

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica y Microbiología



Validación de dos técnicas para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero por la reacción en cadena de la polimerasa y caracterización molecular de fitoplasmas asociados a esta enfermedad en Guatemala por polimorfismo de largo de fragmentos de restricción

Trabajo de investigación presentado por
Fredy Omar Mejía Rodríguez
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica

Guatemala
2007

Validación de dos técnicas para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero por la reacción en cadena de la polimerasa y caracterización molecular de fitoplasmas asociados a esta enfermedad en Guatemala por polimorfismo de largo de fragmentos de restricción

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica y Microbiología

Validación de dos técnicas para el diagnóstico del
amarillamiento letal del cocotero por la reacción en cadena
de la polimerasa y caracterización molecular de fitoplasmas
asociados a esta enfermedad en Guatemala por
polimorfismo de largo de fragmentos de restricción

Trabajo de investigación presentado por
Fredy Omar Mejía Rodríguez
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica

Guatemala
2007

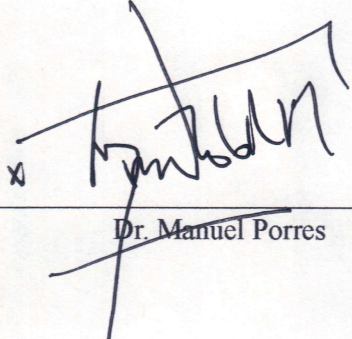
Hoja de Firmas de Visto Bueno de Tribunal examinador

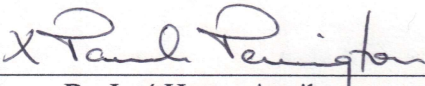
Vo. Bo.:

(f) 
Lic. Margarita Palmieri

Tribunal Examinador:

(f) 
Lic. Margarita Palmieri

(f) 
Dr. Manuel Porres

(f) 
Dr. José Hector Aguilar

Guatemala, 13 junio de 2007

PREFACIO

Este trabajo de graduación es el resultado de varios años de investigación sobre el amarillamiento letal del cocotero en Guatemala. La investigación de esta enfermedad se inició formalmente en el año 2003, con la aprobación del proyecto titulado “Vigilancia epidemiológica del amarillamiento letal del cocotero en los departamentos de Izabal y Petén: búsqueda de medidas locales para su control”, un proyecto financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONACYT, a través del Fondo Competitivo de Desarrollo Tecnológico Agroalimentario, AGROCYT. Este proyecto se desarrolló con el apoyo del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, MAGA, específicamente a través de la Unidad de Normas y Regulaciones.

Fueron muchas las personas que contribuyeron con el éxito de este proyecto; algunas de ellas continuaron trabajando en esta área a pesar de los cambios políticos y laborales; otras, se dedicaron a otras actividades. Quiero agradecer especialmente a la Licenciada Margarita Palmieri, cuyo apoyo y dirección incondicionales fueron indispensables para el desarrollo del proyecto y la culminación de este trabajo de graduación. También quiero agradecer a Silvia Sosa, José Miguel Seijas, Ana Catalán y Lisbeth Paniagua, quienes trabajaron en el proyecto en mención y cuya ayuda en el laboratorio y giras de campo fue muy valiosa. Del MAGA, quiero agradecer el apoyo de los Ingenieros Víctor Hugo Guzmán, Rubén Estrada, Luis Vides, Álvaro Salazar, Aníbal Pérez, Otto Lavagnino y Héctor Solís.

Finalmente, pero no menos importante, quiero extender un agradecimiento muy especial a mi esposa, Ana Isabel Lucero, y a mis padres por haberme apoyado durante todo el tiempo que me tomó completar este trabajo. Agradezco a toda mi familia y amigos, por haber estado a mi lado durante este paso tan importante en mi vida.

ÍNDICE

PREFACIO.....	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICAS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
A. Fitoplasmas.....	3
B. El amarillamiento letal del cocotero	6
C. Validación de pruebas diagnósticas.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. OBJETIVOS	23
A. Generales.....	23
B. Específicos.....	23
V. HIPÓTESIS	24
VI. MÉTODOS	25
A. Toma de muestras	25
B. Extracción de ácidos nucleicos	25
C. Reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero	27
D. Caracterización de fitoplasmas por polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción, RFLP.....	30
E. Análisis de resultados	31
VII. RESULTADOS	33

A. Muestras recolectadas y su ubicación geográfica	33
B. Validación de las pruebas de PCR	34
C. Caracterización molecular de algunos fitoplasmas encontrados por medio de RFLP	35
VIII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIONES.....	47
X. RECOMENDACIONES	48
XI. LITERATURA CITADA.....	49
XII. APÉNDICE	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Comparación entre las características celulares de los espiroplasmas y micobacterias cultivables y los fitoplasmas	4
Cuadro 2.	Grupos de fitoplasmas conocidos hasta ahora	6
Cuadro 3.	Sistemas de evaluación del avance del amarillamiento letal en palmas de coco, <i>Cocos nucifera</i> L.	9
Cuadro 4.	Iniciadores usados para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del Cocotero	17
Cuadro 5.	Forma usual de presentar los resultados de una validación para pruebas diagnósticas.....	20
Cuadro 6.	Constituyentes de la mezcla de reacción de PCR para la detección universal de fitoplasmas.	27
Cuadro 7.	Constituyentes de la mezcla de reacción de PCR anidada para la detección de fitoplasmas del grupo del ALC (Grupo IV).....	28
Cuadro 8.	Constituyentes de la mezcla de reacción de PCR para la detección específica del fitoplasmas causante del ALC	28
Cuadro 9.	Pruebas de laboratorio usadas para el diagnóstico del ALC.....	30
Cuadro 10.	Características generales de las enzimas de restricción usadas para el análisis de RFLPs de las muestras de fitoplasmas amplificados	31
Cuadro 11.	Validación de la PCR para fitoplasmas en general	34
Cuadro 12.	Validación de la PCR específica para ALC	34
Cuadro 13.	Comparación entre sensibilidad y especificidad para las dos pruebas diagnósticas evaluadas	34
Cuadro 14.	Probabilidades posprueba de enfermedad.....	35
Cuadro 15.	Descripción de las muestras analizadas para RFLP	35
Cuadro 16.	Matriz de patrones de fragmentos de digestión	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árbol filogenético de los fitoplasmas	5
Figura 2.	Sintomatología del amarillamiento letal del cocotero en <i>Cocos nucifera</i> L.	10
Figura 3.	<i>Myndus crudus</i> Van Duzee	12
Figura 4.	Localización genómica de los iniciadores usados para el diagnóstico del ALC en el gen rRNA	17
Figura 5.	Resultados de PCR para fitoplasmas en general.....	29
Figura 6.	Resultados de nested PCR para fitoplasmas del grupo IV	29
Figura 7.	Resultados de PCR específica para ALC.....	30
Figura 8.	Ubicación geográfica de las muestras recolectadas	33
Figura 9.	Ubicación geográfica de las muestras usadas para el análisis por RFLPs.....	36
Figura 10.	Patrón de digestión del producto P1/P7 con <i>TaqI</i>	37
Figura 11.	Patrón de digestión del producto P1/P7 con <i>RsaI</i>	38
Figura 12.	Patrón de digestión del producto P1/P7 con <i>HinfI</i>	39
Figura 13.	Patrón de digestión del producto P1/P7 con <i>AluI</i>	40
Figura 14.	Dendrograma construido a partir de los largos de los fragmentos obtenidos después de digerir los productos de PCR con 4 enzimas de restricción	42

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Ubicación geográfica de las muestras recolectadas.	33
Gráfica 2.	Ubicación geográfica de las muestras usadas para el análisis por RFLPs.....	36

RESUMEN

Este trabajo de graduación se elaboró como parte de un proyecto mayor de investigación en el Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala. Este estudio tuvo dos objetivos principales: la validación de dos pruebas de laboratorio para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero (ALC) y la caracterización de variantes del fitoplasma que causa la enfermedad por marcadores moleculares. Se analizaron 52 muestras de cocos provenientes de los departamentos de Izabal y Petén. Las pruebas de diagnóstico estudiadas fueron pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): PCR anidada (prueba de referencia), PCR para fitoplasmas en general y PCR específica para ALC. No se encontró una diferencia significativa entre los resultados obtenidos con ambas pruebas y se mostró que las dos tienen una sensibilidad cercana al 80% y una especificidad cercana al 100%. Esto implica que, usando estas pruebas, los resultados positivos son indicadores certeros de la presencia del ALC, pero los negativos no implican que la enfermedad esté ausente. También se hizo una caracterización molecular de 8 muestras positivas por polimorfismo de largo de fragmentos de restricción. Pareciera ser que los fitoplasmas causantes del ALC en Guatemala pertenecen al mismo grupo que los causantes del ALC en la región Caribe, aunque se identificó dos grupos de fitoplasmas con 3 posibles variantes. Se recomienda el uso de la PCR general como prueba de diagnóstico para investigaciones futuras, la PCR específica como prueba rutinaria de tamizaje y analizar al menos 23 muestras positivas para futuros estudios de caracterización molecular.

