

Evaluación de la situación actual de las variedades resistentes a la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Atlántida y Colon, Honduras.

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

Presentado por:
Diana Castillo López

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

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

Diana Castillo

Evaluación de la situación actual de las variedades de coco resistentes a la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Atlántida y Colon, Honduras.

Presentado por:

Diana Castillo López

Aprobado:

Maria Mercedes Roca, Ph. D.
Asesor Principal

Agropecuaria

Odilo Duarte, Dr. Sci. Agr., M.B.A
Asesor Secundario

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador de área temática

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador Interino Carrera
Ciencia y Producción

George Pilz, Ph. D
Decano

Keneth L. Hoadley, B.P.A
Director

Zamorano, Honduras

DEDICATORIA

A Dios por ser mi incomparable guía.

A mi familia entera especialmente a mis padres por su apoyo incondicional de toda una vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo y amor brindado estos 4 años.

A mi hermano y hermana por sus sabios consejos y paciencia.

A mi abuela y tíos de lado paterno por su apoyo y atención aunque lejos.

A mi asesora Maria Mercedes Roca por depositar en mi su confianza y amistad.

A Melissa Castillo y al equipo de trabajo que me acompañó durante la realización de la tesis en el laboratorio molecular de fitopatología en Zamorano.

A la Estándar Fruit Company especialmente al Ingeniero Omar Ucles por su apoyo logístico y económico durante la investigación.

A todas las personas que considero y me brindaron su amistad sincera estos 4 años no solo en Zamorano sino en Honduras.

RESUMEN

Castillo, D. Evaluación de la situación actual de las variedades resistentes a la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en Atlántida y Colón, Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 60 p.

El cocotero (*Cocos nucifera*) es una importante fuente diferida de ingresos para las poblaciones marginadas de la costa norte de Honduras y la que mejor caracteriza la belleza escénica de las costas del Caribe hondureño por lo que tiene una gran importancia en la industria turística. El Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) apareció en Honduras en 1995 en la isla de Roatán y hasta la fecha ha causado pérdidas de hasta el 95% de la población de cocos de la variedad Altos del Atlántico en toda la costa norte. Después de la epidemia de ALC el gobierno, ONG's y otras instituciones han realizado proyectos de replantación utilizando tres variedades consideradas tolerantes a la enfermedad: híbridos 'Mapan', 'Enanos Malayos' y 'Altos del Pacífico', sin embargo se han reportado pérdidas importantes de estas variedades en Jamaica, México y la Florida; hasta la fecha no se tenían datos para Honduras. Este estudio tuvo por objeto evaluar el desempeño de los híbridos 'Mapan' y las variedades enanas, replantados en los departamentos de Atlántida y Colón en los últimos años, para determinar si estos constituyen una buena opción para los programas de replantación futuros en Honduras. El ALC está activo en las tres zonas del estudio y la mayor incidencia se reportó en el municipio de Tela y la menor en el de Iriona en las variedades consideradas resistentes. El estudio reportó una mayor replantación de variedades enanas en las comunidades y de híbridos en las plantaciones comerciales. Se observó una alta mortalidad en híbridos y una menor en variedades enanas, siendo estas de Altos del Atlántico 95%, Híbridos 58%, Enanos Malayos amarillos 38%, Enanos Malayos verdes 23% y los Altos del Pacífico no se evaluaron pues eran plantaciones muy jóvenes. Se encontraron focos con alta incidencia de la pudrición de cogollo (*Phytophthora palmivora*) en todas las variedades. Los resultados también sugieren que muchas de las palmas están afectadas por factores abióticos y no solamente por enfermedades. Las variedades enanas e híbridas plantadas son menos robustas agronómicamente que las variedades altas y no representan una buena opción en la replantación con fines turísticos. La replantación actual con 'Altos del Pacífico' (exclusivamente) está demasiado joven para ser evaluada, la homogeneidad genética de una sola variedad representa un peligro fitosanitario. En la actualidad no existe una solución al problema de la muerte de palmas en Honduras y estos resultados confirman la hipótesis de que la resistencia de estas variedades se ha perdido en la última década.

Palabras claves: Enanos Malayos, Fitoplasma, Híbridos Mapan.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras... ..	x
Índice de anexos.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Generalidades del Cocotero.....	4
3.1.1 Taxonomía.....	4
3.1.2 Descripción botánica	4
3.1.3 Importancia del cocotero	4
3.1.4 Usos del Coco.....	5
3.1.5 Copra	5
3.1.6 Cáscara	5
3.1.7 Utensilios y productos artesanales.....	6
3.1.8 Corazón de la palma	6
3.2 Plagas y enfermedades del cocotero.....	7
3.2.1 Escarabajo Buey (Strategus aloeus)	7
3.2.2 Anillo rojo	8
3.2.3 Pudrición del cogollo.....	9
3.2.4 Marchites sorpresiva.....	10
3.3 Amarillamiento Letal del Cocotero.....	11
3.3.1 Agente causal.....	11
3.3.2 Ciclo de Vida.....	12
3.3.3 Síntomas	13
3.4 Dispersión del ALC.....	14
3.5 Variedades resistentes al ALC.....	17
3.5.1 Reportes de muertes en áreas replantadas con variedades resistentes.....	18

3.6 Programas de Replantación	19
3.6.1 Replantación en Zona I (Tela, Atlántida)	20
3.6.2 Replantación en Zona II (La Ceiba, Atlántida)	20
3.6.3 Replantaciones en Zona III (Iriona, Colón).....	21
3.7 Caracterización de las zonas de estudio	21
3.7.1 Zona I, Tela, Atlántida.....	21
3.7.2 Zona II, La Ceiba, Atlántida.....	23
3.7.3 Caracterización de la zona de estudio (III).....	24
3.8 Diagnostico molecular del Amarillamiento Letal del Cocotero ALC.....	25
3.8.1 Extracción de ADN	25
3.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
3.8.3 Nested PCR (nPCR)	26
3.8.4 Electroforesis	27
3.8.5 Geles de Poliacrilamida.....	27
3.8.6 Marcadores moleculares.....	27
3.8.7 Análisis Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP'S).....	28
3.8.8 Enzimas de restricción.....	28
4. MATERIALES Y METODOS	29
4.1 Ubicación.....	29
4.2 Conservación de muestras	30
4.2.1 Entrevista corta con recolectores.....	30
4.2.2 Selección de recolectores	30
4.3 Análisis de muestras	32
5. RESULTADOS Y DISCUSION	34
5.1 Zona I, Tela	34
5.2 Zona II, La Ceiba.....	34
5.3 Zona III, Iriona	35
5.4 Factores bióticos y encontrados.....	36
5.5 Cuadros con resultados representativos de las zonas de muestreo.....	37
5.6 Análisis por PCR directo.....	40
5.7 Resultados Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP'S)	42
5.7.1 GELES RFLP'S.....	43
6. CONCLUSIONES	45
7. RECOMENDACIONES	47
8. BIBLIOGRAFIA	48
9. ANEXOS	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Hospederos reportados de ninfas de <i>Myndus crudus</i>	13
Cuadro 2. Nivel de incidencia del ALC, dispersión actual y potencial en el 2003	16
Cuadro 3. Ventajas y desventajas de las variedades e híbridos.....	18
Cuadro 4. Primers universales y grupos específicos del ALC	26
Cuadro 5. Sitios de reconocimiento y fabricantes de enzimas de restricción utilizadas. ...	28
Cuadro 6. Método para rotular muestras	31
Cuadro 7. Las abreviaturas para los lugares de muestreo	31
Cuadro 8. Incidencia y severidad	31
Cuadro 9. Muestras utilizadas para la digestión con enzimas de restricción	33
Cuadro 10 Mortalidad por ALC en variedades resistentes.....	34
Cuadro 11. Definición de zonas de muestreo	36
Cuadro 12. Factores bióticos observados	36
Cuadro 13. Análisis por PCR directa y Nested PCR zona 1	37
Cuadro 14 Análisis de muestras por PCR directa y Nested PCR en zona 2	38
Cuadro 15. Análisis de muestras por PCR directa y Nested zona 3.....	39
Cuadro 16. Analisis de RFLP'S	34
Cuadro 17 Controles positivos RFLP'S	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Copra de coco	5
Figura 2. Utensilios y productos artesanales elaborados de coco	6
Figura 3. Escarabajo buey (<i>Strategus aloeus</i>) (a) Macho, (b) Hembra, (c) Agujero realizado en la arena para hacer sus nidos y cercano a la planta para tener alimento cerca, (d) Galerías realizadas en la nuez de coco para llegar al meristemo apical.....	8
Figura 4. Síntomas de Anillo Rojo	9
Figura 5. Síntomas de pudrición de cogollo	10
Figura 6. Planta infectada por marchitez sorpresiva	11
Figura 7. Vector del ALC	12
Figura 8. Escala de síntomas ALC.....	14
Figura 9. Distribución ALC en Centro América y el Caribe	15
Figura 10. Mortalidad de híbridos Maypan en Jamaica.....	19
Figura 11. Cabañas construidas de hojas de palma.....	22
Figura 12. Fincas Standard Fruit Company	24
Figura 13. Vista de comunidad garífuna en Colón	25
Figura 14. Zonas muestreadas en el mapa de Honduras.....	29
Figura 15. Propietaria de cocotero híbrido en Irióna	30
Figura 16. Gel de electroforesis con P1P7 en zona I.....	40
Figura 17. Gel de electroforesis con P1P7 en zona II.....	40
Figura 18. Gel de electroforesis con P1P7 en zona III	40
Figura 19. Análisis por PCR y nPCR.....	41
Figura 20. Incidencia de ALC en zonas de muestreo.....	41

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reacciones con enzimas de restricción.....	51
Anexo 2. Protocolo para preparar geles de poliacrilamida	51
Anexo 3. Preparación de reactivos.....	52
Anexo 4. Protocolo para extracción de ADN	53

1. INTRODUCCION

Desde un punto de vista económico el cocotero y la pérdida de este es muy significativa pues constituye un recurso de acceso equitativo, contribuye a mantener y elevar el valor de los predios como patrimonio también representa un excelente atractivo.

Además es un producto que posee flexibilidad en su manejo sus cualidades biofísicas, permiten su articulación coherente y complementaria con otros rubros productivos.

El coco representa una fuente diferida de ingresos para los diferentes estratos socioeconómicos de pobladores de la costa norte de Honduras que se benefician de las mismas oportunidades de comercialización local, nacional y de exportación.

La producción, consumo, procesamiento doméstico, comercialización de coco ha constituido actividades de importancia para la costa de Honduras. La relevancia del coco dentro de la vida cotidiana de los habitantes del Caribe, se refleja en las opiniones del cronista Joseph Acosta en 1950 (Ardón *et. al.* 2001).

Datos desde 1828 por Haetfkens un explorador holandés, Ramón Rosa , hacen referencia a la profusión de plantas de cocotero y resaltan el uso potencial como palmito y su importancia en la costa norte e incluye al coco como uno de los productos importantes, cuya producción y comercio incentiva el gobierno, facilitando su comercialización (Ardón *et. al.* 2001).

Para 1949-1950 la superficie plantada de cocos, se calculo aproximadamente en unas 5400 hectáreas. La producción de cocos se vendía en su mayoría a los Estados Unidos y solo una parte se transformaba en copra (Ardón *et. al.* 2001).

En promedio en los registros, se exportaban anualmente unos 10, 250,000 cocos. Estas cifras resaltan la importancia del coco como producto de exportación en Honduras (Ardón *et. al.* 2001).

El Amarillamiento Letal es una devastadora enfermedad que afecta más de 30 especies de palma incluyendo coco. El ALC ha sido reportado en la región Caribe; donde sus efectos han sido más fuertes en plantas de coco comparado a otras especies por su abundancia en la región.

El primer reporte fue originado en islas Caimán en 1834 (Maramorosh 1964).

De 1972 a 1977 en Jamaica se aproxima un 70% de muertes en plantaciones del país, mientras en Florida de 1971-1974 un 50%.

Durante el siglo 20, se ha reportado daño por ALC en Cuba en 1940, también fue reportado en Republica Dominicana, México, Haití y Bahamas (Ardón *et. al.* 2001).

La Standard Fruit Co. estaba exportando 1, 900,000 cocos seleccionados a inicios de los 90, para el mercado de los Estados Unidos antes de la llegada del Amarillamiento Letal (Ardón *et. al.* 2001).

En 1993 la Standard Fruit Co. previendo la llegada de la enfermedad, realizó una importación de híbridos Mapan desde Costa Rica, que fueron plantados en las fincas de Salado Lis lis, Balfate y Cuero Salado fincas ubicadas en Atlántida, Honduras. Posterior al Mitch en 1998 los híbridos presentaron un alto porcentaje de mortalidad, mostrando síntomas similares a los del amarillamiento letal, razón por la que han sido objeto de investigaciones por parte de Zamorano (Honduras) (García 2002).

Los programas de replantación realizados hasta el 2001 fueron de 64,246 plantas en las zonas afectadas de los municipios de Cortes, Islas de la Bahía, comunidades Garifunas del municipio Esparta y varias comunidades del municipio Colon.

En el año 2000 se vendieron 42000 plantas de Enanos Malayos e híbridos Maypan de Jamaica; se obtuvo un 45% de germinación de nueces, pero gracias a la asesoría brindada por Jamaica en el 2001 se incremento la germinación a un 70%.

En respuesta a este llamado, Zamorano inició un proyecto de investigación, dentro de cuyos objetivos se encuentra el estudio de la variabilidad genética del fitoplasma causante del amarillamiento letal en Honduras, a través de la técnica de RFLP's. La información debe contribuir a entender los factores que pueden influenciar la epidemiología de la enfermedad, a mediano o largo plazo, en la población de cocoteros en Honduras (Castillo 1999).

JUSTIFICACION

Después de la destrucción de más del 95% de las palmas Altas del Atlántico ubicadas en la costa norte de Honduras los programas de replantación se consideraron una buena opción.

Pero estas variedades consideradas resistentes actualmente se ha registrado una alta mortalidad de estos híbridos en otros países como Jamaica y México.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el desempeño de los híbridos Mapan y enanos Malayos replantados en Atlántida, Colón y zonas aledañas en los últimos años para determinar si estos constituyen una buena opción para los programas de replantación futuros para Honduras.

2.2 Objetivos Específicos

Establecer la causa de la muerte de híbridos y otras variedades por factores bióticos o abióticos, con énfasis en Amarillamiento Letal del Cocotero en las plantaciones de la Standard fruti Company, Atlántida.

Elaborar un documento que sirva de información base para los futuros programas de replantación.

