRUITS DISEASES. 1994. Ed. by R.C. Ploetz, G.A. Zentmyer, W.T. Nishijima, K.G. Rohrbach, H.D. Ohr. Mirmesota, EE.UU., APS Press. 88 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 rehabilitation. La Lima, Hond.. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. s.p.
- HARRISON, N.A.; RICHARDSON, P.A.; KRAMER, J.B.; TSAI, J.H. 1994. Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polimerase chain reaction. *Plant Pathology*. 43:998-1008.
- HOWARD, F.W.; HARRISON, N.A. 1999. Lethal yellowing of palms. <http://www.fhd.ufledu/lyfacts.htm>.
- ILLINGWORTH, R. 1999. El mejoramiento del cocotero para resistencia al amarillamiento letal. Mérida. Méx., Centro de Investigación Científica de Yucatán. 10 p.

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL D.E.; DAVIS, R.E.; BARTOSZYK, I.M. 1998. Revised classification scheme of *phytoplasmas* based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* (G.B.). 48:1153-1169.

McCOY, R.E. 1983. Wall-free prokaryotes of plants and invertebrates. *In* *Phytopathogenic bacteria*. Ed. by M.P. Starr. U.K., CAB International. p. 578-602.

MILLS, P.R. 1994. DNA based methods for identification and characterization. *In* *The identification and characterization of pest organisms*. Ed. by D.L. Hawksworth. U.K., CAB International. p. 347-375.

MOUNT, M.; LACY, G. 1982. *Phytopathogenic Prokaryotes: Volume 2*. Nueva York, EE.UU., Academic Press. 541 p.

NAULT, L.; RODRIGUEZ, J. 1985. *The leafhoppers and planthoppers*. EE.UU., John Wiley & Sons, Inc. 499 p.

PROCEEDINGS OF THE WORKSHOP ON LETHAL DISEASES OF COCONUT CAUSED BY PHYTOPLASMA AND THEIR IMPORTANCE IN SOUTHEAST ASIA (1998, Manado, Indonesia). 1999. Ed. by D. Alloreng; H.C. Harries, P.Jones, J.S. Warokka. Jakarta, Indonesia, Asian & Pacific Coconut Community. 113 p.

ROBERT, M.L.; ZIZUMBO, D. 1990. La problemática del amarillamiento letal del cocotero en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Méx. 197 p.

SAIBALLOS, A. 1999. Diagnóstico molecular y estudio de la epidemiología del fitoplasma de la hoja pequeña de la gliricidia (*Gliricidia sepium*). Tesis Lic. Zamorano, Hond., Programa de Ingeniero Agrónomo/Zamorano. 72 p.

TYMON, A.M.; JONES, P.; HARRISON, N.A. 1997. Detection and differentiation of African coconut phytoplasmas: RFLP analysis of PCR-amplified 16S rRNA and DNA hybridisation. *Annals of Applied Biology*. 131(1):91-102.

_____; JONES, P.; HARRISON, N.A. 1998. Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of oligonucleotide PCR primers. *Annals of Applied Biology*. 132(3):437-452.

URBINA, N.E. 1997. Plan de monitoreo, control, capacitación y comunicación del amarillamiento letal del cocotero. Tegucigalpa, Hond., Secretaría de Agricultura y Ganadería. 10 p.

VILLANUEVA, J.; PIÑA, J.; CARRILLO, H. s.f. El amarillamiento letal del cocotero. Mérida, México, Centro de Investigación Científica de Yucatán. 11 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. ABREVIATURAS UTILIZADAS PARA LAS NOMBRARLAS
PROCEDENCIAS DE LAS MUESTRAS

Te	-	Tela
SLL	-	Salado Lis Lis
CC	-	Cayos Cochinos
SF	-	Santa Fe
Tr	-	Trujillo
To	-	Tomabé
CS	-	Cuero Salado
U	-	Utila

Anexo 2. MÉTODO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ASERRÍN DE COCO

Materiales

- Taladro
- Broca de 5/16 de diámetro
- Tubos con buffer de extracción CTAB 1 + β -mercapto-etanol
- Soplete
- Etanol al 70%
- Papel aluminio

Procedimiento

1. Desinfectar la broca con etanol y flamearla con el soplete durante 10 seg.
2. Perforar el tronco del cocotero con el taladro, ubicando un trozo de papel aluminio debajo para recolectar 3 gr. de aserrín.
3. Colocar el material recolectado en los tubos con buffer previamente preparados.
4. Rotular la muestra.
5. Agitar la muestra y almacenarla a temperatura ambiente.