ABSTRACT

The results presented in this work were part of a larger project executed at the Crop Protection Laboratory at the Del Valle University in Guatemala. The main objectives of this study were to validate two different diagnostic tests for the coconut lethal yellowing (LY) and to characterize the phytoplasmas associated with the disease using molecular markers. 52 coconut samples from the Izabal and Petén regions were analyzed. The validated diagnostic tests, namely universal PCR for the detection of phytoplasmas and specific PCR for LY, were based on the polymerase chain reaction principle. Both test results were compared using the nested PCR results as the reference. No statistical significant difference was observed for the specificity and sensibility of both tests. The sensibility of the tests was about 80%, while the specificity was close to 100%. These results suggest that a positive result using both tests is a clear indicator of the presence of the disease; a negative result, however, is not a good indicator of the absence of the disease. The analysis of 8 samples using amplification fragment length polymorphism suggest that the phytoplasmas associated with the LY in Guatemala belong to the same group of the phytoplasmas that cause the classical LY in the Caribbean, although there might be 3 possible subgroups. It is recommended that the universal PCR method should be used for future investigations. The specific PCR could be useful as a screening test. For future studies on the diversity of phytoplasmas associated with LY, at least 23 samples should be analyzed.

I. INTRODUCCIÓN

Los cocoteros son comunes en las costas guatemaltecas, pero a partir del año 2001 se empezó a percibir el efecto de la desaparición de una gran cantidad de palmas en costa atlántica de Guatemala. Esta disminución se debió principalmente a la expansión del amarillamiento letal del cocotero (ALC), una enfermedad causada por fitoplasmas. Hasta ese momento se sabía poco sobre su importancia económica y cultural para el país, pero los efectos adversos del ALC motivaron a las autoridades del país a diseñar estrategias para su control.

Para que un plan de control de la enfermedad sea efectivo es indispensable contar con un método de diagnóstico confiable que, además de detectar la enfermedad, permita determinar si los fitoplasmas causantes del ALC en Guatemala tiene alguna diferencia genética con los que se encuentran en la región. Una herramienta diagnóstica como esta puede ayudar a vigilar la propagación de la enfermedad, a buscar hospederos alternos y vectores del patógeno, y a identificar variedades de cocoteros resistentes al amarillamiento letal del cocotero.

En esta investigación se validaron dos técnicas de detección por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicamente, un método de detección universal para fitoplasmas y uno específico para ALC. Además, se usó el método de polimorfismos de largo de fragmentos de restricción (RFLP) con 4 enzimas de restricción distintas. Las dos hipótesis de este estudio fueron: a) no existe diferencia significativa entre los dos métodos de PCR para el diagnóstico del ALC y b) en Guatemala existe más de una variedad del fitoplasma causante del ALC.

Este estudio incluyó 52 muestras de aserrín de cocoteros recolectadas en los departamentos de Izabal y Petén entre el año 2003 y 2006, como parte del proyecto “Vigilancia epidemiológica del amarillamiento letal del cocotero en los departamentos de Izabal y Petén: búsqueda de medidas locales para su control”, un proyecto financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONACYT, a través del Fondo Competitivo de Desarrollo Tecnológico Agroalimentario, AGROCYT, con el apoyo del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, MAGA.

Ambas pruebas son altamente específicas y moderadamente sensibles, por lo tanto, un resultado positivo prácticamente descarta la posibilidad de que la muestra esté sana, pero los resultados negativos no implican necesariamente la ausencia de la enfermedad. Además, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos por el método de detección general para fitoplasmas y el específico para ALC, lo cual sugiere que se puede usar cualquiera de estas pruebas para un programa de vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

Los resultados del análisis por RFLP de las muestras sugieren que, en Guatemala, la principal variedad de ALC podría ser la misma que se encuentra en toda la región de Yucatán y El Caribe (ALC clásico), pero el análisis con la enzima de restricción *RsaI* parece indicar que existe, al menos, una variedad más del fitoplasma.

Por lo tanto, para futuros trabajos de investigación se recomienda el uso de la PCR para fitoplasmas en general como técnica de diagnóstico del ALC debido a que su producto puede ser usado para otras aplicaciones, entre ellas, la confirmación de resultados negativos por PCR anidada o la caracterización de fitoplasmas por RFLP. Para trabajos de rutina, se recomienda el uso de la PCR específica para ALC como técnica de diagnóstico por ser un poco más específica y rápida que la PCR general.

II. MARCO TEÓRICO

A. Fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias que atacan el floema de las plantas y carecen de pared celular. En la década de los sesentas se reportó la presencia de organismos similares a micobacterias en microfotografías electrónicas de cortes de células cribosas de plantas con síntomas de amarillamiento (Doi *et al.* 1967). Hasta esta fecha se creía que los agentes etiológicos de estas enfermedades eran virus porque se había observado la presencia de partículas virales en algunas muestras, pero no en forma consistente. A partir del reporte de Doi y su grupo de investigadores japoneses, se acuñó el término MLO (*Mycoplasma-like organism*) para referirse a este grupo de bacterias. Desde esta fecha se ha reportado la presencia de fitoplasmas en más de 300 especies vegetales alrededor del mundo (Jones 2002).

Las enfermedades provocadas por fitoplasmas se caracterizan por una malformación de las flores, desórdenes en el crecimiento de las plantas y amarillamiento o marchitez. En general estos síntomas se denominan “síntomas de amarillamiento” (Seemüller *et al.* 1998).

Los fitoplasmas habitan los elementos cribosos de los floemas; son transmitidos por insectos chupadores del orden Homoptera. Existen similitudes celulares entre los fitoplasmas, las micobacterias que causan enfermedades en humanos y animales y otras bacterias fastidiosas (ver Cuadro 1), sin embargo, difieren en que hasta ahora no ha sido posible el cultivo in Vitro de los fitoplasmas en un medio libre de células. Por lo tanto, la clasificación de estos organismos se basó por mucho tiempo en características biológicas como los síntomas que provocan en las plantas que afectan, su rango de huéspedes y las relaciones que mantienen con los insectos vectores. Los estudios moleculares más recientes han ayudado a mejorar el diagnóstico de las enfermedades vegetales debidas a fitoplasmas, pero también han hecho posible el estudio de las relaciones genéticas entre los fitoplasmas conocidos (Jones 2002).

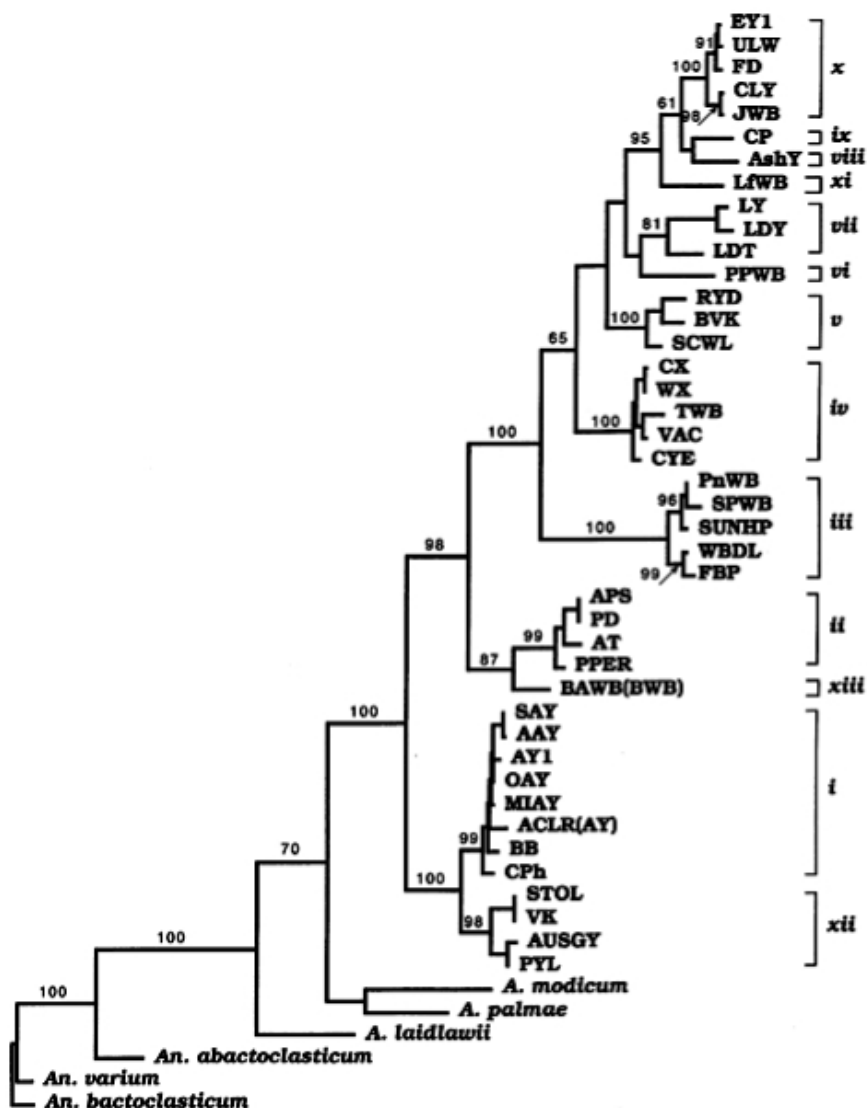
Cuadro 1. Comparación entre las características celulares de los espiroplasmas y micobacterias cultivables y los fitoplasmas

	Espiroplasmas y micobacterias cultivables	Fitoplasmas
Material genético	ADN circular de doble banda	
Tamaño del genoma (kb)	680 – 1,600	500 – 1,180
Abundancia de G+C	bajo	23 – 29%
Presencia de plásmidos	Sí	Algunos
Genes para reparación de ADN	No	No
Genes para síntesis de paredes celulares	No	No
Genes para síntesis de aminoácidos, esteroides y lípidos	Carecen de algunos	Carecen de algunos
Cultivables	Sí	No

(adaptado de Christensen *et al.* 2005)

La relación genética de los distintos fitoplasmas (ver Figura 1) se ha estudiado principalmente a partir de la comparación del gen que codifica el ARN de la fracción 16S de sus ribosomas (16S ARNr); también se ha estudiado la similitud entre algunas proteínas ribosomales. En la actualidad se conocen 14 grupos de fitoplasmas que atacan a cientos de plantas (ver Cuadro 2). Tanto las micobacterias como los fitoplasmas se clasifican dentro de la clase *Mollicutes* (Lee *et al.* 1998, Jones 2002, Seemüller *et al.* 1998).