Continuar con el estudio de variabilidad genética del patógeno por medio de RFLP'S

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades del Cocotero

3.1.1 Taxonomía

Reino: Vegetal

Clase: Angiospermae

Sub-clase: Monocotileoneae

Familia: Arecaceae (Palmae)

Genero: Cocos

Especie: *Cocos nucifera* L.

3.1.2 Descripción botánica

El cocotero es una planta esbelta que puede alcanzar más de 30 metros de altura. Posee un tallo de color gris claro marcado por cicatrices en forma de anillo debido a las hojas caídas que arranca de una base hinchada y termina en una copa verde de largas hojas pinnadas con copiosos racimos de nueces que salen de las axilas de las hojas.

En términos botánicos rigurosos, el cocotero no es un árbol. Su tronco se denomina tallo, no tiene una auténtica corteza, ni ramas, ni tejido vascular o desarrollo secundario, rasgos característicos de los árboles de las gimnospermas y dicotiledóneas.

La hoja, o “palma” comprende un fuerte pecíolo, que se continúa por el raquis, y numerosos folíolos insertos sobre este último. El número de hojas desplegadas varía entre 30 -40 según la variedad del cocotero y las condiciones donde crece, y cada una de estas hojas mide entre 5 y 6 m de largo.

Es una planta monoica, es decir con los órganos sexuales en flores distintas pero sobre el mismo individuo. Cada hoja en su axila tiene un esbozo floral que se convertirá o no en inflorescencia fructífera según las condiciones de nutrición y de clima.

3.1.3 Importancia del cocotero

El cocotero representa, el alimento y la base de subsistencia de múltiples familias de diferentes estratos socioeconómicos, residentes en el litoral, islas y cayos de la Costa Caribe de Honduras. Es una parte importante de la dieta alimentaria y diversidad culinaria entre los diferentes grupos humanos que habitan la región

El conocimiento y manejo del cocotero y de los múltiples productos y subproductos, van desde la comprobada diversidad de platillos que se pueden elaborar, tomando el coco como fundamental, hasta las diferentes utilidades dentro de la medicina tradicional y sus aplicaciones para la búsqueda de la diversidad del ingreso de los pobladores. También los solares cultivados con cocoteros tienen un gran potencial como áreas de recreación y descanso para pobladores del lugar así como para turistas. Hacia el futuro la carencia del coco puede representar, serios impactos negativos a nivel nutricional para las actuales y futuras generaciones (Ardón *et. al.* 2001).

3.1.4 Usos del Coco

Son pocas las partes del cocotero que no se aprovechan. La palmera produce alimentos y bebida para la gente, materiales de construcción como madera para sus casas y mobiliario, fibras para sogas, esteras, cepillos, escobas y rellenos, cascos para la fabricación de utensilios y ornamentos, y combustible que se obtiene de su aceite y cáscaras.

3.1.5 Copra

El endospermo del cocotero desecado se denomina copra. La copra y el aceite que contiene constituyen los productos principales del cultivo. La copra ha sido la fuente principal de aceite de cocinar en muchos lugares y fue una de las primeras materias oleaginosas tropicales que se llevaron a Europa. Para preparar la copra se deben abrir las nueces, lo que puede hacerse en el campo o en el lugar donde vaya a secarse la copra. El primer sistema ahorra el transporte del agua y la cáscara y lo suelen practicar los pequeños agricultores. El segundo sistema lo adoptan mayormente las grandes explotaciones y haciendas, donde también aprovechan las cáscaras como combustible.



Figura 1. Copra de coco

3.1.6 Cáscara

Otro uso que se le puede dar al coco es como combustible a través de su cáscara. La cáscara también, debido a su elevado contenido de Ca y de K al quemarse produce una

ceniza que puede ser utilizada como fertilizante. Puede contener hasta un 20 a 30 por ciento de potasa y un dos por ciento de ácido fosfórico. Hay que proteger bien la ceniza contra la lluvia y contra un rocío intenso debido a la solubilidad de las sales minerales que contiene. Un ligero aguacero puede casi anular su valor como fertilizante lo que quiere decir que no es muy recomendado para este fin.

En las comunidades garífunas, la cáscara también es utilizada para ahuyentar los mosquitos durante la noche a través del humo que emana cuando es quemada. Es un repelente natural que puede durar varias horas.

3.1.7 Utensilios y productos artesanales

Los cascos de coco pueden utilizarse como utensilios caseros, por ejemplo cucharas y cucharones, ceniceros y lámparas, collares, aretes, botones, etc. Con mucha frecuencia, los objetos hechos con los cascos son utilizados en artesanías y pueden ser obras de arte finas. El casco es duro y puede pulimentarse. Pueden tallarse, barnizarse y también pueden incrustarse metales.



Figura 2. Utensilios y productos artesanales elaborados de coco
Hojas

En regiones productoras de cocoteros, las hojas se emplean generalmente para fines caseros. Los folíolos pueden servir para trenzar cestas, sacos y sombreros. En los trópicos se utilizan mucho las escobas hechas de los nervios mediales de los folíolos. Se emplean como material de techado las tiras de los nervios mediales con los folíolos anexos. La mayoría de las casas en las zonas rurales donde se cultiva el cocotero cubren sus techos con hojas de palma (Ohler 1986).

3.1.8 Corazón de la palma

Es considerado un plato exquisito en las regiones cocoteras. Se parece mucho al “palmito”, que es el corazón de una palma silvestre brasileña, que es un producto con un alto valor agregado en su lugar de origen y que también se exporta. Sin embargo, para cada corazón de palmera, hay que cortar una palma y por esto a este producto se le ha llamado “la ensalada de millonario”. Normalmente solo llega a disponerse del corazón de un cocotero cuando ha de talarse por alguna razón o cuando un vendaval ha arrancado una palma. El corazón comestible de una palma puede llegar a pesar 4 Kg. Puede consumirse

crudo o también cocinarse. El corazón fresco se estropea rápidamente por la oxidación del tejido (Ohler 1986).

3.2 Plagas y enfermedades del cocotero

Para que una enfermedad se desarrolle, se necesitan tres factores: Patógeno virulento, ambiente favorable al patógeno y un hospedero susceptible. Estos componen el llamado triángulo de la enfermedad y son dependientes uno del otro. Si se requiere su diagnóstico, es necesario primero determinar si la enfermedad es causada por un agente de origen biótico o abiótico. Los agentes infecciosos generalmente producen síntomas característicos sobre algunas partes de las plantas que revelan la presencia y algunas veces la clase de agente causal. Sin embargo algunos organismos infecciosos pueden producir síntomas sistémicos muy similares a los causados por algunos factores ambientales (Castaño-Zapata 1994).

Para la identificación correcta de patógenos en plantas enfermas se debe seguir los postulados de Koch demostrando así un agente etiológico. Sin embargo puede prescindirse de estos si se dispone de un método probado para la identificación de un patógeno específico. Los métodos comunes de diagnóstico de enfermedades incluyen sintomatología, microscopia, técnicas microbiológicas, pruebas inmunológicas y técnicas de bioensayo. Síntomas y signos naturales e inducidos, como microscópicos también sirven como herramientas básicas para diagnosticar e identificar patógenos (Castaño-Zapata 1994). A continuación se listan las enfermedades del cocotero más importantes en Honduras:

3.2.1 Escarabajo Buey (*Strategus aloeus*)

Es una de las plagas más importantes que ataca palmeras jóvenes. Este insecto pertenece al orden Coleóptera, familia Scarabidae y se le conoce con diferentes nombres: congorocho, escarabajo, coco rinoceronte o escarabajo buey. Cuando adulto este insecto tiene un gran tamaño (5,0-6,5 cm.), es de color negro o marrón oscuro, el macho se puede reconocer por presentar tres protuberancias en forma de cuernos (Quijada et. al. 1991). Las hembras solo tienen tres puntos ligeramente abultados en lugar de cuernos (Figueroa y Ruiz 2002).

En su estado inmaduro o de larva, vive en raíces de árboles muertos o en lugares donde hay bastante materia orgánica. Los adultos pueden alimentarse de desechos orgánicos de origen vegetal pero también pueden comer hojas o tejidos vegetales tiernos (Figueroa y Ruiz 2002). Este insecto perfora cerca de la base de la planta y construye galerías de 50 centímetros o más y penetra al plato radical, comiéndose los tejidos internos de la palma. Muy a menudo destruye el meristemo apical y la planta muere posteriormente (Quijada et al 1991).

En Honduras se reportó como plaga en el año 2001 ocasionando la muerte a plantaciones jóvenes de 1 a 2 años y ocasionalmente en viveros en los departamentos de Colon y Gracias a Dios (Figueroa y Ruiz 2002).



Figura 3. Escarabajo buey (*Strategus aloeus*) (a) Macho, (b) Hembra, (c) Agujero realizado en la arena para hacer sus nidos y cercano a la planta para tener alimento cerca, (d) Galerías realizadas en la nuez de coco para llegar al meristemo apical

3.2.2 Anillo rojo

Causada por el nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, fue descrita por primera vez en palmas de coco de Trinidad en 1905 (Elliot *et. al.* 2004). Está distribuida desde México hasta el Estado de Bahía, Brasil. También afecta la palma de aceite y otras especies de palma. La palma de coco es mas susceptible al Anillo Rojo en las edades entre tres y diez años, pero las palmas mas viejas también pueden verse afectadas (Ohler 1986).

Los síntomas varían dependiendo de la especie, edad, cultivar y condiciones ambientales. Externamente los síntomas clásicos incluye: perdida prematura de nueces, marchitamiento de la inflorescencia y amarillamiento, bronceado y muerte progresiva de las hojas jóvenes. El amarillamiento comienza en los extremos de los foliolos moviéndose hacia adentro a la zona del raquis y luego a la base del peciolo (Elliot *et. al.* 2004). Los síntomas internos son muy característicos: cuando las hojas están rotas en la línea media, se revela una mancha roja o una decoloración roja y amarilla. Esta se extiende de 15^a 75 cm desde a base. Un corte del tallo muestra un anillo rojo de dos a cuatro centímetros y cerca de 3-5 cm. de la periferia (Ohler 1986).

Los nematodos son transportados por un escarabajo, el Picudo Negro del Coco (*Rhynchophorus palmarum*) y son introducidos en la planta principalmente cuando la hembra perfora el tallo para depositar sus huevos (Figueroa y Ruiz 2002). No todos los picudos *R. palmarum* son potenciales vectores del nematodo pues se encontró recesividad genética para la habilidad de portar el nematodo (Ohler 1986). Los nematodos invaden el tallo, hojas y raíces de las plantas bloqueando el paso del agua, reduciendo así la capacidad de absorción (Figueroa y Ruiz 2002).

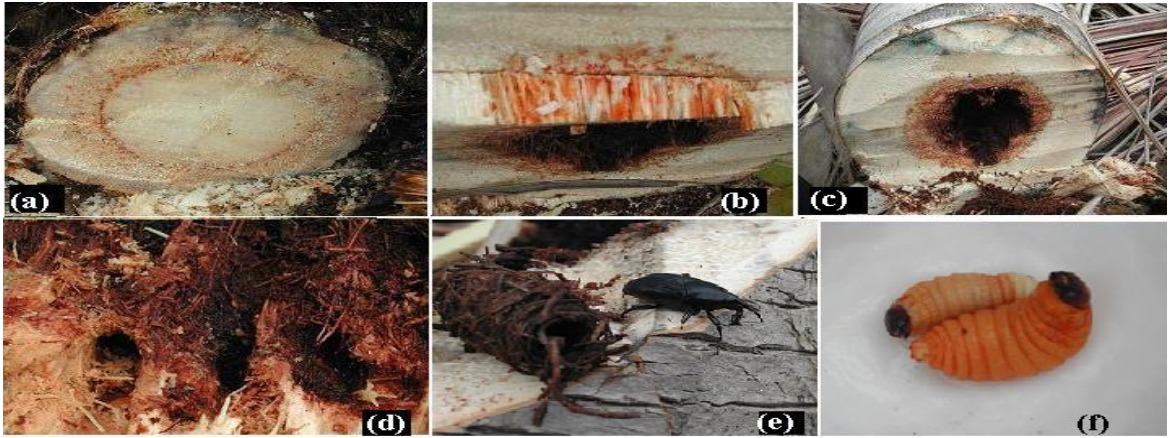


Figura 4. Síntomas de Anillo Rojo (a y b) Mancha roja en forma de anillo causada por la presencia del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* en el floema, (b) pudrición del tallo debido a las perforaciones de *Rhynchophorus palmarum* vector del nematodo, (d) Galerías formadas por *R. palmarum* en el tallo de cocoteros, (e) Nido y adulto y (f) larvas de *R. palmarum*. Fuente: Roca, 2005.

3.2.3 Pudrición del cogollo

Causada por hongos del genero *Phytophthora*. Probablemente el que comúnmente causa enfermedades en las palmas es *P. palmivora*, que incluye a *P. faberi* y *P. theobromae* como sinónimas. Este hongo pertenece al grupo de los hongos que habitan el suelo. El hongo entra a la palma a través de heridas y causa la desintegración de la yema apical.

Un síntoma inicial consiste en la decoloración de la hoja bandera (hoja más joven sin expandirse). Cuando esta se extiende es notable un color oscuro en las frondas. La base de la hoja bandera se pudre y es fácil de remover, además, el tejido tiene un olor característico (Elliot *et.al.* 2004). La hoja bandera cae y cuelga entre las hojas mas viejas las cuales mantienen su color verde y su posición original por varios meses, lo que es muy característico de la enfermedad. Las hojas se caen una por una comenzando por las jóvenes, extendiéndose este periodo de 8-12 meses hasta que queda el tronco sin hojas (Ohler 1986).

Para el diagnóstico puede utilizarse tejido enfermo para observar micelios de *Phytophthora* que tienen pocas paredes cruzadas y un crecimiento irregular. Los esporangios pueden aparecer en la superficie externa de las plantas enfermas mientras que las clamidiosporas y oosporas se forman internamente. El aislamiento de este hongo es más difícil que el de otros del reino (Elliot *et.al.* 2004).