Anexo 3. PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Reactivos

- Buffer CTAB 1
 - 2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)
 - 100 mM Tris-HCl pH 8 (misma base)
 - 20 mM EDTA pH 8 (ácido etilendiaminotetraacético)
 - 1.4 M NaCl
 - 1 % Polyvinilpirrolidona
 - 0.2 % β -mercaptoctanol
- Buffer CTAB 2
 - 10 % CTAB
 - 0.7 M NaCl
- Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1)
- TE alto en sal
 - 0 mM Tris-HCl pH 8
 - 1 mM EDTA
 - 1 M NaCl
- Isopropanol
- Etanol al 95%
- TE Buffer (500 ml) para resuspender el ADN

Trizma base (PM 121.1:10 mM)	1.21 gr
EDTA (1 mM)	0.185 gr
Agua destilada	500 ml
pH	8.0 (ajustado con HCl concentrado)

Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C

Equipo

- Morteros y pistilos estériles
- Arena de cuarzo ultrapura
- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Puntas de micropipetas
- Incubadora
- Tubos de microcentrífuga (1.5 ml)
- Microcentrífuga

Procedimiento para la extracción de ADN de aserrín de palma
Método Doyle & Doyle modificado por Harison

1. Tomar 600 μ l de buffer de extracción CTAB 1 + β -mercaptoetanol y 50 mg de tejido del tubo con la muestra y colocar en un mortero.
2. Agregar 50mg de arena de cuarzo ultrapum.
3. Macerar el tejido con un pistilo.
4. Colocar el tejido macerado en un tubo de microcentrífuga.
5. Incubar a 60 °C por 30 min.
6. Añadir igual volumen de Cloroformo/Isoamil Alcohol 24:1
7. Mezclar bien.
8. Centrifugar por 5 min a 12 000 ipm.
9. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga.
10. Añadir buffer de extracción CTAB 2 (1/10 del volumen del sobrenadante).
11. Repetir los pasos 6, 7, 8, 9.
12. Añadir 2/3 del volumen de Isopropanol frío.
13. Centrifugar por 5 min a 12 000 rpm.
14. Descartar el líquido dejando el sedimento de ADN en el tubo de microcentrífuga.
15. Secar al aire el sedimento por 30 min.
16. Resuspender el sedimento en 100 μ l de TE alto en sal.
17. Añadir 2.5 volúmenes de Etanol al 95% frío.
18. Centrifugar por 5 min a 12 000 rpm.
19. Descartar el líquido dejando el sedimento de ADN en el tubo de microcentrífuga.
20. Secar al aire el sedimento.
21. Resuspender el sedimento en 50 μ L de agua bidestilada.
22. Almacenar a -20 °C.

Procedimiento para la extracción de ADN de insectos

1. Colocar 200 μ l de buffer de extracción CTAB 1 en un tubo de microcentrífuga.
2. Añadir un insecto por tubo.
3. Macerar el insecto.
4. Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
5. Añadir 200 μ l de Cloroformo/Alcohol Isoamílico 24:1.
6. Mezclar bien.
7. Centrifugar por 5 min a 12.000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga.
9. Añadir igual volumen de Isopropanol frío.
10. Incubar por 30 min.
11. Centrifugar por 5 min a 12.000 rpm.
12. Descartar el líquido dejando el sedimento de ADN en el tubo de microcentrífuga.
13. Secar al aire el sedimento.
14. Resuspender el sedimento en 50 μ l de agua bidestilada.
15. Almacenar a -20 °C

Anexo 4. PROGRAMAS PARA EL TERMOCICLADOR

Para Imprimidores P1 y P7

Fase del ciclo	Primer ciclo		28 ciclos		Ciclo Final	
	Temp*	Tiempo	Temp	Tiempo	Temp	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	2'	94 °C	1'	94 °C	1'
Ligamiento	54 °C	50"	54 °C	50"	54 °C	50"
Extensión	72 °C	2'	72 °C	2'	72 °C	5'

* Temp = Temperatura

Para Imprimidores LYFI y LYRI

Fase del ciclo	Primer ciclo		38 ciclos		Ciclo Final	
	Temp*	Tiempo	Temp	Tiempo	Temp	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	1' 30"	94 °C	30"	94 °C	30"
Ligamiento	53 °C	50"	53 °C	50"	53 °C	50"
Extensión	72 °C	1' 20"	72 °C	1' 20"	72 °C	8' 40"

* Temp = Temperatura

ANEXO 5. MATERIALES PARA ELECTROFORESIS

Reactivos

- ADN amplificado por PCR
- Agarosa al 0.75 % (ej. 400 ml) con Bromuro de Etidio (10 mg/ml)
 Agarosa 3.0 gr
 Buffer TBE 0.5 X 400 ml
 Bromuro de Etidio (10 mg/ml) 20-25 µl
- Buffer de carga
 0.05% azul de bromofenol
 40% sucrosa
 0.1 M EDTA, pH 8.0
 0.5% sodio lauryl sulfato (SDS)
- Buffer de corrida (TBE) 5X
 Tris-Borato-EDTA (SIGMA T-3913)
 Nota: este buffer se diluye a 0.5X para hacer agarosa al 0.75 % o al porcentaje deseado y para corrida electroforética de los geles
- Marcador de ADN
 SIGMA DNA Ladder, 1kb (Producto No. D0428)

Equipo

- Tanque de electroforesis
- Bandeja
- Peine
- Fuente de poder
- Pipetas de precisión