Figura 1. Árbol filogenético de los fitoplasmas



Árbol filogenético construido por análisis de parsimonia de las secuencias completas del gen 16S ARNr de 42 fitoplasmas, 3 especies de *Achleplasma* spp. (A.), 3 de *Anaeroplasma* spp. (An.) y usando *Anaeroplasma abactoclasticum* como grupo externo. La longitud de las ramas es proporcional al número de transformaciones de estados característicos inferidos. Los subclados filogenéticos inferidos se muestran a la derecha. Los fitoplasmas mostrados son: Elm yellows – V-A (EY1), Elm witches'-broom – V-A (ULW), Flavescence dorée – V-C (FD), Cherry letal yellows – V-B (CLY), Jujube witches'-broom – V-B (JWB), Clover proliferation – VI-A (CP), Ash yellows – VII-A (AshY), Loofah witches'-broom – VIII-A (LfWB), Coconut letal yellows – IV-A (LY), Yucatán coconut letal decline – IV-B (LDY), Tanzanian coconut letal decline – IV-C (LDT), Pigeon pea witches'-broom – IX-A (PPWB), Rice yellow dwarf – XI-A (RYD), Leafhopper-borne – XI-C (BVK), Sugarcane white leaf – XI-B (SCWL), X-disease Canada – III-A (CX), X-disease California – III-A (WX), Tsuwabuki witches'-broom – III-B (TWB), Vaccinium witches'-broom – III-B (VAC), Clover yellow edge – III-B (CYE), Peanut witches'-broom – II-A (PnWB), Sweet potato witches'-broom – II-A (SPWB), Sunhemp witches'-broom – II-A (SUNHP), Witches'-broom of lime – II-B (WBDL), Faba bean phyllody – II-C (FBP), Spartium witches'-broom – V-C (APS), Pear decline – X-C (PD), Apple proliferation – X-A (AT), European stone fruit yellows – X-B (PPER), Black alder witches'-broom – X-E (BAWB), Western aster yellows – I-B (SAY), American aster yellows – I-B (AAY), Maryland aster yellows – I-B (AY1), Onion yellows – I-B (OAY), Michigan aster yellows – I-B (MIAY), Apricot chlorotic leaf roll – I-F (ACLR), Tomato big bud – I-A (BB), Clover phyllody – VI-A (CPh), Stolbur – XII-A (STOL), Grapevine yellows – XII-A (VK), Australian grapevine yellows – XII-B (AUSGY), Phormium yellow leaf – XII-B (PYL). (Lee *et al.* 1998)

Cuadro 2. Grupos de fitoplasmas conocidos hasta ahora

Grupo	Nombre	Subgrupos	Distribución mundial
16Sr-I	Aster yellows	6	Norteamérica, Europa, Japón, China
16Sr-II	Peanut witches'-broom	4	China, Tailandia, Península Arábiga, Sudán, Australia
16Sr-III	X-disease	8	Norteamérica, Europa, Japón
16Sr-IV	Coconut lethal yellows	3	Norteamérica, Caribe, África
16Sr-V	Elm yellows	3	Norteamérica, Europa, China,
16Sr-VI	Clover proliferation	1	Norteamérica
16Sr-VII	Ash yellows	1	Nueva York
16Sr-VIII	Loofah witches'-broom	1	Taiwán
16Sr-IX	Pigeon pea witches'-broom	1	Florida
16Sr-X	Apple proliferation	5	Europa
16Sr-XI	Rice yellow dwarf	3	India, Tailandia, Alemania
16Sr-XII	Stolbur	2	Europa, Australia, Nueva Zelanda
16Sr-XIII	Mexican periwinkle virescence	2	México, Florida
16Sr-XIV	Bermudagrass white leaf	1	Tailandia, Italia

(Lee *et al.* 1998)

B. El amarillamiento letal del cocotero

El amarillamiento letal del cocotero, ALC, es una enfermedad que ataca a más de 33 especies de palmáceas, incluida la palma del coco (*Cocos nucifera* L.). La enfermedad es causada por una bacteria sin pared celular perteneciente al grupo de los fitoplasmas; estas bacterias se encuentran en mayor cantidad en los tejidos cribosos del floema y son transmitidas por insectos vectores de la familia Homoptera. Una característica importante de los fitoplasmas es que aún no ha sido posible su cultivo en medios libres de células (Arellano y Oropeza 1995).

Debido a que no ha sido posible aislar a los fitoplasmas de plantas enfermas y cultivarlos, su clasificación ha sido difícil. Hasta ahora la mejor técnica para identificarlos ha sido su caracterización molecular. Los estudios realizados con la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad 16S del ARN ribosomal (16S ARNr) han permitido la clasificación de los fitoplasmas en más de 12 grupos. El fitoplasma causante del ALC en la región del Caribe pertenece al grupo 16SrIV (Davis and Sinclair 1998).

Los principales vectores de los fitoplasmas son homópteros de las familias Cicadellidae y Fulgoromorpha. Para el ALC se reconoce al *Myndus crudus* como el vector en la región del Caribe; sin embargo, existen observaciones tanto en campo como en laboratorio que sugieren la posible existencia de otros vectores involucrados en la transmisión del ALC (Arellano y Oropeza 1995).

Los primeros registros que se tienen de cocoteros con síntomas similares a los que distinguen al ALC datan de 1834 y provienen de las islas Gran Caimán. En años posteriores se observaron casos similares en otras islas del Caribe. No se puede asegurar que dichos casos fueran debidos al ALC ya que la sintomatología puede confundirse con la causada por otras enfermedades. La primera epidemia reportada de ALC en el Caribe ocurrió en Jamaica en la década de 1960. Poco después aparecieron brotes de la enfermedad en los cayos de Florida. La dispersión de la enfermedad fue lenta y el número de casos nuevos pareció desaparecer (Arellano y Oropeza 1995; Eden-Green 1995).

Cuando aparecieron los primeros brotes de la enfermedad se desconocía el agente etiológico del ALC. Los primeros estudios descartaron la posibilidad de que se tratara de deficiencias nutricionales, cambios ambientales y ataques por distintas plagas. Las observaciones sobre los patrones de dispersión sugerían que el ALC era una enfermedad causada por algún agente infeccioso y transmitida por un vector aéreo. Para principios de 1970 el ALC apareció en el territorio continental de Florida, y en esta misma década se logró determinar, por microscopía electrónica, que el agente causal del ALC podría ser un organismo similar a micoplasmas (MLO, por sus siglas en inglés). Esta hipótesis fue apoyada por el hecho de que los síntomas del ALC podían revertirse con el uso de antibióticos tetraciclínicos (como la oxitetraciclina, o terramicina), pero no por penicilinas (Eden-Green 1995).

Es de notar que en la década de 1950 Jamaica introdujo una variedad de cocoteros conocida como "Enano Malayo". Esta variedad resultó ser altamente resistente al ALC y motivó la creación de un banco de germoplasma de cocotero a principios de 1960. La creación de este banco estuvo a cargo del "Coconut Industry Board". El descubrimiento de un posible agente etiológico y el descubrimiento de variedades de cocotero resistentes al ALC fomentaron la investigación de la enfermedad. Jamaica y Florida iniciaron la época de investigación de la enfermedad en los años 80 (Eden-Green 1995).

Para 1995 el ALC ya estaba bien establecido en Haití y la República Dominicana, las islas Bahamas, la península de Yucatán y Belice. En 1998 la enfermedad ya estaba presente y activa en Honduras (Eden-Green 1995). En la actualidad la enfermedad se encuentra activa en toda la región del Caribe, incluyendo la costa atlántica de Guatemala. Las primeras sospechas de plantas con ALC en Guatemala son de 1999 – 2000. La presencia del ALC se confirmó en el año

2001 cuando el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) realizó un monitoreo a nivel nacional en busca de la enfermedad. Algunas de las muestras colectadas en el año 2001 fueron analizadas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), México, y en el Zamorano, Honduras. Ese mismo año se implementó la técnica de detección del ALC en el Laboratorio de Virología Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala y los resultados fueron confirmados en el país. A partir del año 2002 han continuado los estudios sobre el ALC en Guatemala.