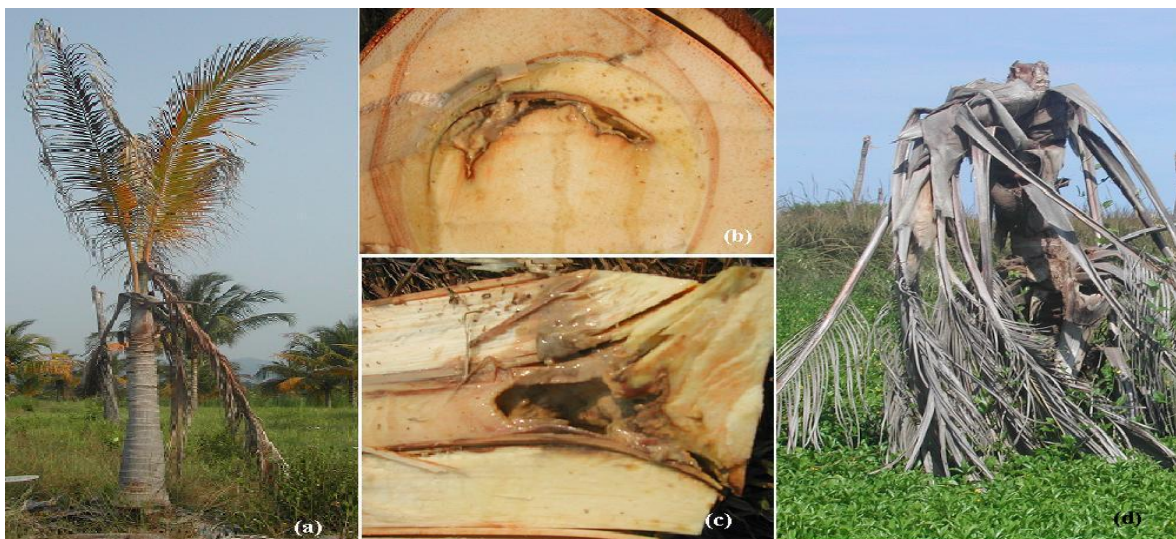


Figura 5. Síntomas de pudrición de cogollo (a) caída de la hoja bandera en palma con síntomas de pudrición y ALC, (b) Pudrición del tallo al seccionar el tronco transversalmente, (c) pudrición de la yema apical, (d) palma muerta por pudrición del cogollo (*Phytophthora palmivora*)

3.2.4 Marchites sorpresiva

El amarillamiento progresivo de las hojas más viejas es parecido a la del anillo rojo y se presenta del ápice hacia la base, para finalmente tornarse de color marrón oscuro. Simultáneamente, se produce la caída de frutos de cualquier tamaño. Los más pequeños se desprenden, dejando las brácteas pegadas a la inflorescencia, las cuales presentan necrosis. Las espadas cerradas se tornan quemadas en las puntas, al igual que ocurre un ennegrecimiento de las flores pequeñas y pudrición de frutos (Soto *et. al.* 2003).

En la planta se han aislado pequeños microorganismos llamados tripanosomas (*Phytomonas* sp.), del tipo de las fitomonas o flagelados, debido a la forma que ellos presentan. También están involucrados insectos del grupo de los chinches (Hemíptera del género *Lincus*, y otros del género *Oncopeltus* spp.) como transmisores del flagelado (Soto *et. al.* 2003)

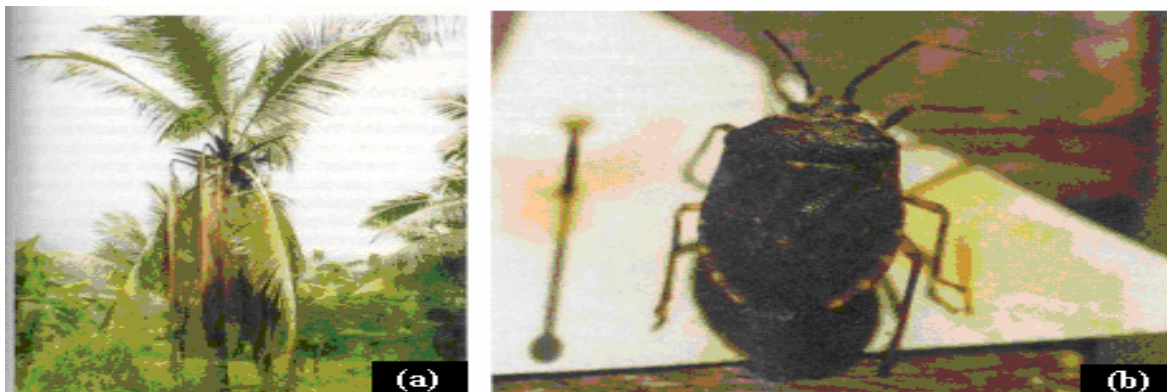


Figura 6. Planta infectada por marchitez sorpresiva, (b) Chinche de la especie *Lincus sp.* vector del parasito flagelado *Phytomonas sp.* causante de la marchitez sorpresiva

3.3 Amarillamiento Letal del Cocotero

Esta devastadora enfermedad está presente en varios países del Caribe, entre ellos: Jamaica, México, Belice, Guatemala, República Dominicana, Haití, Cuba y Estados Unidos; en Honduras apareció en 1995 en la isla de Roatán, en 1996 se detectó por primera vez en Santa Fe, Colón y en la actualidad se ha dispersado a lo largo de toda la Costa Norte del país.

El Amarillamiento Letal afecta a más de 30 especies de palma incluyendo el cocotero. Es causada por un fitoplasma presente en el floema de plantas enfermas y es transmitido por un insecto del orden Homóptera conocido comúnmente como salta hojas o *Myndus crudus*, que se alimenta de la savia de las plantas.

3.3.1 Agente causal

El agente causal de del Amarillamiento Letal del Cocotero es un microorganismo similar a los micoplasmas pero sin pared celular llamado fitoplasma. Se conoce que los fitoplasmas están asociados a enfermedades en más de 300 especies de plantas. Estos microorganismos han sido encontrados en los tubos cribosos del floema de las plantas infectadas con enfermedades del tipo “amarillamiento”. Son transmitidos por insectos vectores del género homóptera.

Las células de los fitoplasmas carecen de pared celular, están rodeadas por membrana “unitaria” compuesta de tres capas y poseen citoplasma, ribosomas y filamentos de material nuclear. Su forma va de esferoideal a ovoide o de irregularmente tubular a filamentosa. (Agrios 1995)



Figura 7. Vector del ALC

Clase: Insecta

Orden: Homóptera

Suborden: Auchenorrhyncha

Familia: Cicadellidae

Género: *Myndus*

Especie: *crudus* Van Duzee

Estudios realizados por Howard en 1977 en la Florida con Homópteros asociados a diferentes especies de palmeras implicaron casi con seguridad a este saltahoja como el vector de la enfermedad del Amarillamiento Letal. En un ambiente controlado dentro de enormes jaulas con mallas, palmas de cocotero susceptibles fueron expuestas a saltahoja colectados en áreas afectadas por la enfermedad en el Sur de Florida. Al cabo de 36 meses, la enfermedad se desarrolló en la mayoría de las palmas expuestas, así como plantas que fueron protegidas de este insecto permanecieron totalmente sanas (Ohler 1986).

La chicharrita o saltahoja se encuentra en casi todos los países de América, se reproduce y pasa gran parte de su vida en los pastos o zacate.

Como adulto se alimenta chupando la savia de algunas plantas, entre ellas la palma del cocotero, la palma real y otro tipo de palmeras. La chicharrita no causa daños directos al cocotero, pero transporta en su saliva al fitoplasma que causa la mortal enfermedad del Amarillamiento Letal, el cual introduce en una palma sana mientras se alimenta de ella en la parte de atrás de las hojas.

Aún no se ha encontrado un método de control efectivo y económico, si embargo se puede reducir la población de saltahoja sustituyendo el pasto o zacate de los cocales por frijol de abono u otras leguminosas.

3.3.2 Ciclo de Vida

El *Myndus crudus* tiene un ciclo de vida paurometábolo, 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 los pastos dificultando su detección, reconocimiento y control

Cuadro 1. 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	Cyperácea
<i>Stenotaphrum secundatum</i> (Walt) O. Kuntze	Pasto San Agustín	Gramínea
<i>Cynodon plectostachyus</i> Pilger	Pasto Estrella de Africa	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	Gramínea
<i>Paspalum notatum</i> Flugge	Pasto Bahía	Gramínea
<i>Cenchrus</i> sp		

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

Durante la etapa de adulto, como es característica de los cíxidos, el *M. crudus* permanece en el envés de las hojas de monocotiledóneas.

Los fitoplasmas se desarrollan en tracto digestivo, la hemolinfa, glándulas salivares e intercelularmente en varios de los órganos corporales de los insectos vectores (Agrios 1995).

3.3.3 Síntomas

Descripción de la escala de Síntomas ilustrados en la figura 6:

(a) Estadio 1: Planta sana.

(b) Estadio 2: Aparición del síntoma inicial relacionado con la caída prematura de los cocos, la cual puede ser parcial o total.

(c, d) Estadio 3: Amarillamiento de las hojas bajas de la planta. Comienza la necrosis de las inflorescencias nuevas. Las primeras inflorescencias muestran necrosis parcial pero a medida que la enfermedad avanza la necrosis abarca mayor área de la inflorescencia.

(e) Estadio 4: Las hojas bajas alcanzan una coloración marrón y pueden permanecer pegadas al tronco de la planta o caer. Las hojas del medio presentan una coloración amarilla y las espatas se encuentran totalmente ennegrecidas.

(f) Estadio 5: La mayoría de las hojas secas y fracturadas caen y la planta se asemeja a un poste telefónico.

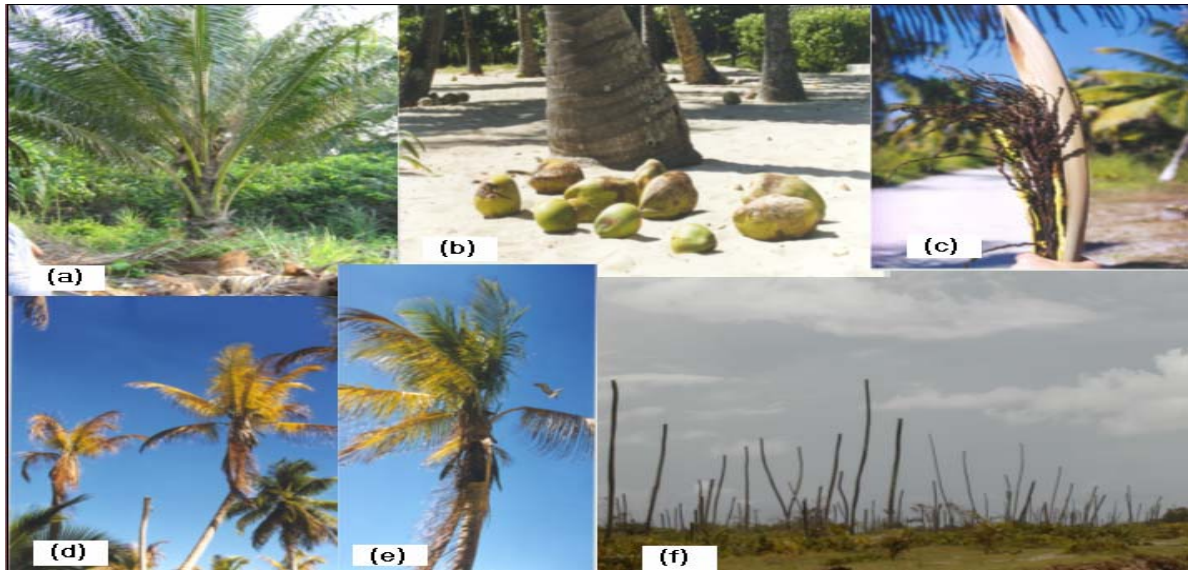


Figura 8. Escala de síntomas ALC

a) Planta sana b) Caída prematura de cocos, estadio 2. c y d) Necrosis de la inflorescencia y hojas amarillas, estadio 3. e) hojas se tornan amarillas y marrón, estadio 4. f) palma se asemeja a un poste telefonico, estadio 5.

Fuente: M. M Roca, 1998

3.4 Dispersión del ALC

En el Caribe, una enfermedad con la sintomatología del ALC en América fue por primera vez descrita en las Islas del 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 (Maramosh 1964)

La distribución del ALC es un claro ejemplo de la distribución por salto que se considera típica de la dispersión por viento.

En Honduras, la expansión del Amarillamiento Letal del Cocotero, por todo el litoral Caribe es islas de Honduras, constituye un grave problema de múltiples dimensiones.

Según una entrevista realizada a funcionarios del Programa Nacional del Coco (PNC) en La Ceiba, Honduras fue posible lograr una caracterización de las diferentes comunidades e incidencia del problema. Ver cuadro 2 y figura 8.

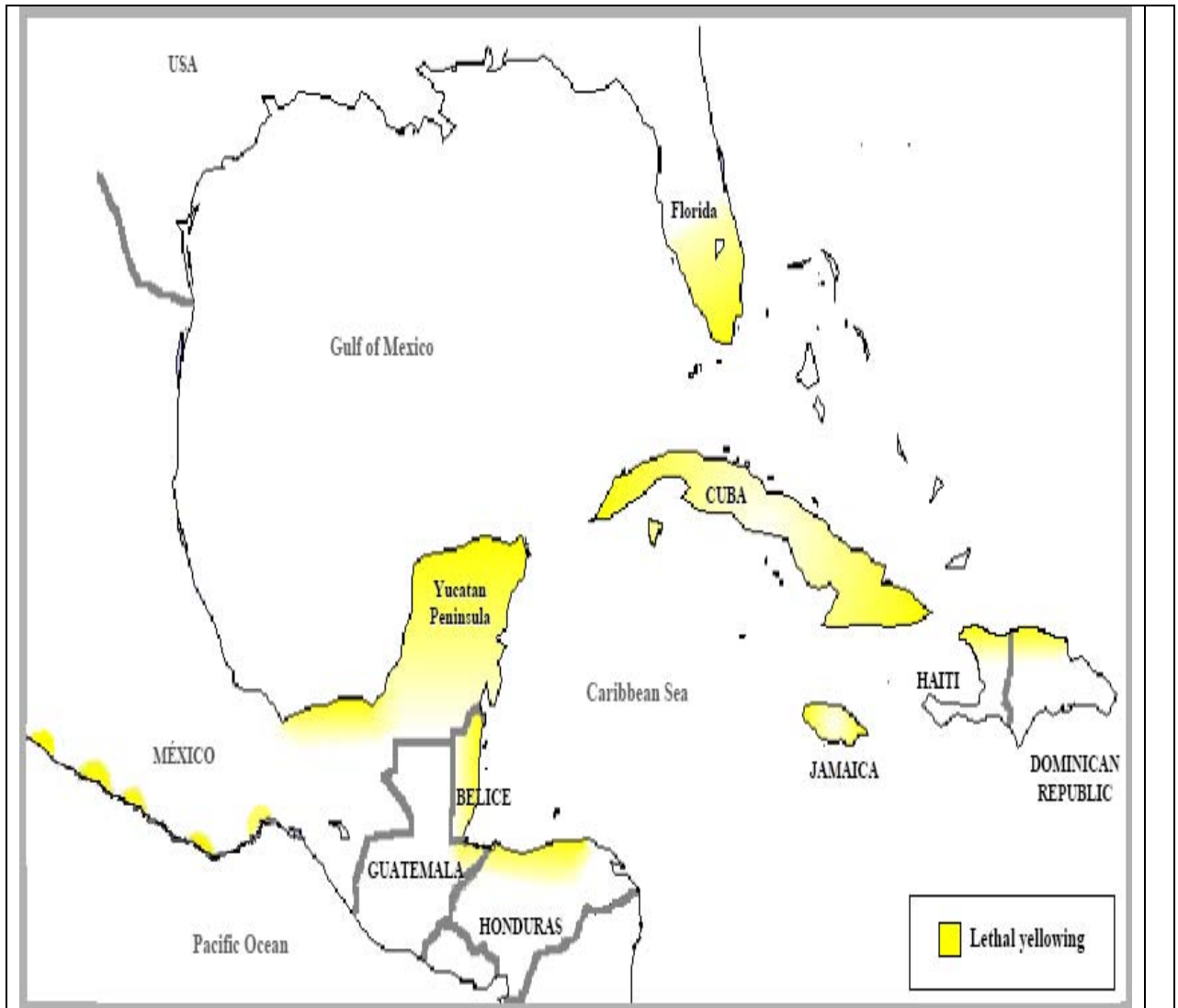


Figura 9. Distribución ALC en Centro América y el Caribe

Fuente: Memoria Redbio 2004 (www.redbio.org)