1. Sintomatología. El primer síntoma visual del ALC es la caída prematura de frutos en cualquier estado de desarrollo (Figura 2 - 1); los frutos caídos se caracterizan por tener una mancha necrótica debajo del periantio, el cual se puede separar fácilmente del fruto. Luego las inflorescencias nuevas se ennegrecen y son visibles al momento en que salen de la espata. Las primeras inflorescencias tienen una necrosis parcial, pero a medida que la enfermedad progresa la necrosis cubre una mayor área de las inflorescencias nuevas. Las inflorescencias tienden a secarse y a corrugarse, un síntoma que Oropeza denominó como "garra de león" (Figura 2 - 2), el cual sirve mucho para el diagnóstico seguro de ALC, pero puede manifestarse en forma atípica y no puede ser visto en plantas demasiado jóvenes que no produzcan inflorescencias (Arellano y Oropeza 1995; Howard and Harrison 2000).

El amarillamiento de las hojas suele empezar cuando hay dos o más inflorescencias necróticas. La decoloración de las hojas empieza por las hojas más viejas (inferiores) hacia las hojas más jóvenes (superiores, Figura 2 - 3 y 4). El amarillamiento de las hojas debido al ALC ocurre a una velocidad mayor que el debido a la senescencia natural de la planta. Hay ocasiones en que una hoja joven se amarillenta antes que el resto, a la cual se le denomina "hoja bandera". La hoja bandera es muy importante en el diagnóstico de ALC por sintomatología, pero no es un síntoma que se observe en todos los casos (Arellano y Oropeza 1995; Howard and Harrison 2000).

Las hojas amarillentas se secan, se tornan de color café claro y quedan colgando del tronco durante algunos días antes de caer. En la última etapa de la enfermedad la "hoja asta", en el extremo superior del tronco muere como consecuencia del colapso del vástago. La muerte del vástago puede ocurrir antes de la caída de todas las hojas, pero la muerte del vástago es equivalente a la muerte de la planta, y pocos días después queda únicamente el tronco (Figura 2 - 5) (Arellano y Oropeza, 1995; Howard and Harrison 2000).

En África se han observado enfermedades muy similares al ALC que también atacan palmeras. El Decaimiento Letal (DL) se ha visto en Ghana, Camerún, Togo y Nigeria en donde la

enfermedad se conoce como “Marchitez del Cabo St. Paul”, “Enfermedad de Kribi”, “Kaincopé” y ‘Enfermedad de Awka” respectivamente. En Tanzania la enfermedad activa se conoce como Enfermedad Letal (Eden-Green 1995).

Con base en observaciones sobre el progreso de la enfermedad, Eden-Green y McCoy desarrollaron independientemente dos sistemas para evaluar el grado de avance del ALC en cocoteros, de los cuales el más usado es el de Eden-Green (Arellano y Oropeza 1995). Dichos sistemas de evaluación se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Sistemas de evaluación del avance del amarillamiento letal en palmas de coco, *Cocos nucifera* L.

Sistema de evaluación		
Eden-Green	McCoy <i>et al.</i>	Síntomas
Asintomático	0	Sana o en incubación
Temprano	1	Caída de fruto únicamente
	2	Una inflorescencia necrótica
	3	Dos o más inflorescencias necróticas
Intermedio	4	Amarillamiento de las hojas inferiores únicamente
Avanzado	5	Amarillamiento de las hojas inferiores e intermedias
	6	Todas las hojas amarillas, hoja asta dorada
Muerte	7	Hoja asta muerta, quedan algunas hojas verdes
	8	Hoja asta muerta, todas las hojas amarillas
	9	Tronco sin hojas (“poste telefónico”)

(Arellano y Oropeza 1995)

Figura 2. Sintomatología del amarillamiento letal del cocotero en *Cocos nucifera* L.



Además de estos síntomas superficiales, las raíces de palmas afectadas por ALC se pudren a medida que la enfermedad avanza. El crecimiento de las palmeras se ve afectado también; aunque los cambios en la velocidad de crecimiento no son tan obvios, parece ser que esta aumenta significativamente 80 días antes de la aparición de los primeros síntomas y a partir de ese momento disminuye gradualmente hasta que el crecimiento se detiene completamente 50 días después (Arellano y Oropeza 1995).

Las plantas afectadas por el ALC sufren diversos cambios fisiológicos durante el avance de la enfermedad. La apertura estomatal de las hojas medias a medio día, por ejemplo, se reduce de un 82% a un 2% a medida que la enfermedad avanza. El ALC no sólo reduce la conductancia estomatal promedio en las hojas del cocotero, sino que también suprime la fluctuación normal diaria de esta función. La conductancia estomatal va disminuyendo a medida que la enfermedad avanza, y se suprime por completo al finalizar el estadio número 3. El transporte floemático también es alterado. En las inflorescencias, el flujo de líquidos a través del floema se reduce drásticamente desde el inicio de la enfermedad; en el tronco, por el contrario, el flujo aumenta durante los primeros estadios y se reduce cuando inician los síntomas intermedios. Ocurren otros cambios importantes en la fisiología de las plantas afectadas por ALC, y dichos cambios sugieren que el fitoplasma causante de la enfermedad altera el equilibrio de reguladores vegetales del crecimiento. Aún no está claro el mecanismo a través del cual sucede el desequilibrio en los reguladores del crecimiento (Arellano y Oropeza 1995).

El período de incubación del ALC parece ser de aproximadamente 210-450 días en palmas adultas y de 240-270 días en palmas jóvenes. La muerte de las palmeras ocurre 3-6 meses después de la aparición de los primeros síntomas; si la palma no muere después de 6 meses se puede sospechar que los síntomas se deben a un agente distinto al fitoplasma causante del ALC (Arellano y Oropeza 1995; Howard and Harrison 2000).

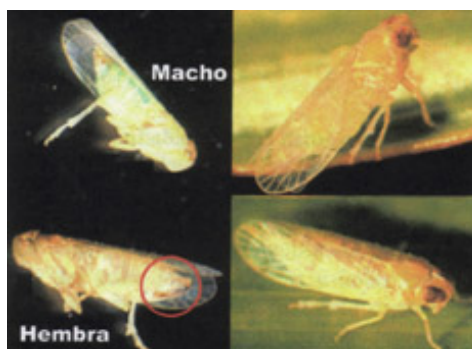
2. Epidemiología. Se carece de técnicas experimentales para inocular el fitoplasma causante del ALC en plantas sanas, por lo tanto, la información sobre el período de latencia de la enfermedad se ha estimado a partir de observaciones en campo. En plantas adultas, este tiempo se estima notando el tiempo que toma la aparición de síntomas en plantas que se localizan cerca de focos primarios de infección; las plantas jóvenes se pueden transportar hacia áreas afectadas y luego fuera de ellas para observar el tiempo necesario para que la enfermedad se manifieste. Gracias a estas observaciones se ha estimado que en las plantas jóvenes el período de latencia es de 3 a 9 meses, mientras que en las plantas adultas es de 7 a 15 (Eden-Green 1995).

Se tiene evidencia de que la aparición de los síntomas primarios es mayor durante los meses más fríos de otoño que en el resto del año. En Ghana se ha visto algo similar. No está claro si la aparición de los síntomas se deba a un período favorable para la adquisición de la enfermedad en meses anteriores o que las condiciones climáticas son más favorables para la aparición de síntomas. A pesar de que los estudios sobre la transmisión del ALC son difíciles, algunos experimentos realizados en Jamaica sugieren que algunas épocas son más favorables para la transmisión que otras (Eden-Green 1995).

El vector del ALC es un homóptero de la familia Cixiidae llamado *Myndus crudus* (Van Duzee). Cuando, con técnicas de microscopía electrónica, se encontraron MLO's en muestras de palmas con síntomas de ALC, se inició la búsqueda de posibles vectores de la enfermedad. Al inicio se buscaron homópteros del suborden Auchenorrhyncha ya que se había encontrado que algunas especies de este suborden eran vectores de fitoplasmas en otras especies vegetales. En Jamaica y Florida se iniciaron los primeros estudios de vectores en plantaciones de cocoteros, y de todas las especies estudiadas el *M. crudus* fue el único capaz de transmitir ALC; sin embargo, la eficiencia con que este insecto transmite la enfermedad en pruebas de invernadero es baja (Arellano y Oropeza 1995; Eden-Green 1995; Howard and Harrison 2000; Howard and Oropeza 1998).

A pesar de que *Myndus crudus* (ver Figura 3) ya está identificado como el principal vector en Florida y Jamaica (Howard and Oropeza 1998), existe la posibilidad de que haya otras especies implicadas en la transmisión del ALC en la región Caribe. *M. crudus* es el insecto más abundante que se ha relacionado con plantaciones enfermas de palmeras en Florida y países caribeños, pero en segundo lugar se ha observado una gran población de *Cedusa inflata* (Hemiptera : Auchenorrhyncha : Derbidae) (Howard *et al.* 2001). En Guatemala está presente *Myndus crudus*, pero aún se desconoce si es el principal vector del ALC y si hay otros insectos asociados.

Figura 3. *Myndus crudus* Van Duzee



(Cortesía de M. M. Doyle)

Las ninfas de *Myndus crudus* se desarrollan alrededor de la superficie del suelo sobre pastos o juncos y los adultos se alimentan de palmeras. Se ha reportado al menos 37 especies de gramíneas (Graminae) y 4 especies de juncos (Cyperaceae) que podrían ser huéspedes para las ninfas de *M. crudus*, de especial interés es la grama de San Agustín, *Stenotaphrum secundatum*, muy usada como césped ornamental. En 1978 se observó que las ninfas se suelen encontrar debajo de pedazos de fibra de coco (Howard and Oropeza 1998).

3. Control. Se ha intentado controlar al ALC usando distintos enfoques: (i) control de vectores; (ii) control químico de la enfermedad; (iii) saneamiento; (iv) control cultural y cuarentenas; y, finalmente, (v) siembra de variedades de cocotero resistentes.

El control de vectores usando insecticidas no ha sido exitoso debido al complejo ciclo de vida de los insectos y al alto costo de los productos químicos. Es posible que un manejo adecuado de malezas sea una solución más práctica para el control de los insectos en plantaciones comerciales. El control químico de la enfermedad se basa en el uso de antibióticos tetraciclínicos. Estos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas en los fitoplasmas y se ha comprobado su efectividad para revertir la sintomatología en plantas enfermas, pero al interrumpirse el tratamiento la planta vuelve a enfermar. Además de este inconveniente, el tratamiento es bastante costoso y no resulta práctico para plantaciones comerciales. El saneamiento consiste en tumbar las palmas enfermas con el fin de reducir la fuente de inóculo para los vectores. Esta medida puede resultar efectiva para disminuir el tiempo de propagación de la enfermedad, pero no ha sido efectiva para erradicarla (Been 1995; Howard and Harrison 2000).

Las medidas de control cultural, cuarentenario y siembra de variedades resistentes son las medidas más útiles que se han aplicado para el control del ALC en otros países afectados. El control cultural consiste en la concientización de la población en general y en la siembra de otras especies de palmáceas con fines ornamentales en zonas turísticas afectadas por el ALC.

El uso de plantas resistentes es, hasta la fecha, la principal herramienta para el control del ALC. Se conoce poco sobre la naturaleza genética de la resistencia de algunas variedades e híbridos de cocoteros frente al amarillamiento letal; esto se debe, en parte, a que no ha sido posible cultivar in vitro a los fitoplasmas y a que la identificación de las variedades resistentes de *Cocos nucifera* es lenta (Been 1995; Howard and Harrison 2000; Eden-Green 1995; Zizumbo and Arellano 1995).

La técnica que se usó durante mucho tiempo para detectar un material posiblemente resistente es observar las plantas que parecen sanas dentro de zonas donde el ALC se encuentra muy activo. Sin embargo, la comprobación que un material es suficientemente resistente para ser usado comercialmente requiere de un análisis muy riguroso de los datos experimentales (Been, 1995).

Se sabe que la resistencia de las distintas variedades de cocoteros varía según la región en la que se encuentren plantados. No se sabe si las diferencias se deban a factores ambientales, bióticos o ambos. No se conoce una variedad que tenga una resistencia absoluta, y en los casos en que el ALC se manifiesta en dichas variedades lo hace con la misma severidad con que lo hace en las especies menos tolerantes. A pesar de que se han relacionado algunas características fisiológicas de las palmeras con su grado de resistencia, la evidencia observada hasta el momento parece indicar que la naturaleza de la resistencia de algunas variedades opera en el momento de la infección y no durante la multiplicación del fitoplasma causante del ALC (Eden-Green 1995; Howard and Harrison 2000).

4. Diagnóstico. La principal complicación en el diagnóstico del ALC, y de los fitoplasmas en general, es el bajo título de patógenos en los tejidos. Algunas plantas, como la “quinceañera” (*Catharanthus roseus*) pueden tener títulos de hasta 1.5×10^9 células de fitoplasmas por gramo de tejido, mientras que en la mayoría de plantas la cantidad oscila entre 340 y 3.7×10^4 células por gramo (Berges *et al.* 2000). La baja concentración de células en tejidos vegetales infectados y la dificultad de cultivar a los fitoplasmas *in vitro* han dificultado la producción de anticuerpos monoclonales que permitan el diseño de técnicas serológicas para su diagnóstico. Aunque se ha logrado producir anticuerpos monoclonales contra algunos fitoplasmas como los del “aster yellows”, “clover phyllody”, “flavescence dorée” y “elm yellows” (Boudon-Padieu *et al.* 1989; Errampalli *et al.* 1989), estos se han usado muy limitadamente en algunas técnicas de ELISA, blots de tejidos, microscopía electrónica inmovilizante e inmunofluorescencia (Jones 2002).

Las técnicas de detección del amarillamiento letal del Cocotero se pueden dividir en dos grupos principales: Métodos convencionales y técnicas moleculares (Harrison *et al.* 1995).

a. Métodos convencionales. El método más simple para el diagnóstico del ALC es la observación cuidadosa de la sintomatología de la enfermedad. Ningún síntoma por si solo tiene valor diagnóstico debido a que otras enfermedades pueden causar síntomas similares; la observación del orden cronológico con que aparecen los síntomas tiene un valor diagnóstico mayor. Otro problema con el diagnóstico basado en la sintomatología es que puede complicarse por la carencia de inflorescencias en plantas jóvenes, las diferencias en los patrones de

amarillamiento según las variedades de las palmeras y síntomas muy similares provocados por otras enfermedades de cocoteros, especialmente la del Anillo Rojo causada por un nemátodo y síntomas de necrosis debidos a hongos como *Phytophthora palmivora*. (Harrison *et al.* 1995).

La microscopía es el segundo método convencional. Los fitoplasmas pueden ser detectados en el floema de las plantas sintomáticas por medio de microscopía electrónica de transmisión (Harrison *et al.* 1995; Thomas 1979) o por medio de microscopía de luz con tinción fluorescente de DAPI (4'-6' diamidino-2-fenilindol), un tinte que se une al ADN y fluoresce bajo luz UV (Deeley *et al.* 1979; Seemüller 1976). Las técnicas de microscopía no son específicas para un fitoplasma en particular, por tanto, no son útiles para diagnosticar el ALC; a pesar de ello pueden usarse como pruebas preliminares y confirmatorias de cuando se sospecha que el agente etiológico de una enfermedad es un fitoplasma (Harrison *et al.* 1995).

b. Hibridización con sondas de ADN. Las primeras herramientas de diagnóstico molecular fueron sondas de ADN obtenidas a partir de fragmentos del genoma de los fitoplasmas que fueron clonados en bacterias. Las sondas permitieron identificar y caracterizar una amplia gama de fitoplasmas, aun cuando su concentración en las plantas fuera baja. A principios de la década de 1990 se desarrollaron las primeras sondas de ADN específicas para ALC, con lo que avanzó considerablemente el estudio de la enfermedad (Harrison *et al.* 1992).

Las pruebas de hibridización se basan en el principio de la complementariedad del ADN. A nivel molecular el ADN es una doble hebra; cada una de las hebras está compuesta por subunidades conocidas como nucleótidos de las cuales se conocen 4 distintas: citosina (C), guanina (G), adenina (A) y timina (T). Al formarse la doble hebra la citosina puede aparearse únicamente con la guanina (C≡G) y la adenina con la timina (A=T). En las pruebas de hibridización se construyen secuencias conocidas de ADN que se marcan con átomos radioactivos, por ejemplo, conocidas como sondas. Las muestras de ADN de interés se fijan a una membrana, usualmente de nylon o nitrocelulosa, y se mezclan con las sondas bajo condiciones especiales. Si la muestra y la sonda son suficientemente complementarias habrá una unión fuerte entre ambas; de lo contrario la unión es tan débil que se rompe al momento de lavar la membrana con una solución de lavado. Ya que la sonda es marcada puede detectarse después del lavado usando una técnica de visualización apropiada según el marcador que se haya usado (Sambrook *et al.* 1989).

Las sondas de ADN han sido muy exitosas en la detección de fitoplasmas usando como muestra las bases de las hojas jóvenes. También se ha podido determinar la presencia del fitoplasma causante del ALC en una planta que no pertenece a la familia de las palmeras, *Pandanus utilis*, lo que apoya la hipótesis de que existen otros huéspedes alternos involucrados en la epidemiología del ALC. La detección de fitoplasmas en tejidos vegetales ha sido muy

exitosa, pero en los insectos no se ha podido demostrar el poder de detección de las pruebas de hibridación (Harrison *et al.* 1995). A pesar de la utilidad de las sondas de ADN para la detección de fitoplasmas y los estudios de relaciones genéticas entre ellos, la técnica de hibridación ha sido reemplazada en los últimos años por la reacción en cadena de la polimerasa (Jones 2002).

c. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Quizá el proceso biológico más importantes para la reproducción de una célula es la replicación de su material genético. Para sintetizar el ADN las células requieren tres elementos básicos: a) nucleótidos, los bloques fundamentales del ADN; b) una enzima que copie la información contenida en un templete de ADN de forma que los nucleótidos puedan ser unidos de manera correcta; y c) magnesio, un ión que vuelve más activa a la enzima. Las enzimas que las células usan para sintetizar ADN se conocen como ADN polimerasas (Henson y French 1993).