Cuadro 2. Nivel de incidencia del ALC, dispersión actual y potencial en el 2003

I. (20 comunidades)	II. (9 comunidades)	III. (4 comunidades)	IV. (54 comunidades)
No hay presencia de ALC.	Amenazadas y próximas a ser afectadas por ALC.	Moderadamente afectadas. Presencia de ALC ha perdido un 10% de cocoteros.	Fuertemente afectadas. El ALC acabó con toda la población de cocoteros o esta muy activa.
Gracias a Dios: Brus Laguna, Uhsibila, Pramnitara, Kocotingni, Kruta, Barra Uhi, Ibantiwan, Tusidaksa, Puerto Lempira, Tusicocal, Ratlaya, Krata, Raya.	Gracias a Dios: Ibens, Jerusalén, Belén, Batalla, Kuri, Buena Vista, Pueblo Nuevo, Plaplaya, Cocobila.	Colón: San Isidro de Tocamacho, San Pedro de Tocamacho, Punta Piedra, Cabo Camarón.	Atlántida: Tornabé, La Ensenada, Barranco Blando, Tulián, San Juan, Miami, Rosita Corozal, Sambo Creek, Nueva Armenia, San Antonio, Perú, El Porvenir, Nueva Go, Cayo Venado. Islas de la Bahía: Guanaja, Roatán, Utila. Colón: Ciriboya, Piedra Pintada, Cocalito, Sangrelaya, Iriona Puerto, San Jose de la Punta, Iriona Viejo, Falla, Limón, Santa Rosa de Aguán, Cayos Cochinos. Balfate, Punta Piedra, Río Esteban, Saraguayna, Río Tinto, Cortés: Masca, Pueblo Nuevo, Cortés, Travesía, Omoa, Brisas de Chamelecón, Barra de Chamelecón, Bajamar, Puerto Cortés, Cieneguita, Cuyamel, Tegucigalpita,

Batalla, Cocobila y Plaplaya) se encontró presencia de ALC y en aquellas comunidades donde el daño era moderado con un 10% de mortalidad (San Isidro de Tocamacho, San Pedro de Tocamacho, Punta Piedra y Cabo Camarón) son fuertemente afectadas y el ALC ha acabado casi con el 100% de la población de cocoteros a excepción de algunos híbridos y variedades resistentes presentes en la zona como se ilustra en la figura 12.

Fuente: www.ingohn.com

3.5 Variedades resistentes al ALC

En los años setenta se identificaron en Jamaica variedades tolerantes a la enfermedad como el Enano Malayo Amarillo (EMA, altamente tolerante) y el Alto del Panamá (AP, medianamente tolerante), y se desarrollaron híbridos entre estos dos (EMA x AP) combinando sus cualidades (Been,1995). Estas variedades ampliamente usadas en todo el continente americano para el manejo y prevención del ALC, provienen de este proyecto de investigación de más de 20 años de duración y de los ensayos de resistencia que continúan siendo evaluados 30 años después. (Roca, 2005)

A fines de los años ochenta, en respuesta a la epidemia de ALC en la península de Yucatán, se inició un estudio para evaluar el germoplasma presente en México. Se recolectaron 15 poblaciones en las costas del Pacífico y dos en el Golfo de México. El análisis de estas poblaciones mostró la existencia de tres ecotipos diferentes en el Pacífico, y los correspondientes al Alto del Atlántico (AA) y al EMA. En 1991, también en México, se establecieron ensayos de resistencia en un área afectada por el ALC para evaluar la tolerancia de las variedades a utilizar en los programas de replantación. En 1999 los resultados mostraron al EMA con el nivel más alto de sobrevivencia (94%) y ala AA con el más bajo (21%), y se encontraron niveles de sobrevivencia de hasta 77% en poblaciones de AP. (Been 1995).

A raíz de la presencia del Amarillamiento Letal de Cocotero (ALC), en Honduras, se han hecho grandes importaciones de semillas de variedades tolerantes a la enfermedad como ser:

- Altos del Pacífico de Costa Rica, México y El Salvador.
- Enano Malasino Rojo, Enano Malasino Amarillo e Híbridos MAPAN y MAYPAN de Costa Rica y Jamaica.

En el caso de los Híbridos MAPAN de Costa Rica y MAYPAN de Jamaica, estos resultaron del cruce del Enano Malasino Amarillo utilizado como madre y el Alto del Pacífico como padre como se describe en el cuadro 3 (Figueroa y Ruíz J 2002)

Cuadro 3. Ventajas y desventajas de las variedades e híbridos

Variedades	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Altas del Atlántico 	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco fuerte/más a huracanes. • 60-80 años de vida • Menos fruto por cantidad de aceite • Tolerantes a sequías y baja fertilidad del suelo. • Estéticamente más apreciado por las comunidades y por el turismo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente susceptibles al Amarillamiento Letal • 6-8 años para producir • 15-20 años para alcanzar máxima producción • Pocos frutos por palma por año • Dificultad de cosecha por la altura • Menos palmas por manzana.
<ul style="list-style-type: none"> • Enanas 	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente tolerantes • Amarillamiento Letal • 3-4 años para producir • 5-6 años para alcanzar producción • Más fruto por palma por año • Facilidad de cosecha • Agua más dulce • Más palmas por manzana 	<ul style="list-style-type: none"> • al Tronco delgado y débil/ menos tolerantes a huracanes • Vida productiva bastante corta (20-30 años) • Más frutos por cantidad de aceite • Susceptibles a sequías y fuertes vientos • No se puede asociar con otros cultivos porque producen mucha sombra

Fuente: Figueroa A. y Ruíz J. (2002)

3.5.1 Reportes de muertes en áreas replantadas con variedades resistentes

Durante la epidemia de ALC en la Florida, también se establecieron ensayos similares en Fort Lauderdale Research and Education Centre en 1981. En una reciente evaluación realizada 19 años después del establecimiento del ensayo, se reportaron pérdidas del 70% en EM y 83% de los Híbridos MAPAN (Harrison *et al.*, 1998). Recientemente, también se ha reportado un nuevo brote de ALC en Palm Beach y otras áreas de la Florida, donde se realizó una replantación masiva en la década de los ochenta con variedades resistentes al ALC, después de una severa epidemia (Roca 2005)

Los resultados en la Florida, coinciden con alarmantes reportes de altas pérdidas en Enanos Malayos e híbridos MAYPAN en Jamaica en los últimos 6 años . En México, las variedades de híbridos también han sucumbido al ALC (Oropeza, 2005; comunicación personal). Hasta la fecha no se conoce ninguna resistencia genética o tipo de control para el nuevo brote de la enfermedad. En Honduras, también se han registrado pérdidas de variedades resistentes (Doyle, 2001). Estas pérdidas están siendo evaluadas actualmente en este estudio.

Las altas pérdidas en Jamaica, la Florida, México y Honduras de variedades consideradas como resistentes al ALC como el híbrido MAYPAN y el Enano Malayo, presentan importantes retos para el programa de replantación del cocotero en Honduras.



Figura 10. Mortalidad de híbridos Maypan en Jamaica Fuente > M. Roca, 2005

3.6 Programas de Replantación

El Gobierno de Honduras ante la crítica situación planteada y considerando que el cocotero es la fuente de alimento, techo y combustible para importantes sectores poblacionales de la Región Norte del País, que proporciona ingreso económico en más de 1,300 explotaciones en aproximadamente 16,000 TM de nueces y es fuente de divisas tanto por derivados de productos y subproductos, crea un programa de replantación de zonas afectadas. A través del Decreto 1281-96 se crea el Programa Nacional del Coco, conformado por una junta directiva presidida por el Secretario de Recursos Naturales (hoy Agricultura y Ganadería- SAG) e integrada por un representante de la Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA), del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (SENASA), de la Secretaría del Medio Ambiente (hoy Recursos Naturales y Ambiente- SERNA), la Dirección General del Turismo; la Asociación de Municipios de Honduras (AMHON) y la Administración Forestal del Estado (AFE-COHDEFOR). Ese mismo año (Diciembre 1996) con apoyo de OIRSA/PARSA, se importaron desde Costa Rica, 4,500 palmas del híbrido MAPAN, con el propósito de replantarlos en Roatán, Islas de la Bahía y Santa Fe, Colón (Chirinos, borrador propuesta FAO, 2003; sin publicar).

3.6.1 Replantación en Zona I (Tela, Atlántida)

Con el propósito de mitigar el daño causado a los cocoteros en las playas de las comunidades Garífunas de la Bahía de Tela después del ALC, La Fundación para la Protección de Lancetilla, Punta Sal y Texiguat (PROLANSATE) realizó dos proyectos de reforestación de cocoteros en 1999. Uno se realizó en las comunidades de La Ensenada, Triunfo de la Cruz y Colorado Barra pertenecientes al Parque Nacional Punta Izopo y el siguiente se llevo a cabo en Miami, Tornabé, San Juan y Río Tinto en el Parque Nacional Jeannette Kawas.

La metodología consistió en realizar visitas de motivación a las poblaciones para despertar interés y ánimo por el proyecto. Se formaron equipos de trabajo, estableciéndose comités locales de coco en 6 comunidades. El proyecto inicio con la limpieza y apilado de la madera de las palmas muertas. Se eliminaron cerca de 7,500 palmas en total de las diferentes comunidades. Luego se realizaron talleres de capacitación sobre ALC a los pobladores.

Se localizaron zonas para ubicar los viveros de coco algunos de los cuales no fueron utilizados ya que al comprar las plantas posteriormente, se determino que estas estaban ya listas para sembrarlas en campo abierto. Se sembraron mas de 2,300 plantas, la mayor parte (2,058 plantas) en las comunidades de Tornabé, San Juan y Río Tinto las cuales fueron adquiridas en la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) por Árboles para el Futuro (ONG internacional que apoya el manejo sostenible de la tierra) y luego donadas para el proyecto (PROLANSATE 2000).

Se utilizaron variedades enanas malasinas amarillas y verdes en las comunidades que exigieron estas. Otras comunidades no pudieron ser beneficiadas ya que requerían cocos híbridos Maypan de las cuales no había disponibilidad en la FHIA al momento de realizar el proyecto. Actualmente se ha observado un nuevo rebrote de ALC en a zona atacando las variedades que se suponían resistentes. Debido a esto ha sido necesario realizar estudios para confirmar la presencia de la enfermedad y descartar si la sintomatología presentada por las plantas infectadas se debe a otros factores abióticos.

3.6.2 Replantación en Zona II (La Ceiba, Atlántida)

En 1993 la Standard Fruit Co. Ubicada en la costa norte La Ceiba, Honduras, previendo la llegada de la enfermedad, realizó una importación de híbridos Mapan desde Costa Rica, que fueron plantados en las fincas de Salado Lis lis, Balfate y Cuero Salado ubicadas al nivel del mar. Se replantaron aproximadamente (X Ha) Posterior al Mitch en 1998 los híbridos presentaron un alto porcentaje de mortalidad, mostrando síntomas similares a los del amarillamiento letal, razón por la que han sido objeto de investigaciones por parte de Zamorano (Honduras).¹

¹ Comunicación personal, ing. Omar Ucles encargado fincas Standard Fruit Co.

3.6.3 Replantaciones en Zona III (Iriona, Colón)

En el municipio de Iriona se han llevado a cabo dos programas de replantación, uno realizado por CARITAS entre los años 2000 y 2002, y otro por CAUSE Canadá, CISP, Sub-Sede Pastoral Social CARITAS entre los años 2003 y 2005.

El programa de replantación realizado por CARITAS 2000-2002 consistió en la distribución de 27,000 nueces y 13,500 plantas entre comunidades de Colón y Gracias a Dios; se registró una pérdida de 20% de 12,500 nueces provenientes de Costa Rica. Las causas de mala germinación y mortalidad son variadas e incluyen problemas técnicos y logísticos con el transporte, almacenamiento y eventual establecimiento de viveros en las comunidades. También se llevó a cabo el establecimiento de 21 viveros en igual número de comunidades de las variedades MAPAN, Enano Malayo y Alto del Pacífico provenientes de la costa del Pacífico Hondureño, Nicaragua y México. Este proyecto también contó con un componente de comunicación y capacitación, el cual desarrolló labores de comunicación mediante cursos de capacitación en las comunidades y el establecimiento de Comités Locales del Coco (CLC), programas radiales, afiches sobre ALC, folletos sobre manejo de viveros y un manual de producción de coco (Roca,2005).

El segundo programa de replantación fue realizado por CAUSE Canadá, CISP y Sub-Sede Pastoral Social CARITAS en los municipios de Iriona, Colón y Juan Francisco Bulnes, Gracias a Dios durante los años 2003-2005. El proyecto incluyó 11 comunidades Garífunas en la zona de influencia con un total de 40 pequeños productores sembrando Enanos Malayos Amarillos y Rojos y Altos del Pacífico, procedentes de Costa Rica.

A cada productor se le fueron entregadas 250 nueces en una cama de germinación privada con el compromiso de entregar el 50% de las nueces ya germinadas al proyecto para su venta y distribución al público a un precio subsidiado. Las demás nueces eran propiedad de la persona a cambio de su trabajo. El proyecto también contó con un vivero experimental donde habían unas 4,500 nueces sembradas para su posterior distribución en las comunidades de la zona. Este proyecto colaboró con el Proyecto Nacional del Coco.

3.7 Caracterización de las zonas de estudio

3.7.1 Zona I, Tela, Atlántida

El municipio de Tela se ubica en la Costa Atlántica de Honduras y pertenece al departamento de Atlántida. Se encuentra a 321 km al norte de Tegucigalpa a 103 km al este de la ciudad de San Pedro Sula y a 100 km al oeste de la ciudad de La Ceiba. Está formado por 76 aldeas y 264 caseríos. Consta de 77 mil habitantes en el 2001. Cuenta con una extensión territorial de 1163.3 km² y con una densidad de 66.22 habitantes por km² (IHT 2004).

La actividad turística se esta convirtiendo en una actividad prioritaria, para lo cual se esta planteando el fortalecimiento de la infraestructura turística existente. La actividad turística

concentra al 3.3% de la población ocupada y contribuye al desarrollo de la actividad comercial en el municipio. Los principales atractivos del municipio lo constituyen la famosa Bahía de Tela y sus playas y las aldeas Garífunas que aún conservan sus antiguas tradiciones (IHT 2004). Por lo que es importante saber que el desarrollo turístico afectará principalmente estas comunidades donde más del 95% pertenecen a esta etnia.

En una encuesta realizada por el autor en septiembre de 2005 para detectar el impacto de ALC en el turismo, se observó que no existía disminución en las personas que visitaban las playas debido a la falta de palmeras. Los entrevistados expresaron que la afluencia de personas era similar todos los años. Estos expresaron también que en realidad los visitantes van a la playa y a disfrutar de las comidas no a ver palmeras aunque si hace falta la sombra de estas. Esta situación es aprovechada por los lugareños ya que en temporadas altas construyen cabañas de hojas de corozo o coco y las alquilan a los turistas obteniendo así un ingreso extra. Al contrario, debido a la pérdida del ingreso principal por parte de los cocoteros luego del Huracán Mitch en 1998 se ha venido realizando un incentivo al sector turismo.

Existen varios tipos de turistas pero al que le puede importar mas la palma de coco es al hondureño extranjero que conoció como estaban pobladas antes las playas, pues al regresar a estas zonas las encuentra devastadas por el ALC y siente nostalgia.

Por otra parte, al turista extranjero se le incentiva con sol y playa no importando tanto la situación de las palmeras más que por el impacto escénico. La falta de estas se ha sustituido con las cabañas que construyen los pobladores o con toldos u otros que los mismos turistas instalan en las playas².



Figura 11. Cabañas construidas de hojas de palma

² Sierra, D. 2005. Impacto del ALC en el turismo (Comunicación Personal).

3.7.2 Zona II, La Ceiba, Atlántida

La Ciudad de La Ceiba limita al norte con el mar caribe o de las antillas; al sur con el municipio de Olanchito y la cordillera de Nombre de Dios; al este con el municipio de Jutiapa y al oeste con el municipio del Porvenir.

La Ceiba posee un clima tropical, con brisas marinas en los atardeceres, su temperatura promedio es de 25 grado centígrados, su temperatura de lluvia se presenta en los meses de mayo a noviembre.

Su altura es de tres mil metros sobre el nivel del mar y cuenta con una población aproximada de 400,000 habitantes. Con una mezcla racial en la que se destacan los descendientes de emigrantes extranjeros, los miembros de etnias Garífunas, los caracoles o grupos de personas originarios de la Isla de la Bahía y otro inmigrantes de diferentes rincones del país.

Las fincas de la Standard Fruit que fueron muestreadas están ubicadas en La Ceiba por lo cual las condiciones descritas anteriormente corresponden a estas propiedades. Se ilustran las plantaciones en la figura 11 donde todas las palmeras sembradas son híbridos Mapan abandonados.





Figura 12. Fincas Standard Fruit Company

3.7.3 Caracterización de la zona de estudio (III)

El Municipio Iriona esta situado al este del departamento Colón y abarca 8 comunidades Garífuna. Iriona abarca comunidades que hasta la fecha han conservado más las tradiciones de la cultura Garífuna que otras comunidades. La gente vive de la agricultura y de la pesca artesanal. Las comunidades Garífunas de Iriona tienen alta producción de yuca amarga para la producción de Casabe (pan de yuca).

Las cinco principales estrategias de sobre vivencia de la comunidad Ciriboya son:

Venta de cazabe, frutas y pescado.

Jornales

Remesas

Ganadería, agricultura y pesca para consumo y venta

Son profesionales y ejercen oficios

Ciriboya es una comunidad con nivel medio de gestión, a pesar de ser sede de 2 ONGS (Sub Sede Pastoral Social, CISP -PRODESSS) y de contar con el apoyo de varias ONGS externas, cuenta con una población aproximada de 1000 habitantes, algunos servicios básicos como agua potable, centros básicos, vía de comunicación terrestre, teléfonos comunitarios tiene un alto potencial eco y etnoturístico, un 54% de las familias son pobres luchadores 36% y solo un 10% son los que cuentan con el poder económico prestando servicios como Hospedaje, pulperías, comedores, las únicas fuentes de ingreso para sus pobladores es el jornaleo, venta de productos agrícolas y ocasionalmente pescado y mariscos, así como algunos ingresos alternativos por venta de cazabe, pan etc.

San José De La Punta, Iriona, Colón

Las cinco principales estrategias de sobre vivencia de la comunidad San José de la Punta son:

Fuentes alternativas de ingresos (Venta de pan, cazabe, frutas, tabletas y pescado)

Reciben remesas nacionales y del exterior

Ganadería

Venta de servicios (Transporte, comedores, cantinas, discotecas, pulperías y mini bodegas, hospedajes) y artesanías
Agricultura para consumo y venta.

San José de la Punta es una comunidad de 205 familias, el 39% son pobres pobres el 57% son pobres luchadoras, el poder económico se encuentra en manos del 4% de las familias. La comunidad cuenta con algunos servicios básicos, (agua, centros básicos, acceso carretera) recibe apoyo de algunas ONG's (APROSA, ODECO, CEGA, SSPS), sus principales actividades económicas son la agricultura, la pesca, la ganadería y remesas nacionales e internacionales.



Figura 13. Vista de comunidad garífuna en Colón

3.8 Diagnostico molecular del Amarillamiento Letal del Cocotero ALC

El uso de métodos moleculares resulta confiable para el diagnostico de Amarillamiento Letal. Este diagnostico consta de 3 pasos esenciales: extracción de ADN, amplificación del mismo por medio la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualización del resultado por medio de electroforesis.

3.8.1 Extracción de ADN

La extracción del ácido desoxirribonucleico constituye el primer paso para el diagnostico molecular. Se extrae el ADN total, pues incluye el ADN de la planta y el del patógeno, en este caso del fitoplasma.

La extracción se realiza siguiendo el protocolo de extracción de ADN para plantas leñosas, herbáceas e insectos, diseñado por Doyle & Doyle en 1990, el cual fue modificado por Nigel Harrison en el 2000 para la implementación en el diagnostico del ALC en el laboratorio de diagnostico molecular de Zamorano.

3.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Técnica desarrollada en 1985 por el científico Kary Mullis que consiste en la síntesis de ADN *in vitro* por medio de la ADN polimerasa e hibridación con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo (Kreuzer y Massey 1996).

Esta técnica permite sintetizar una gran cantidad de cadenas de ADN, partiendo solo de una cadena modelo, dos primers, ADN polimerasa y nucleótidos libres (Kreuzer y Massey 1996).

EL PCR se divide en 3 fases que son: Desnaturalización a 95 C, hibridación de primers a 55 C y síntesis de la nueva cadena a 72 C (Micklos y Freyer 1990).

Los primers, iniciadores o cebadores son fragmentos pequeños de ADN de una sola cadena y que normalmente constan de 16 a 20 nucleótidos que son complementarios a la cadena de ADN que se desea amplificar (Kreuzer y Massey 1996).

Para el diagnóstico de Amarillamiento Letal se utilizan 3 tipos de primers; los genéricos o universales para identificación de fitoplasmas, los específicos que amplifican ADN del grupo del ALC y por último los que amplifican únicamente el ADN del fitoplasma causal de la enfermedad como se describen en el cuadro 4 (Scheinder et, al. 1995).

Cuadro 4. Primers universales y grupos específicos del ALC

Primer	Secuencia	Autores
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GATT	Deng y Hiruki
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	Schneider
LY16S	CAT GCA AGT CGA ACG GAA ATC	Harrison
LY16S/23sr	TTG AGA ATT TAC GTT GTT TAT CTA C	Harrison
LXR1	TCG TTT TGA TAA TCT TTC ATT TGA C	Harrison
LYF1	CAT ATT TAT TTC CTT TGC AAT CTG	Harrison

3.8.3 Nested PCR (nPCR)

La utilización de nested PCR para detectar el gen del ARN ribosomal 16S específico de fitoplasmas ha sido de gran utilidad y su aplicación se ha ampliado a diferentes cultivos de importancia económica como caña de azúcar, cocotero y papaya (N. Harrison 1998).

Esta variante de PCR permite someter la misma muestra de ADN a dos reacciones consecutivas de PCR. La nPCR resulta mucho más sensible que una reacción simple de PCR, pues es capaz de amplificar fragmentos de ADN detectables con pocos ciclos de amplificación.

Debido a la naturaleza no cultivable de los fitoplasmas y su restricción al tejido floemático donde se encuentran usualmente en bajas concentraciones, resulta difícil aislar y clonar los genes del ARN ribosomal 16S mediante procedimientos estándares.

Se realiza nPCR según el protocolo Nigel Harrison, 1998.

3.8.4 Electroforesis

Técnica que permite la separación de los fragmentos de ADN por peso molecular y tamaño. La distancia de migración de un fragmento de ADN es inversamente proporcional a su peso (Kreuzer y Massey 1996).

El ADN tiene carga negativa, por lo cual se coloca en un campo eléctrico para que el ADN emigre hacia el polo positivo.

3.8.5 Geles de Poliacrilamida

La poliacrilamida es un polímero de acrilamida que se mezcla con bisacrilamida y un catalizador para polinizar una gel que permite una mejor separación de ADN que la agarosa (Kreuzer y Massey 1996).

Las geles de poliacrilamida se usan para análisis de proteínas, secuenciación de ADN, fingerprinting y para el análisis de técnicas que utilizan marcadores moleculares como: polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) y polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's), entre otros (Kreuzer y Massey 1996).

La poliacrilamida forma poros más pequeños que la agarosa y resuelve fragmentos inferiores a 200 pares de bases (pb) (Kreuzer y Massey 1996).

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

En digestiones con enzimas de restricción en ADN amplificado del fitoplasma causante del ALC se utilizan geles al 8% (Harrison 2001).

3.8.6 Marcadores moleculares

La variación de ADN que se ha acumulado durante la evolución de individuos de diferentes especies ha hecho que ilimitado número de polimorfismos en el mismo sea disponible, permitiendo la construcción de mapas moleculares. Un largo numero de técnicas han sido desarrolladas para detectar estos polimorfismos para mapeo genético, selección asistida para secuenciar genomas y para investigar relaciones de parentesco genético. La decisión de que técnica utilizar depende del tipo de ADN, el marcador y sus cualidades y del organismo bajo investigación (M, Gillet 1999).

3.8.7 Analysis Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP'S)

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

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

3.8.8 Enzimas de restricción

Estas enzimas tienen la propiedad de romper los enlaces que unen nucleótidos consecutivos en una cadena de ADN o ARN (Kreuzer y Massey 1996).

Las enzimas de restricción se clasifican en 3 tipos, 2 de estas clasificaciones son de corte y modificación del ADN, mientras que el otro solamente tiene actividad de restricción y además corta en sitios específicos de los ácidos nucleicos (Micklos y Freyer, 1990).

Existe una nomenclatura para este tipo de enzimas. La primera letra en mayúscula se refiere al género del microorganismo del cual fue extraída, la segunda y tercera letra provienen de la especie del microorganismo y por último un número romano que indica el orden de descubrimiento y síntesis de la enzima (Stryer 1995).

Se utilizaron las enzimas descritas en el cuadro no. 5 con base en estudios anteriores realizados en Zamorano por Melissa Castillo en 2001 y recientemente por Ayna Salas en el 2004, encontrándose mayor separación de bandas y mejor visualización de los sitios de corte de las enzimas mostrando claramente variabilidad genética del patógeno.

Cuadro 5. Sitios de reconocimiento y fabricantes de enzimas de restricción utilizadas en este estudio.

Enzima	Secuencia de Reconocimiento	Fabricante
Alu I	5' AG/CT 3' 3' TC/GA 5'	Biolabs
Hind III	5' A/AGCT T 3' 3' T TCGA/A 5'	Promega
Rsa I	5' GT/AC 3' 3' CA/TG 5'	Promega
Hinf I	5' G/ ANT C 3' 3' C TNA/ G 5'	GibcoBRL

4. MATERIALES Y METODOS

Para el diagnóstico molecular se obtuvieron muestras de varias partes de la planta: ápice y aserrín del tallo, inflorescencias y hojas inmaduras (Oropeza *et.al.*, 2002). Sin embargo, cada una presenta ventajas y desventajas. En el manual del programa de ALC en Zamorano para la toma de muestras de cocotero, se mencionan dos partes principales: inflorescencias inmaduras y aserrín del tallo. La primera tiene la ventaja de que la muestra es estéril y permite la detección temprana de un fitoplasma, pero son difíciles de obtener y en caso de salir negativa la prueba se pierde la inflorescencia. El aserrín del tallo es fácil de obtener con la ayuda de un taladro y con el cuidado de desinfectarlo, sin embargo se corre el riesgo de que la muestra tenga contaminantes y además la detección del fitoplasma es más tardía (Castillo 2001).

Otras desventajas que se tiene al utilizar la inflorescencia, es que por ser plantaciones jóvenes, algunas plantas no han desarrollado inflorescencia, otra es la dificultad de tomar muestra si la palma es muy alta y el último problema es tomar la muestra de una inflorescencia con frutos y en un caso que la planta no presente el fitoplasma será una inflorescencia perdida (Roca 2004).