En principio la síntesis de ADN es bastante simple, y los elementos necesarios para su replicación pueden mezclarse *in vitro* para crear ADN a partir de una muestra. Para que la síntesis de ADN sea efectiva se requieren secuencias cortas de ADN conocidas como cebadores o iniciadores que marcan el sitio en donde la síntesis debe empezar. El primer paso es la desnaturalización del ADN muestra, que es básicamente la separación de las dos hebras; esto se logra aumentando la temperatura a aproximadamente 95°C. Después de que las hebras han sido separadas se baja la temperatura para que los iniciadores se puedan unir al ADN (40-50°C aproximadamente). El siguiente paso es la síntesis de ADN a partir de las secuencias iniciadoras, un proceso que se conoce como extensión. Este ciclo se puede repetir varias veces; en cada uno se amplifica en forma exponencial la sección de ADN comprendida entre las dos secuencias iniciadoras por lo que, en teoría, después de 30 ciclos se pueden obtener $2^{30} = 1,073,741,824$ copias a partir de solamente una molécula de ADN, por lo que la técnica se conoce como Reacción en Cadena de la Polimerasa. La mezcla de reacción de PCR se separa por electroforesis a través de un gel de agarosa para verificar que la sección amplificada tenga el tamaño esperado. El ADN del gel se puede teñir con bromuro de etidio, el cual fluoresce bajo luz UV, y se fotografía para tener un registro permanente (Henson y French 1993).

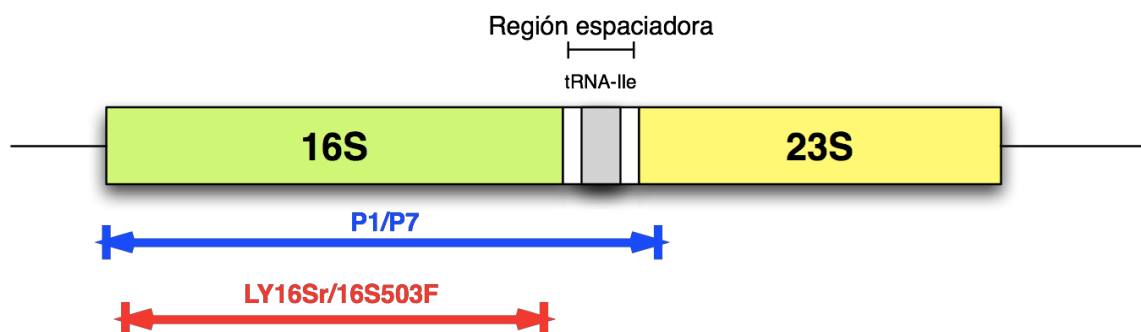
La técnica de PCR es más sensible que la de hibridación; se ha logrado detectar cantidades tan pequeñas como 5 picogramos (5×10^{-12} g) de ADN de fitoplasmas en tejidos vegetales y con ella se ha podido determinar la presencia de fitoplasmas en vectores. La especificidad de la PCR depende principalmente de las secuencias iniciadoras que se usen (Harrison *et al.* 1995; Henson y French 1993). Para el amarillamiento letal del Cocotero se han desarrollado varios iniciadores (Harrison *et al.* 1995; Schneider *et al.* 1995), los cuales se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Iniciadores usados para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal del Cocotero

Grado de especificidad	Iniciador	Secuencia (5'→3')	ADN amplificado y tamaño del fragmento
Fitoplasmas en general	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Gen 16S ARNr, inicio del gen 23S ARNr y región espaciadora (1.8 kb)
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
Grupo de amarillamiento letal	LY16Sr	CAGCAGCCGCGGTAATACATA	Secuencia dentro del gen 16S ARNr (1.4 kb)
	16S503F	GCTTACGCAGTTAGGCTGTC	
Amarillamiento letal	LYF1	TCGTTTTGATAATCTTTCATTTGAC	Secuencia de ADN específica del fitoplasma causante del ALC (1.07 kb)
	LYR1	CATATTTTATTTCTTTGCAATCTG	

(Harrison *et al.* 1995; Schneider *et al.* 1995)

Figura 4. Localización genómica de los iniciadores usados para el diagnóstico del ALC en el gen rRNA



(adaptada de Heinrich *et al.* 2001)

La sensibilidad de la detección de ALC por PCR aumenta significativamente con una técnica conocida como PCR anidada o “nested-PCR”. La técnica consiste en realizar una prueba de PCR con un par de iniciadores primarios. Una vez concluida esta primera amplificación se hace una segunda usando un par de iniciadores que reconozcan secuencias dentro del fragmento previamente amplificado, con lo que se obtiene una mayor sensibilidad y especificidad. Para el diagnóstico de ALC por PCR anidada se hace una amplificación primaria con los iniciadores

P1/P7 seguida de una segunda amplificación con el par LY16Sr/16S503F (Lee *et al.* 1994; Oropeza *et al.* 2001).

d. Polimorfismo por largo de fragmentos de restricción. El polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés: “Restriction Fragment Length Polymorfism”) es una de las técnicas más simples para la tipificación del ADN. La técnica consiste en digerir una muestra de ADN o producto de PCR con enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias específicas dentro del ADN y lo cortan, usualmente, dentro de la secuencia de reconocimiento. Los productos de la digestión se separan por electroforesis en geles de agarosa al 3 % o en geles de poliacrilamida y los patrones de bandas de cada individuo son usados para compararlos y construir un dendrograma a partir de las disimilitudes genéticas (Lee *et al.* 1993).

La disimilaridad genética (D) se calcula a partir del índice de similitud (S) de Nei-Li. Este índice se obtiene con la siguiente ecuación (Lee *et al.* 1993):

$$S = \frac{2 \times N_{xy}}{N_x + N_y}$$

Donde N_{xy} es el número de bandas en común para el individuo x y y; N_x es el número de bandas en total para el individuo x y N_y es el número de bandas en total para el individuo el número de bandas en total para el individuo y. A partir de S se puede calcular fácilmente D usando la siguiente ecuación (Lee *et al.* 1993):

$$D = 1 - S$$

El análisis por RFLP del gen 16S ARNr (subunidad 16S del ARN ribosomal) ha sido usado extensamente para estudiar las relaciones genéticas de los fitoplasmas (Firrao *et al.* 2004, Gundersen and Lee 1996; Harrison *et al.* 2002; Lee *et al.* 1993). Gracias a estos estudios se ha agrupado a los fitoplasmas en al menos 20 grupos principales (Seemüller *et al.* 1998). Un consenso reciente establece que una especie Candidatus fitoplasma (Ca. fitoplasma) se refiere a un individuo que presenta una secuencia única para el gen 16S rRNA (> 1,200 bp). Un individuo cuya secuencia presenta diferencias mínimas con una secuencia de referencia se dice que está relacionado con una especie de Candidatus, pero no que pertenece a ella. En general, una especie Ca. fitoplasma se puede describir como nueva si su secuencia 16S ARNr presenta <97.5 % de similitud con otras especies de fitoplasmas previamente descritas (Firrao *et al.* 2004).

C. Validación de pruebas diagnósticas

El propósito principal de las pruebas diagnósticas es mejorar la probabilidad de identificar correctamente a los individuos enfermos o sanos. Los estudios diagnósticos permiten evaluar el funcionamiento de una prueba clínica, por lo tanto, sus resultados son útiles en varios escenarios. Por ejemplo, podrían usarse para determinar la probabilidad de que una enfermedad esté presente en una población; también se pueden usar para evaluar la gravedad de una enfermedad, predecir el pronóstico de esta, o vigilar la respuesta a un tratamiento. No importando cuál sea el propósito del estudio diagnóstico, los resultados que se obtienen con él servirán siempre para calcular las probabilidades de un resultado o pronóstico (Greenberg *et al.* 2005).

1. Sensibilidad y especificidad. Existen varios parámetros que se han desarrollado para evaluar una prueba diagnóstica. Los más conocidos son la sensibilidad y la especificidad. Estos valores se expresan siempre en términos relativos con respecto a una prueba de referencia, es decir, aquella cuyos resultados sean aceptados como “reales” para un individuo (Greenberg *et al.* 2005).

La sensibilidad de una prueba es el porcentaje de individuos que poseen la enfermedad de interés y tienen un resultado positivo usando la prueba bajo estudio; la especificidad se refiere al porcentaje de individuos que se encuentran sanos y tienen un resultado negativo. Estos parámetros se calculan de la siguiente manera (Greenberg *et al.* 2005):

$$\text{Sensibilidad}(S) = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100\%$$

$$\text{Especificidad}(E) = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100\%$$

Cuanto mayor sea la sensibilidad de una prueba, aumenta la probabilidad de que esta detecte a individuos con la enfermedad de interés. Las pruebas con una sensibilidad alta son útiles para descartar la presencia de una enfermedad, es decir, un resultado negativo excluye prácticamente la posibilidad de que la enfermedad esté presente. En el caso de la especificidad, cuanto mayor sea para una prueba, aumenta la probabilidad de que los individuos sin la

enfermedad den resultados negativos. Los estudios muy específicos se usan para confirmar la presencia de una enfermedad; un resultado positivo es un indicador de que la enfermedad de interés está presente (Greenberg *et al.* 2005).