4.1 Ubicación

Se ilustra en la figura 4 la toma de muestras para la evaluación de híbridos Mapan se llevó a cabo en las fincas Salado Lis Lis, Cuero Salado y Balfate propiedad de la Standard Fruit Company ubicadas en La Ceiba, Honduras ya que las plantaciones de coco en estas fincas eran de importancia para la compañía pues son de interés ya que se sembraron muchos híbridos de Costa Rica representaban una alta inversión en la industria y al mercado local e internacional (Ardón 2001).



Figura 14. Zonas muestreadas en el mapa de Honduras

4.2 Conservación de muestras

Para la conservación de muestras de aserrín del tallo y de inflorescencia inmadura, se utilizó un buffer CTAB de extracción 1+ β - mercapto- etanol al 2% para que las muestras duraran más (Ver Anexo 1). Estas muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente desde su extracción hasta el momento del procesamiento.

4.2.1 Entrevista corta con recolectores

Se realizó una entrevista corta utilizando la metodología “Apreciación Rural Rápida” con los recolectores de coco de donde se obtuvieron las muestras, para que dieran una breve reseña del manejo que le habían brindado a sus palmas en el transcurso desde la siembra hasta la toma de muestras.

Estas entrevistas se realizaron aproximadamente un mes y medio después de la toma de muestras.

4.2.2 Selección de recolectores

Para el muestreo de este estudio, se observaron los patios de las casas donde había palmas con síntomas de amarillamiento ya que la mayoría de estas palmas fueron plantadas durante los programas de replantación.

Al encontrar palmas con síntomas de amarillamiento, se solicitó permiso a los dueños de los patios para realizar la toma de muestras posterior a una breve explicación sobre para que servirían las muestras y sobre el estudio que se estaba llevando a cabo.



Figura 15. Propietaria de cocotero híbrido en Irióna

Nomenclatura de muestras

Para rotular las muestras se usó la nomenclatura utilizada en el laboratorio de fitopatología molecular de Zamorano que permite la identificación específica de una muestra por cronología y lugar de recolección. Este sistema ayuda al análisis de los datos para estudios epidemiológicos futuros.

Cuadro 6. Método para rotular muestras

Viaje:	# de viaje al lugar de muestreo
Sitio de muestreo:	Iniciales de la localidad
Enfermedad:	ALC
Número de muestra:	El número correspondiente a la muestra
Tejido muestreado:	En este caso A de aserrín

Cuadro 7. Las abreviaturas para los lugares de muestreo

SLL:	Salado Lis Lis
CyS:	Cuero y Salado
B:	Balfate
G:	Guanaja
O:	Olancho

Criterios de muestreo

Las muestras se recolectaron siguiendo los criterios del Manual para la toma de muestras desarrollado por el programa de ALC en Zamorano (Castillo 2001):

- Plantas con síntomas de amarillamiento (no necesariamente ALC)
- Plantas de 3 años en adelante, que ya estuvieran en estado reproductivo o próximas a el.
- Plantas entre 1-5 en la escala de severidad de síntomas (M. Roca).
- Plantas sanas o asintomáticas en sitios con alta mortalidad.
- Plantas representativas de una zona o de un tipo de síntomas (García 2002).

Incidencia y Severidad:

Cuadro 8. Incidencia y severidad

Incidencia:	El # de plantas infectadas/el total de plantas muestreadas* 100
Severidad:	Con base en la escala de síntomas descrita en la figura 6

4.3 Procesamiento de muestras

Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo según el método Doyle y Doyle modificado por Harrison.

Amplificación de ADN por PCR directo y por nPCR

Se realizaron pruebas de diagnóstico de Amarillamiento Letal a través de PCR (Polimerase Chain Reaction). Se utilizaron los primers universales para fitoplasmas (P1, P7) (N. Harrison 1998). Ver cuadro 4.

Electroforesis horizontal

Utilizando una fuente de energía se determino la calidad y cantidad de ADN extraído así también para el diagnostico de los productos de la PCR se utilizó una electroforesis horizontal con agarosa al 0.9%.

Se colocaron las muestras que se deseaban analizar más el control positivo el cual es una muestra ya conocida positiva para ALC y la escalera que determina el peso de la banda de ADN. La gel se corrió a 85 voltios por 30 minutos en todos los casos.

Nested PCR (nPCR)

Para aumentar especificidad y sensibilidad en el diagnostico, los productos de PCR fueron sometidos a una Nested PCR, técnica que utiliza primers específicos para el grupo de Amarillamiento Letal. Los utilizados fueron (LY16S/LY16S23rs) (N.Harrison 1998). Ver cuadro 4.

Digestión con Enzimas de Restricción

Como se ilustra en el cuadro 5 se realizaron 4 digestiones con enzimas de restricción tomando como referencia estudios previos realizados en Zamorano por Melissa Castillo y Ayna Salas en el 2001 y 2004 respectivamente y en la Universidad de Florida. Las enzimas utilizadas fueron Hae III, Alu I, Hinf I y Rsa I.

Resultados de estudios anteriores en Zamorano

En el 2001 en las costas hondureñas Castillo realizó el mismo estudio para identificar posibles polimorfismos y encontró diferencia en los perfiles encontrados con la enzima *Hinf I* en una de las muestras tomadas en Honduras.

Las digestiones con la enzima *Alu I* presentaron perfiles parecidos con excepción de la muestra Jam ALC 2, proveniente de Jamaica en donde ya se han encontrado variabilidad

genética del fitoplasma La diferencia en este perfil fue muy clara ya que se presentaron bandas que no fueron visibles en las muestras recolectadas en la Ensenada (Salas 2004) Digestiones con la enzima *Hinf I* de nuevo mostraron diferencia en las muestras de Jamaica y Cuba con respecto a las recolectadas en Tornabe y la Ensenada (Salas 2004)

La digestión con la enzima *Rsa I* mostró variabilidad de bandas con muestras obtenidas de la Ensenada, (Salas 2004).

Con la enzima *Hind I* no se han sido realizado estudios previos para RFLP's con muestras de la costa Hondureña.

Cuadro 9. Muestras utilizadas para la digestión con enzimas de restricción

Muestra	Proveniente de:
Control de México 1MALC5A	Centro de investigación científica de Yucatán
Control de Cuba 1CuALC2A	Instituto de Investigación en Fruticultura Tropical
Control de Florida y Jamaica 1FIALC2A, 1JALC5A	Universidad de Florida
Control de Coyoil 2ChALC4A	Olancho, Honduras
Muestreo # 1	Salado Lis-Lis, Cuero y Salado y Balfate, La Ceiba, Honduras
Muestreo # 2	Salado Lis-Lis, Cuero y Salado y Balfate, La Ceiba, Honduras

Digestión de las muestras

Para realizar la digestión del ADN con las enzimas de restricción se siguió el protocolo descrito en el anexo 1. De los productos de la nPCR se tomaron 5 ul para la primera digestión y se mezclaron con el buffer y la enzima de restricción correspondiente. Se incubo esta mezcla a 37 C por una noche en un baño María. Al siguiente día se agregó una nueva mezcla a la primera descrita que contiene el mismo buffer y enzima; se incubo por 4 horas más a la misma temperatura.

Al finalizar del proceso de incubación se almacenaron las muestras a -20 C hasta ser visualizadas en una gel de poliacrilamida.

Geles de poliacrilamida

Se compararon los perfiles de restricción que se obtuvieron de las digestiones con las enzimas de restricción por medio de geles de poliacrilamida al 8%, que fueron preparadas siguiendo el protocolo citado en el anexo 2.

Estas geles fueron corridas verticalmente a 250V por 1 hora en precalentamiento; se agregan 10 ul del producto de digestión de enzimas y se corre a 250V por 1 hora y 30 minutos.

La gel fue visualizada a través de un transiluminador de rayos UV previamente teñida con bromuro de etidio a una concentración de 1:10 por 15 minutos.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Desde 1996, año que fue reportado el ALC en Honduras por primera vez, hasta la fecha (2005), se han experimentado pérdidas cuantiosas en las poblaciones de palmas tanto en Altos del Atlántico como en palmas de las variedades consideradas tolerantes establecidas por los programas de replantación como se ilustra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Mortalidad por ALC en variedades resistentes de muestras tomadas en las zonas de la costa atlántica hondureña.

Variedad	Mortalidad (%)
EM (verde)	23
EM (Amarillo)	37.5
Híbridos	58
Altos del Pacifico	95
Altos del Atlántico	Etapa de vivero

5.1 Zona I, Tela

Se realizaron dos viajes a Tela donde se recolectaron 27 muestras de palmas de coco en cinco comunidades de la zona costera de este municipio: Tornabé, Miami, Triunfo de la cruz, La Ensenada y Cocalito. Todas las palmas se encontraban a una distancia promedio de 300 m frente al mar, se observaron vientos fuertes en todas las comunidades y poca vegetación circundante a las plantas muestreadas.

En el primer viaje se recolectaron 17 muestras de las cuales tres resultaron positivas con PCR mientras que con nPCR el número aumento a nueve plantas. En el segundo viaje se recolectaron siete muestras pues algunas de las palmeras ya habían muerto o no fueron encontradas. De éstas cuatro resultaron positivas con PCR dos de las cuales fueron negativas al primer muestreo.

Se observaron síntomas de la pudrición de cogollo en todas las zonas, sin embargo fue difícil obtener muestras para inocularla en laboratorio ya que es necesario cortar la palma y extraer tejido del meristemo apical

5.2 Zona II, La Ceiba

- Primer muestreo (6 de abril del 2005)

Se recolectaron 24 muestras en las fincas Salado Lis Lis, Balfate y Cuero Salado de la Standard Fruit Co. Ubicadas en La Ceiba, Atlántida las cuales fueron debidamente marcadas. La edad de la plantación es uniforme las palmas oscilan entre 12 y 13 años de edad.

El panorama general de la plantación era amarillamiento total, pero esto puede deberse no solo al ALC sino al abandono de las tierras, es decir no se aplica ningún tipo de manejo agronómico a las palmeras.

De las 24 muestreadas 21 fueron positivas a ALC.

- Segundo muestreo (29 de septiembre del 2005)

En el segundo muestreo se tomaron de las mismas palmas marcadas, pero esta vez de las 24 se encontraron solo 15 vivas en estadios terminales del ALC. Las condiciones climáticas eran similares a las del primer muestreo

De las 15 muestreadas 6 fueron positivas a ALC, esto debido a la degeneración de la palma, pues se encontraba totalmente podrida por dentro, pudo deberse a una infección secundaria como pudrición del cogollo.

5.3 Zona III, Iriona

Primer muestreo (9 de febrero de 2005)

Se tomaron 20 muestras en la comunidad Garífuna de Ciriboya, Iriona, Colón. Las muestras fueron tomadas en su mayoría en patios particulares de la comunidad. Las muestras fueron tomadas en plantas que tuvieran 3 años o más, preferiblemente en estado reproductivo o cercano a él.

En algunos de los lugares visitados, las plantas se encontraban en lugares cercanos a estancamientos de agua, que podrían ocasionar daños abióticos como el amarillamiento de las hojas. Otros factores abióticos incluyen deficiencias de nutrientes ya que estas palmas no reciben fertilización, o también el amarillamiento puede ser causado por otros factores bióticos. Se tomaron muestras de distintos lugares los cuales incluían muestras muy cercanas a la playa, y otras con cierta distancia con referencia a la playa misma.

Segundo muestreo (18 de marzo de 2005)

En la comunidad de de San José de la Punta, las primeras doce muestras tomadas en el Centro Básico “Carlota González Velásquez” tienen 5 años y fueron donadas al centro por el Proyecto de Replantación del Cocotero de la Sub Sede Pastoral Social CARITAS. Todos los cocos de este lugar recibieron el mismo manejo desde su siembra hasta el momento de la toma de datos.

El resto de las muestras recibieron distinto tipo de manejo ya que fueron tomados de los patios de diferentes productores. La mayoría de las plantas muestreadas presentaban síntomas de amarillamiento en las hojas o poca producción de frutos, incluso algunas de

las plantas muestreadas llegaban a floración, no producían ningún fruto y la flor terminaba secándose. Se muestrearon cinco híbridos de los cuales cuatro resultaron positivos para el fitoplasma causante del ALC. En el tiempo transcurrido desde la toma de muestras hasta realizar la entrevista corta con los recolectores que fue aproximadamente de mes y medio, tres de estas palmas murieron o fueron derribadas por sus dueños por estar en estado avanzado de la enfermedad.

En total se muestrearon 30 palmas de las cuales se tomaron 40 muestras. Para cinco palmas en cada comunidad se tomaron muestras de aserrín del tallo y de inflorescencia inmadura. Se muestrearon 15 palmas en la comunidad de Ciriboya y 15 palmas en la comunidad de San José de la Punta.

Para las 15 palmas muestreadas en Ciriboya, solamente una palma salió positiva con PCR y tres muestras más salieron positivas con Nested PCR (nPCR). Mientras que para la comunidad de San José de la Punta, salieron cinco muestras positivas con PCR y tres muestras más, positivas con Nested PCR (nPCR).

5.4 Factores bióticos encontrados

Cuadro 10. Definición de zonas de muestreo

Lugares	# Zona
Punta Sal, Miami, Tornabé, La Ensenada y Triunfo de la Cruz	I
Salado Lis Lis, Cuero Salado y Balfate	II
Ciriboya y San José de la Punta	III

Cuadro 12. Factores bióticos observados

BIOTICOS		Incidencia		
Enfermedades	Síntomas	Zona I	Zona II	Zona III
ALC	Caída prematura de cocos hojas color amarillo marrón necrosis en la inflorescencia	Alta	Alta	Media
Anillo Rojo	Pérdida prematura de nueces, marchitamiento de la inflorescencia, amarillamiento, bronceado y muerte progresiva de las hojas jóvenes	-----	-----	-----
Phytophthora palmivora	Decoloración de la hoja bandera se pudre y es fácil de remover, las demás se caen hasta que queda el tronco sin hojas	Media	Alta	Baja
Strategus aloeus	Daño mecánico al meristemo apical de la palma en etapa de vivero	-----	-----	Alto
Rhynchophorus palmarum	Vector del anillo rojo, daño mecánico al tronco permitiendo la entrada de otros patógenos	-----	-----	-----
Myndus crudus	Vector del ALC	Baja	Baja	Baja

5.5 Cuadros con resultados representativos de las zonas de muestreo.

Cuadro 13. Zona I análisis por PCR directa y Nested PCR

Muestra	Edad (años)	Variedad y Origen	Observaciones	Severidad	PCR	nPCR
5TORALC70	6	EMA	Sin vegetación, zonas cercanas a la playa	3	+	
5MIAALC72	6	EMA	Sin vegetación	1	-	-
5MIAALC73	6	EMA	Sin vegetación	1	-	+
5TRIALC75	6	Híbrido	Sin vegetación	2	-	-
5TRIALC76	6	EMA	Sin vegetación	1	-	+
5ENSALC80	6	EMA	Vientos moderados	2	-	-
5ENSALC81	6	EMA	Vientos moderados	1	-	-
5COCALC83	6	Híbrido	Bosque, cercano a la playa	2	-	-
5COCALC84	6	Híbrido	Bosque, cercano a la playa	3	+	

Zona I: Resultados representativos de 27 muestras tomadas en comunidades de Tela donde el 60% resultaron positivas al ALC con PCR y nPCR entre Enanos Malayos e Híbridos muestreados (figura 16).