La forma usual de presentar los resultados de una validación de pruebas diagnósticas es usando un cuadro 2 x 2, como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Forma usual de presentar los resultados de una validación para pruebas diagnósticas

		Criterio de verdad	
		Enfermo	Sano
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	a	b
	Negativo	c	d

Cuando los datos se presentan de esta forma, la sensibilidad se puede calcular como $S = a/(a+c)$ y la especificidad como $E = d/(b+d)$.

2. Razones de probabilidad. También es posible calcular las razones de probabilidad (RP). La razón de probabilidad positiva (RP^+) es la razón entre la probabilidad de un resultado positivo en un individuo enfermo y la probabilidad de un resultado positivo en un individuo sano. Esta se puede calcular con la siguiente ecuación (Greenberg *et al.* 2005):

$$RP^+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

La razón de probabilidad negativa (RP^-) es la razón entre la probabilidad de un resultado negativo en un individuo enfermo y la probabilidad de un resultado negativo en un individuo sano. Esta se puede calcular con la siguiente ecuación (Greenberg *et al.* 2005):

$$RP^- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

3. Probabilidad posprueba de la enfermedad. Las razones de probabilidad pueden usarse para calcular directamente el cambio en la magnitud en las probabilidades de diagnosticar la presencia de una enfermedad antes y después de la prueba. Esta magnitud se conoce como la probabilidad posprueba de la enfermedad. Para ello se parte del cálculo de la probabilidad

preprueba de la enfermedad, es decir, la probabilidad, antes del estudio, de que un individuo tenga enfermedad de interés antes de realizar el estudio. Usando el formato del Cuadro 5, la probabilidad preprueba de la enfermedad estaría dada por $(a+c)/(a+b+c+d)$. A continuación, se calcula la disparidad preprueba de la enfermedad; esta se define como la razón entre la probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad de interés y la probabilidad de no padecer la enfermedad, antes de realizar el estudio. Esta viene dada por (Greenberg *et al.* 2005):

$$\text{Disparidad preprueba} = \frac{\text{Probabilidad preprueba}}{1 - \text{Probabilidad preprueba}}$$

El siguiente paso es el cálculo de la disparidad posprueba de la enfermedad. Esta es la razón entre la probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad de interés y la probabilidad de que no la padezca, después de realizar el estudio (Greenberg *et al.* 2005):

$$\text{Disparidad posprueba} = \text{Disparidad preprueba} \times RP^+$$

Finalmente, la probabilidad posprueba de enfermedad se calcula como (Greenberg *et al.* 2005):

$$\text{Probabilidad posprueba} = \frac{\text{Disparidad posprueba}}{1 - \text{Disparidad posprueba}}$$

La probabilidad preprueba indica la probabilidad de que un individuo presente la enfermedad antes de aplicar la prueba diagnóstica. La probabilidad posprueba indica la probabilidad de que un individuo con un resultado positivo usando la prueba diagnóstica presente la enfermedad. Por lo tanto, este valor puede usarse para evaluar la utilidad global de una prueba diagnóstica (Greenberg *et al.* 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que los cocoteros son comunes en las costas guatemaltecas, poco se sabe sobre su importancia económica y cultural para el país. Sin embargo, a partir del año 2001 se empezó a percibir el efecto de la desaparición de la mayoría de cocoteros altos en la costa atlántica de Guatemala debido a la expansión del amarillamiento letal del cocotero (ALC). Los efectos adversos del ALC motivaron a las autoridades del país a diseñar estrategias para su control.

Para evitar un colapso en la producción de cocos en Izabal, se implementó un programa de resiembra con variedades tolerantes. También se instaló una caseta de control cuarentenario en los Amates, Izabal, para evitar el movimiento de cocoteros desde las zonas afectadas hacia las zonas libres del ALC. Era necesario, además, identificar a los potenciales vectores de la enfermedad en Guatemala, así como especies vegetales que pudieran ser hospederas del patógeno.

Los resultados de estas medidas dependen fuertemente de que los resultados de laboratorio sean confiables. Para el diagnóstico del ALC se han desarrollado tres métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR, por sus siglas en inglés). La prueba de referencia es la PCR anidada. Esta prueba, sin embargo, tiene un costo elevado (60% mayor que la PCR simple) y los resultados demoran más tiempo que con un PCR simple. Por lo tanto, el uso de la PCR anidada para programas de vigilancia epidemiológica a nivel nacional implicaría costos de análisis de laboratorio bastante altos. En este trabajo se compara la PCR para fitoplasmas en general y la PCR para ALC específico con la PCR anidada para validarlos como alternativas para pruebas de laboratorio de rutina que permitan el diagnóstico rápido, económico y certero del ALC.

En Jamaica (Harrison *et al.* 2002) y Cuba (Llauger *et al.* 2002) se ha reportado la presencia de variantes genéticas del fitoplasma causante del ALC típico del Caribe. Estas variaciones podrían estar asociadas a la adaptación de los patógenos a distintas variedades de cocoteros, o incluso a otras especies vegetales (Harrison *et al.* 2002). Es importante, por lo tanto, conocer si en Guatemala existe más de una variante del fitoplasma causante del ALC para predecir el resultado de los programas de introducción de variedades tolerantes de cocoteros.

IV. OBJETIVOS

A. Generales

- Determinar la prueba de laboratorio más conveniente para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero, ALC, en programas de vigilancia epidemiológica a nivel nacional.
- Identificar variantes genéticas del fitoplasma causante del ALC en Guatemala.

B. Específicos

- Validar el diagnóstico del fitoplasma causante del ALC por reacción en cadena de la polimerasa, PCR, usando iniciadores para fitoplasmas en general e iniciadores para ALC específicos usando los resultados de la prueba de PCR anidada como referencia.
- Determinar la confiabilidad y limitaciones de las dos pruebas de diagnóstico mencionadas anteriormente, usando la PCR anidada como prueba estándar.
- Identificar variantes del fitoplasma causante del ALC en Guatemala por medio del polimorfismo de largo de fragmentos de restricción, RFLP, del gen 16S rRNA.

V. HIPÓTESIS

1. No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos PCR general para fitoplasmas, y PCR específica para ALC.
2. En Guatemala existe más de una variante del fitoplasma causante del ALC.

VI. MÉTODOS

A. Toma de muestras

Las muestras se tomaron entre marzo del 2003 y noviembre del 2006. Se seleccionaron cocoteros con síntomas de ALC y cocoteros aparentemente sanos cercanos a los anteriores como muestras. Todas las muestras usadas para este trabajo procedieron de Izabal y Petén. Para cada muestra se anotó un número correlativo, ubicación geográfica (nombre del lugar, latitud, longitud, altitud), sintomatología y variedad.

Las muestras tomadas fueron aserrín del tronco; estas se obtuvieron con la ayuda de una broca para madera de $\frac{3}{4}$ de diámetro y un trépano manual. En cada palmera se hicieron al menos 2 perforaciones en lados distintos del tronco; cada perforación se hizo a 1.5 m desde el suelo aproximadamente. Durante la perforación se descartó el aserrín obtenido de los primeros 2 – 3 cm de perforación. Las perforaciones en el tronco tuvieron una profundidad máxima de 7 a 15 cm, dependiendo el grosor del tronco.

La muestra se depositó inmediatamente en buffer CTAB (cloruro de sodio 1.4 M, CTAB [bromuro de hexadeciltrimetilamonio] 2%, Tris-HCl 100 mM, Na₂EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 2%, pH = 8.0) en tubos de centrifuga de 50 ml. En cada tubo se colocaron 15 – 20 ml de buffer y aproximadamente 10 gramos de muestra. Cada tubo se rotuló con un número consecutivo y se almacenó en una hielera para proteger a la muestra de la luz directa del sol y el exceso de calor. Antes de proceder a la toma de la siguiente muestra, la broca se lavaba con una solución al 20% de hipoclorito de sodio (cloro) y luego con agua destilada.

B. Extracción de ácidos nucleicos

El protocolo de extracción para muestras de aserrín consistió en una modificación al método de Doyle y Doyle (1990). Primero se pesaron 0.1 – 0.15 gramos de aserrín preservado en buffer CTAB. La muestra se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se incubó a -20°C durante una hora. A la muestra congelada se adicionaron 600 µl de buffer CTAB de extracción (cloruro de sodio 1.4 M, CTAB [Bromuro de hexadeciltrimetilamonio] 2%, PVP-40 [polivinilpirrolidona 40], Tris-HCl 100 mM, Na₂EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0.2%, pH = 8.0), precalentados a 65 °C y se homogeneizó con un macerador mecánico durante 30 segundos. Las muestras maceradas se incubaron a 65 °C durante 30 minutos. En algunas muestras se hizo una segunda maceración después de la incubación a 65 °C. Luego se eliminaron los lípidos de la muestra agregando 600

µl de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (en proporción 24:1, respectivamente) seguido de una agitación vigorosa. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm (16,000 x g) en una microcentrífuga Eppendorf® 5415C. El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y se agregaron 60 µl de buffer CTAB/NaCl (CTAB 10%, cloruro de sodio 0.7 M). Se repitió la extracción con cloroformo – alcohol isoamílico y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo y se agregaron 60 µl de acetato de sodio 3M seguidos de 360 µl de isopropanol frío. Los tubos se mezclaron por inversión y se dejaron incubando a 4 °C durante toda la noche; alternativamente se hizo la incubación a -20 °C por 1 hora. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón (pellet) se lavó con 150 µl de etanol al 70%. Después del lavado se decantó el etanol y el botón se secó a temperatura ambiente durante 10 – 15 minutos. Pasado este tiempo el precipitado se resuspendió en 25 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 1 ml, pH 8.0) y la muestra se almacenó a 4 °C.