Cuadro 14 Zona II análisis de muestras por PCR directa y Nested PCR

Muestra	Edad años	Variedad y Origen	Observaciones	Severidad	PCR	nPCR
12SLLALC41A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	+	
12SLLALC42A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	-	-
12SLLALC43A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	+	
12SLLALC44A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	+	
1BALC60A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	-	+
1BALC61A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	-	+
1BALC62A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	1	+	+
4CYSALC63A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	2	-	+
4CYSALC64A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	2	-	+
4CYSALC65A	12	Híbrido	Híbrido Mapan abandonado	2	+	

Zona II: Resultados representativos de 39 híbridos que fueron tomados en las fincas de la Standard Fruit Co, ubicadas en La Ceiba (figura 17). De estas palmas muestreadas un 71% resultaron positivas para ALC por PCR y nPCR. El uso de nPCR es necesario ya que aumenta la sensibilidad y especificidad del análisis del ALC, haciéndola una prueba más confiable que el PCR directo.

Cuadro 15. Zona III análisis de muestras por PCR directa y Nested

Muestra	Edad (años)	Variedad y Origen	Observaciones	Severidad	PCR	nPCR
5CiALC1A	5	EM (A)	Alta vegetación	2	-	-
5CiALC2I	5	EM (A)	Alta vegetación	2	+	+
5CiALC3A	4	EM (R)		2	-	+
5CiALC7A	5	EM (A)	Junto a fosa séptica	2	-	-
5CiALC8A	5	EM (A)	Junto a fosa séptica	2	-	+
5CiALC9A	5	EM (A)		2	-	-
5CiALC16A	4	EM (R)	Estancamiento de agua	2	-	-
5CiALC17A	5	EM (A)		2	-	+
5CiALC18A	3	EM (A)	Agujeros de escarabajo	2	-	-
5SJP-ALC30I	5	EM (A)		3	+	+
5SJP- ALC31A	5	EM (A)		2	-	-
5SJP- ALC36A	3.5	Híbrido	Alta vegetación	2	+	+
5SJP- ALC37A	5	Híbrido	Cerca de letrina.	2	+	+
5SJP- ALC38A	4	EM (A)		2	-	-
5SJP-ALC39I	4	EM (A)		2	+	+
5SJP- ALC40A	3.5	Híbrido	Alta humedad	2	+	+

Zona III: Resultados representativos de 30 muestras tomadas en Ciriboya y San Jose de la Punta donde el 43% de estas palmas fueron positivas al análisis de ALC (figura 18).

En esta zona de muestreo solo fueron tomados Enanos Malayos entre amarillos y verdes, lo cual indica la baja mortalidad de estos en comparación con los híbridos analizados.

5.6 Análisis por PCR directo

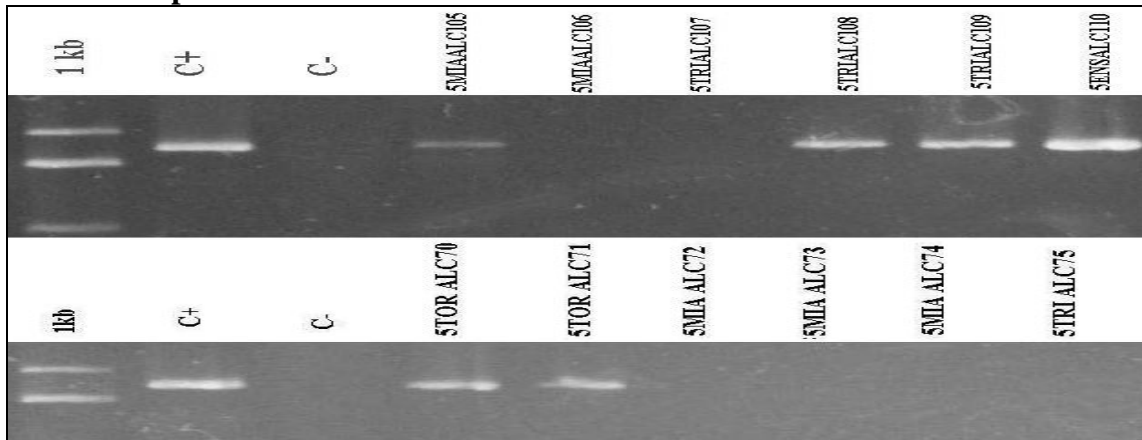


Figura 16. Gel de electroforesis 0.9% mostrando productos de PCR con P1P7 en zona I.

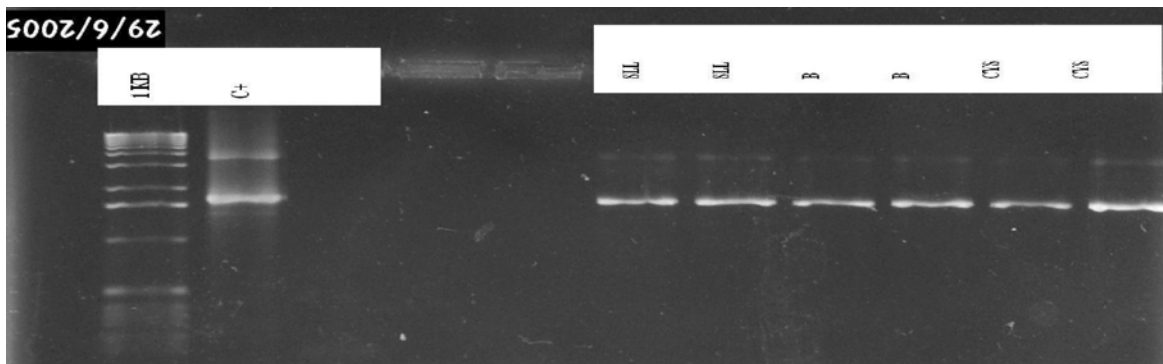


Figura 17. Gel de electroforesis 0.9% mostrando productos de PCR con P1P7 en zona II

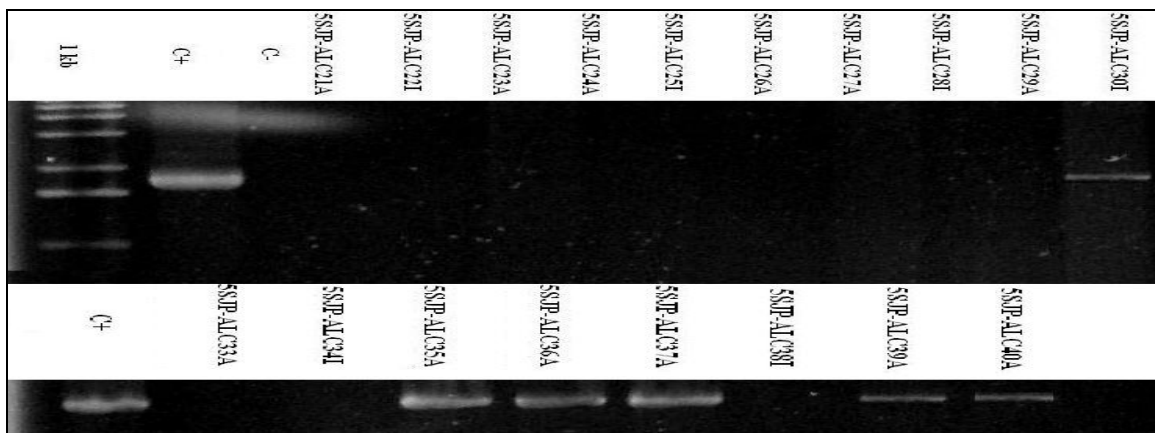


Figura 18. Gel de electroforesis 0.9% mostrando productos de PCR con P1P7 en zona III

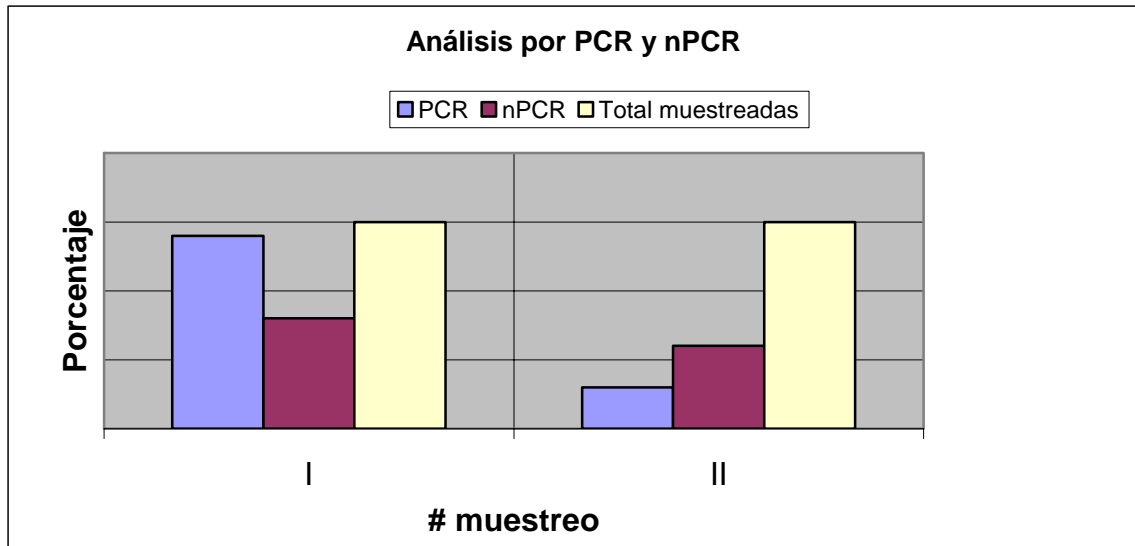


Figura 19. Análisis realizados por PCR y nPCR en zona II.

Con el nPCR, se obtiene un número más alto de muestras positivas, ya que incrementa considerablemente la sensibilidad de la prueba, al amplificar el producto de PCR por segunda vez. Esto implica que la prueba más confiable para la detección del ALC es nPCR, en lugar de PCR directo.

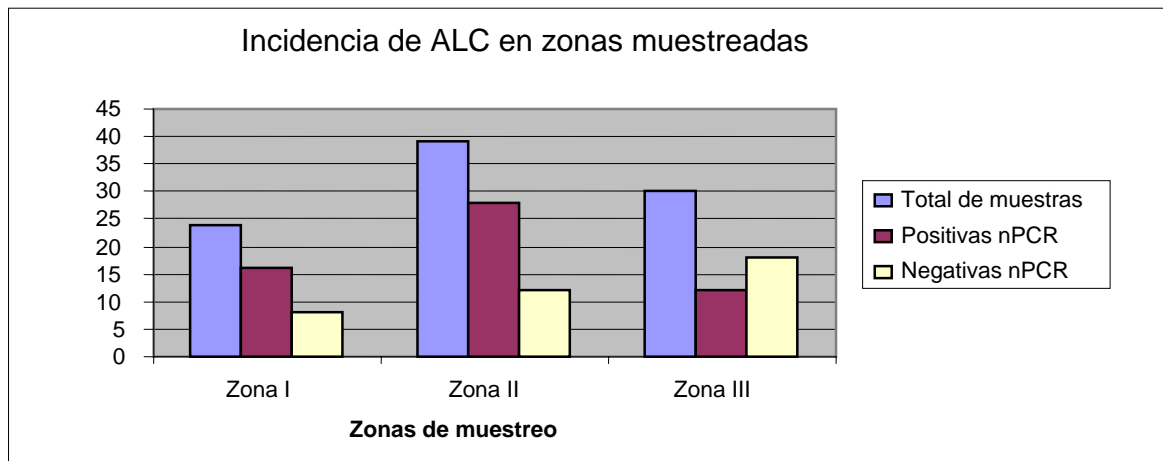


Figura 20. Resultados comparativos de la incidencia de palmas sintomáticas en las zonas de estudio.

5.7 Resultados de la caracterización de la variabilidad genética de fitoplasmas del ALC en Honduras por marcadores moleculares.

Cuadro 11. Análisis de RFLP'S

Localidad	# Muestra	(+ PCR)	(+ nPCR)
Salado Lis lis	47	+	+
Salado Lis lis	48	+	+
Salado Lis lis	49	+	+
Balfate	57	+	+
Balfate	59	+	+
Balfate	62	+	+
Cuero y Salado	63	+	+
Cuero y Salado	64	+	+
Cuero y Salado	66	+	+
Guanaja	1	+	+
Guanaja	7	+	+
Guanaja	29	+	+
Guanaja	35	+	+

Las muestras utilizadas en el análisis de RFLP'S provienen de las fincas de la Standard Fruit Company que fueron comparadas con muestras de Guanaja.

Cuadro 12. Controles positivos para RFLP'S

Localidad	# Muestra	(+ PCR)	(+ nPCR)
Florida	15	+	+
Cuba	17	+	+
México	18	+	+
Jamaica	16	+	+
Olancho	5	+	+
Coyol	8	+	+

Estas muestras fueron utilizadas como controles positivos con base a estudios realizados anteriormente donde se han encontrado patrones de bandas diferentes en el análisis de RFLP'S.

5.7.1 GELES RFLP'S

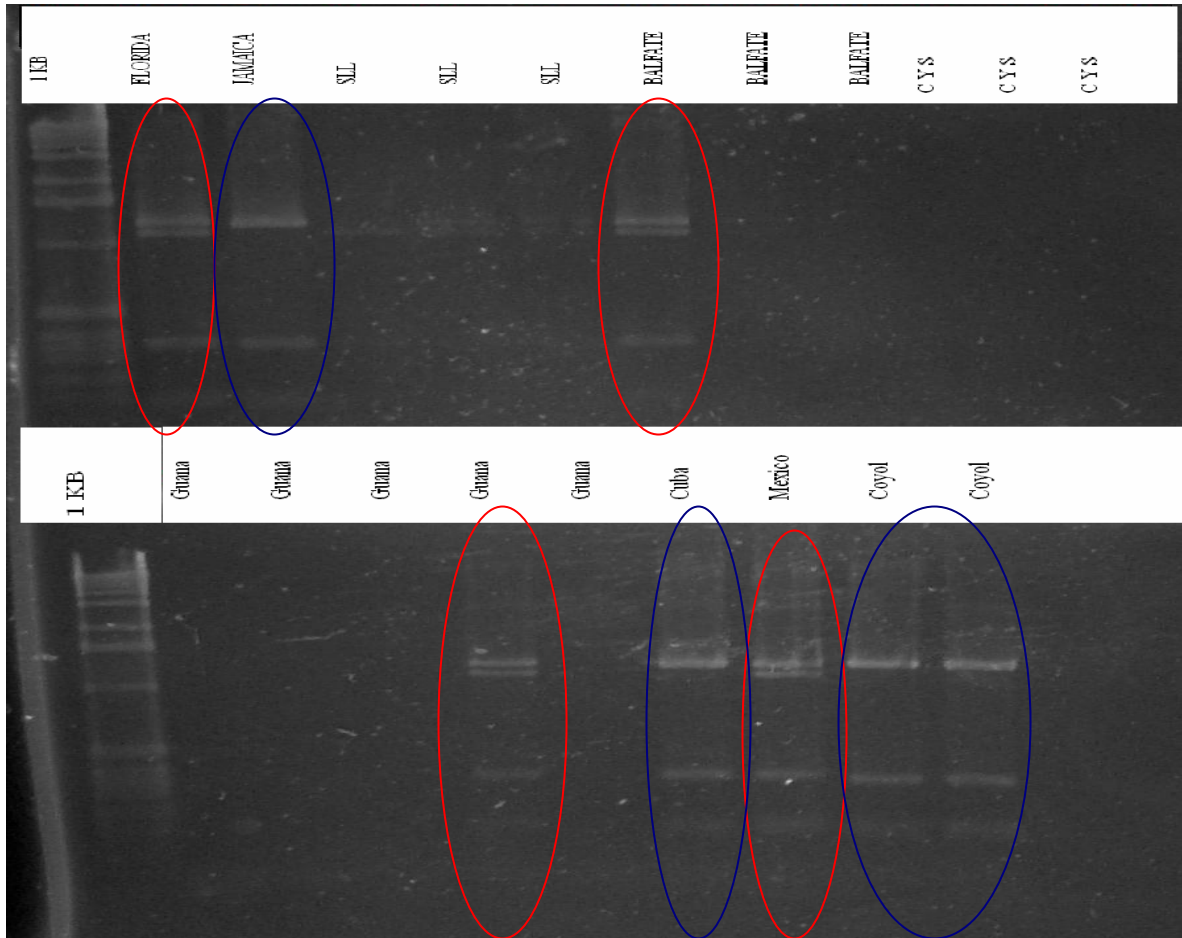


Figura 21. Gel de synergel y azarosa (3%) mostrando perfiles de restricción obtenidos de la digestión de los productos de la reamplificación con los primers LY16S y LY16/23S con la enzima *Hinf I*.

De las 4 enzimas utilizadas (*Alu I*, *Rsa I*, *Hind I* y *Hinf I*) para el análisis de RFLP'S, la única que mostró patrones diferentes fue la enzima *Hinf I*. Estos resultados coinciden con estudios anteriores (Castillo 2001; Salas 2004).

Las muestras sometidas al análisis de RFLP'S fueron palmas provenientes de las fincas de la Standard Fruit Co, (Zona II) y muestras provenientes de Guanaja, recolectadas en el 2004.

Los resultados (Fig 21) muestran (con poca resolución) una variabilidad genética del patógeno dentro de las mismas fincas ubicadas en la misma zona. El patrón de la muestra de La Florida y México (considerado el patrón "clásico" del ALC) es igual al encontrado en Guanaja y Balfate (Ceiba). En la finca de Balfate se encontró una incidencia más alta

del ALC que en otras fincas. En contraste, se encontró un patrón diferente en palmas de Coyol recolectadas en Olancho en el 2004. El patrón de Olancho coincide con el patrón reportado para “hot spots” de ALC en Cuba y Jamaica (Roca 2005, comunicación personal) donde se ha experimentado una alta mortalidad de híbridos y Enanos Malayos. La alta mortalidad de híbridos en Florida y Honduras coincide con el patrón genético “clásico”.

Con base en estos resultados, se especula que el rompimiento de la resistencia visto en los últimos 10 años, no es necesariamente en función de una mutación del patógeno, sino en función de la genética del hospedero.

Será necesario continuar con esta evolución para confirmar esta hipótesis.

6. CONCLUSIONES

- El Amarillamiento Letal del Cocotero está actualmente activo en todas las zonas del estudio. La mayor incidencia se reportó en el departamento de Atlántida y la menor en el departamento de Colón
- El estudio reportó una mayor replantación de Enanos Malayos en las comunidades y de híbridos en las plantaciones comerciales
- Se observó una alta mortalidad en híbridos y una mas baja en variedades enanas
- Con base en los muestreos y el resultado del diagnostico molecular con énfasis en el ALC y los síntomas observados el desempeño de los híbridos Mapan ya no es satisfactorio, aunque represento una salida a corto plazo para la Standard Fruit Co., en los programas de replantación. Estos híbridos han demostrado una alta mortalidad por ALC con mayor incidencia en la finca Balfate donde esta es de aproximadamente del 90% por lo que no pueden considerarse como opción para los programas futuros de replantación en Honduras.
- Se concluye por el diagnostico molecular que el Amarillamiento Letal es la principal causa de la muerte de los híbridos Mapan en las fincas Salado Lis Lis, Cuero Salado y Balfate mas no en los Enanos Malayos muestreados.
- Se encontraron focos con alta incidencia de pudrición de cogollo (*Phytophthora palmivora*) en Tela, en las 3 fincas de la Standard Fruit Company en La Ceiba, Guanaja y la Moskitia en todas las variedades del cocoterros.
- No todos los síntomas de amarillamiento en palmas son causados por ALC; pueden ser causadas por otros factores bióticos o abióticos.
- Las variedades enanas replantadas son menos robustas agronómicamente que las variedades altas y requieren de fertilización y riego para un buen desarrollo.

- Las variedades enanas no están bien adaptadas a condiciones subóptimas de playa y no representan una buena opción para replantación turística.
- La replantación actual con Altos del Pacífico está demasiado joven para ser evaluada; la homogeneidad genética de una sola variedad representa un peligro fitosanitario.
- La enzima que mostró patrones diferentes fue Hinf I, donde las muestras provenientes de la finca Balfate y de Guanaja fueron similares a las de Florida y México; mientras que las de Cuba y Jamaica son similares a las del coyol de Choluteca.

7. RECOMENDACIONES

- Continuar la replantación con Enanos Malayos Amarillos y Rojos ya que tuvieron un mayor índice de sobrevivencia al ALC.
- Establecer ensayos de resistencia en Honduras y otros países para evaluar diferentes variedades a los posibles nuevos patotipos que han roto la resistencia de las variedades consideradas tolerantes
- En próximas tomas de muestras, recolectar muestras de suelo para determinar si el amarillamiento presentado por las hojas puede ser causado por falta de nutrientes en el suelo.
- Hacer ensayos para evaluar métodos de control contra escarabajo buey (*Strategus aloeus*) en almácigos y patios particulares.

8. BIBLIOGRAFIA

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

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

Castaño-Zapata, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. 2ª ed. Honduras. Zamorano Academic Press. 518 p.

Castillo, M., 1999. Estudio básico de la diversidad genética del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras

Elliot M.; Broschat T.; Uchida J.; Simone G. 2004. Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders. The American Phytopathological Society. 61 p.

Elizabeth M. Gillet, Florian Scholz. 1999. Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity. Universidad Gottingen.

Figueroa A.; Ruíz J. 2002. Manual para el establecimiento y manejo de viveros y plantaciones de cocotero. Honduras. 12 p.

García Felipe A. 2002. Detección del Amarillamiento letal del cocotero en híbridos resistentes en la plantación de Salado Lis Lis (Atlántida, Honduras), comparando sistemas de detección del fitoplasma en dos tipos de tejidos y con tres “primers” para PCR. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. 2, 30 p.

G. Llacer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello. 2000. Patología Vegetal. EDICIONES MUNDI-PRENSA.

HARRISON N. 1998 Recent studies on detection of Lethal Yellowing disease phytoplasmas in the Americas. In proceedings of an International Workshop on LY-like diseases of coconut, Elmina, Ghana, November 1995.

HARRISON, N.A. 2001. Lethal Yellowing of palms.
<http://www.ftld.ufl.edu/lyfacts.htm>.

IHT, Instituto Hondureño de Turismo. 2004. Proyecto de Turismo Costero Sostenible. En línea. Visitado el 20 de sep. De 2005. Disponible en: <http://www.turismocostero.org/tela>

J.G Ohler. 1999. El Cocotero: árbol de la vida. Organización de naciones unidas para la agricultura y la alimentación FAO.

Jones, P.; P. Cronjé & S. Warokka. (1999): Investigations into coconut diseases of uncertain etiology in Indonesia. 5th International Conference on Plant Protection in the Tropics, Kuala Lumpur, Malaysia. Sesión 2A.

Kreuzer, H.; Massey, A. 1996. Recombinant DNA and Biotechnology. Washington, EE.UU., ASM Press. 552p.

M. K. Nair. 1993. Advances in Coconut Research and Development. OXFORD & IBH PUBLISHING CO.

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

Maramosh . 1964. Coconut diseases. Universidad Gottingen. Alemania. 280 p.

MICKLOS, D.; FREYER G. A. 1990. DNA Science: A first course in recombinant DNA technology. Carolina del Norte, EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 442 p.

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

PROLANSATE. 2000. Fundación para la Protección de Lancetilla, Punta Sal y Texiguat: Proyecto de reforestación de 3 comunidades costeras del Parque Nacional Punta Izopo y reforestación de 4 comunidades costeras del Parque Nacional Jeannette Kawas. Informe de Finalización. Tela, Atlántida, Honduras.

Quijada, O. R., Ochoa, A., Berríos, C. 1991. Principales Plagas del Cultivo de la Palma Aceitera en La Zona sur del Lago de Maracaibo. En línea. Visitado el 3 de octubre de 2005. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd35/texto/>

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

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

Roca M. M. 2005. Antecedentes ALC en Honduras. Zamorano. EAP (comunicación personal).

SCHNEIDER, B.; SEEMÜELLER, E. 1995. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied and environmental microbiology*. 60(9): 3409–3412.

Soto, E., Arnal, E., Díaz, A., Rondon, A. Malavé, A., Ruiz, A. 2004. Enfermedades e insectos dañinos más importantes en el cultivo del cocotero. En línea. Visitado el 5 de octubre de 2005. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd62>

9. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reacciones con enzimas de restricción

Día 1

5.0 µl de producto de amplificación (varia de acuerdo a la intensidad de la banda)

0.5 µl de enzima (10 U/µl)

1.5 µl de buffer de la enzima

8.0 µl de agua destilada estéril (debe modificarse, para completar 15 µl de volumen final)

15.0 µl Total (incubar a la temperatura indicada, hasta el día siguiente)

Día 2

A la mezcla del día uno, agregar:

0.5 µl de enzima

0.5 µl de buffer

4.0 µl de agua destilada estéril

20.0 µl total (incubar a la temperatura indicada, hasta el día siguiente)

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

Anexo 2. Protocolo para preparar geles de poliacrilamida

29.0 g acrilamida

1.0 g bisacrilamida

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

TBE 5X

54.0 g de Tris

27.5 g de ácido bórico

20.0 ml de EDTA 0.5M pH 8

Solución de persulfato de amonio al 1%

0.1 g de persulfato de amonio

1.0 ml de agua destilada estéril

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

Gel de acrilamida al 8%

6.65 ml de solución acrilamida-bisacrilamida al 30%
13.17 ml de agua destilada estéril
5.0 ml de TBE 5X
175.0 µl de persulfato de amonio al 1% (preparado en ese momento)
8.7 µl de TEMED
Mezclar y verter en el molde para la gel. Tiempo aproximado de polimerización: 1:30 h.

Escalera molecular (1 Kb DNA ladder Gibco)

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

Escalera molecular (pGEM Promega)

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

Anexo 3. Preparación de reactivos

Reactivos

Buffer CTAB 1

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

Disolver los reactivos excepto el β-mercaptoetanol, en aproximadamente 500ml de agua destilada aplicando calor. Enfriar y ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado. Aforar a 1 L. Esterilizar en el autoclave durante 20 min. a 120 °C 15 psi. Dejar enfriar y adicionar el β-mercaptoetanol antes de usar, mezclar y almacenar a 65 °C.

Buffer CTAB 2

10% CTAB
0.7 M NaCl

Cloroformo: Alcohol isoamilico 24: 1

96 ml de cloroformo
4 ml de alcohol isoamilico

Buffer TE alto en sal

1mM EDTA
1M NaCl
10mM Tris-HCl pH 8
Esterilizar en el autoclave durante 20 min. a 120 °C 15 psi

Isopropanol

Etanol al 95 %

65

Etanol al 70%

70 ml etanol

30 ml agua destilada

Anexo 4. Protocolo para extracción de ADN

1. Colocar en un mortero aproximadamente 1 g del tejido a extraer y agregar 600 μ l de CTAB 1.
2. Agregar 0.1 g de arena de cuarzo ultrapura y macerar el tejido con un pistilo.
3. Transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
4. Incubar a 65 C por 30 min.
5. Añadir (igual volumen)600 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, mezclar bien.
6. Centrifugar por 5 min. a 12,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga, evitando la interfase.
8. Añadir 1/10 del volumen de CTAB 2
9. Repetir pasos 5, 6 y 7.
10. Añadir 2/3 del volumen de isopropanol frío, mezclar bien.
11. Centrifugar por 10 min. a 12,000 rpm.
12. Decantar el líquido cuidando de no botar el precipitado de ADN.
13. Secar al aire o en una incubadora.
14. Resuspender el precipitado en 100 μ l de buffer TE alto en sal.
15. Añadir 250 μ l de etanol frío al 95% (se puede dejar a 4 °C toda la noche para obtener una mejor precipitación del ADN).
16. Centrifugar 10 min. a 12,000 rpm.
17. Repetir paso 12.
18. Agregar 500 μ l de etanol al 70% frío.
19. Centrifugar 10 minutos a 12,000 rpm.
20. Repetir pasos 12 y 13.
21. Resuspender el precipitado en 50 μ l de agua destilada estéril.
22. Almacenar a 4 °C.