Después de extraídos los ácidos nucleicos se calculó su concentración en la muestra y la pureza de los mismos usando un espectrofotómetro ThermoSpectronic® Genesys 10uv® en celdas de cuarzo de 50 µl con 1.000 cm de longitud óptica. Para cada cuantificación se mezclaron 5 µl de la extracción con 395 µl de buffer TE; se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La concentración de ADN en la extracción se calculó usando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{A_{260}}{0.020 \text{ cm} \times \text{ng}^{-1} \times \mu\text{l}} \times 80$$

En esta ecuación, A₂₆₀ es la absorbancia de la solución a 260 nm, 0.020 cm ng⁻¹ µl es el coeficiente de absorción específica para el ADN de doble hebra y 80 es el factor de dilución de la muestra. La concentración se expresa en ng/µl. Al mismo tiempo se estimó la pureza del ADN calculando la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (razón A₂₆₀/A₂₈₀). Razones de 1.8 son indicadoras de una buena pureza para muestras de ADN; razones de 2.0 sugieren una mayor concentración de ARN. Valores inferiores a 1.7 indican contaminación por proteínas y valores superiores a 2.1 se deben a contaminación por compuestos fenólicos en la extracción.

Todas las extracciones cuya concentración fuera inferior a 25 ng/µl o cuya pureza estuviera fuera del rango de 1.8 – 2.0 se descartaron y se repitió la extracción. Cuando la concentración era mayor a 200 ng/µl se hizo una dilución de la muestra para ajustar su concentración a 50 – 100 ng/µl con buffer TE.

C. Reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero

La prueba de diagnóstico de referencia para el ALC es la PCR anidada. El primer paso consistió en realizar una PCR usando los iniciadores universales para fitoplasmas P1 (5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3') / P7 (5' CGTCCTTCATCGGCTCTT 3'). Se preparó con 24 µl de mezcla para PCR y 1 µl extracción de ADN según el Cuadro 6:

Cuadro 6. Constituyentes de la mezcla de reacción de PCR para la detección universal de fitoplasmas.

Reactivo	Concentración Stock	Volumen para 1 muestra	Fabricante
Agua destilada desionizada	-	16.3 µl	
Buffer B	10 ×	2.5 µl	Promega
cloruro de magnesio	25 mM	2.0 µl	Promega
Primer P1	25 ng/µl	1.0 µl	Invitrogen
Primer P7	25 ng/µl	1.0 µl	Invitrogen
Mezcla de dNTPs	2.5 mM c/u	1.0 µl	Promega
Taq ADN polimerasa II	5 U/µl	0.2 µl	Promega
Muestra de ADN	50-300 ng/µl	1.0 µl	

La PCR se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research) con las siguientes condiciones: 94°C × 3 min; 35 ciclos de: 94°C × 90 seg, 55°C × 55 seg, 72°C × 2 min; al terminar el ciclo de PCR se agregaron 8 min a 72°C y el producto se almacenó a 4°C.

Para la PCR anidada se hizo una dilución 1:30 del producto de la PCR anterior (1 µl de producto de PCR y 29 µl de agua destilada desionizada). Se usó una mezcla de reacción igual a la anterior, pero en vez de los iniciadores P1 y P7 se usó el par LY16Sr (5' CAGCAGCCGCGGTAATACATA 3') / 16S503F (5' GCTTACGCAGTTAGGCTGTC 3'), según se muestra en el Cuadro 7. El programa que se usó tuvo las siguientes condiciones: 94°C × 1 min; 35 ciclos de: 94°C × 30 seg, 60°C × 50 seg, 72°C × 2 min; al terminar el ciclo de PCR se agregaron 8 min a 72°C.

Cuadro 7. Constituyentes de la mezcla de reacción de PCR anidada para la detección de fitoplasmas del grupo del ALC (Grupo IV).

Reactivo	Concentración Stock	Volumen para 1 muestra	Fabricante
Agua destilada desionizada	-	16.3 µl	
Buffer B	10 ×	2.5 µl	Promega
cloruro de magnesio	25 mM	2.0 µl	Promega
Primer LY16Sr	25 ng/µl	1.0 µl	Invitrogen
Primer 16S503F	25 ng/µl	1.0 µl	Invitrogen
Mezcla de dNTPs	2.5 mM c/u	1.0 µl	Promega
Taq ADN polimerasa II	5 U/µl	0.2 µl	Promega
Muestra de ADN	50-300 ng/µl	1.0 µl	

El tercer par de iniciadores que se usaron para el diagnóstico del ALC fue el LYF1 (5' TCGTTTTGATAATCTTTCATTTGAC 3') / LYR1 (5' CATATTTTATTTCTTTGCAATCTG 3'). La mezcla de PCR para este par de iniciadores se presenta en el

Cuadro 8. El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 90 segundos a 94 °C, 30 segundos a 53 °C y 50 segundos a 72 °C. El programa terminó con una extensión a 72 °C durante 8 minutos y las muestras se almacenaron a 4 °C.

Cuadro 8. Constituyentes de la mezcla de reacción de PCR para la detección específica del fitoplasmas causante del ALC

Reactivo	Concentración Stock	Volumen para 1 muestra	Fabricante
Agua destilada desionizada	-	15.8 µl	
Buffer B	10 ×	2.5 µl	Promega
cloruro de magnesio	25 mM	2.5 µl	Promega
Primer LYF1	25 ng/µl	1.0 µl	Invitrogen
Primer LYR1	25 ng/µl	1.0 µl	Invitrogen
Mezcla de dNTPs	2.5 mM c/u	1.0 µl	Promega
Taq ADN polimerasa II	5 U/µl	0.2 µl	Promega
Muestra de ADN	50-300 ng/µl	1.0 µl	

El producto de los PCR se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando buffer TAE 1x y luego teñida con bromuro de etidio. Durante el proceso de optimización, el resultado de la electroforesis se fotografió usando un sistema de documentación MP-ST (Fotodyne) con fotografías Polaroid 667. Para las muestras que sirvieron para el análisis final de los resultados se usó el sistema de documentación de geles UVP (Upland), el cual guarda las imágenes en formato digital y permite una mejor resolución de las mismas. Como marcador de tamaño

molecular se usó una escalera de 1 kb (Promega). Los resultados de la PCR general para fitoplasmas se presentan en la

Figura 5. En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos usando PCR anidada y en la Figura 7 se muestran los resultados típicos cuando se usan los iniciadores específicos para ALC.

Figura 5. Resultados de PCR para fitoplasmas en general

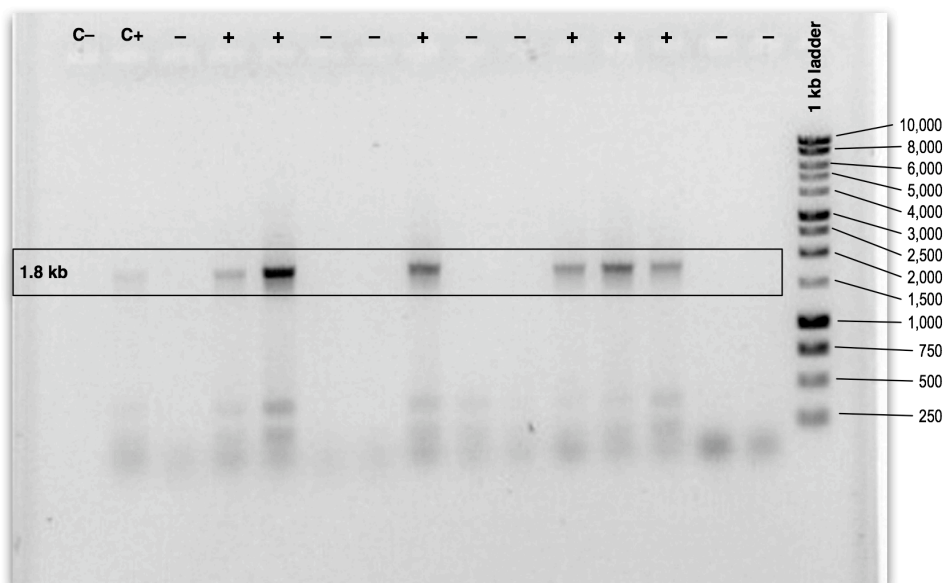


Figura 6. Resultados de nested PCR para fitoplasmas del grupo IV

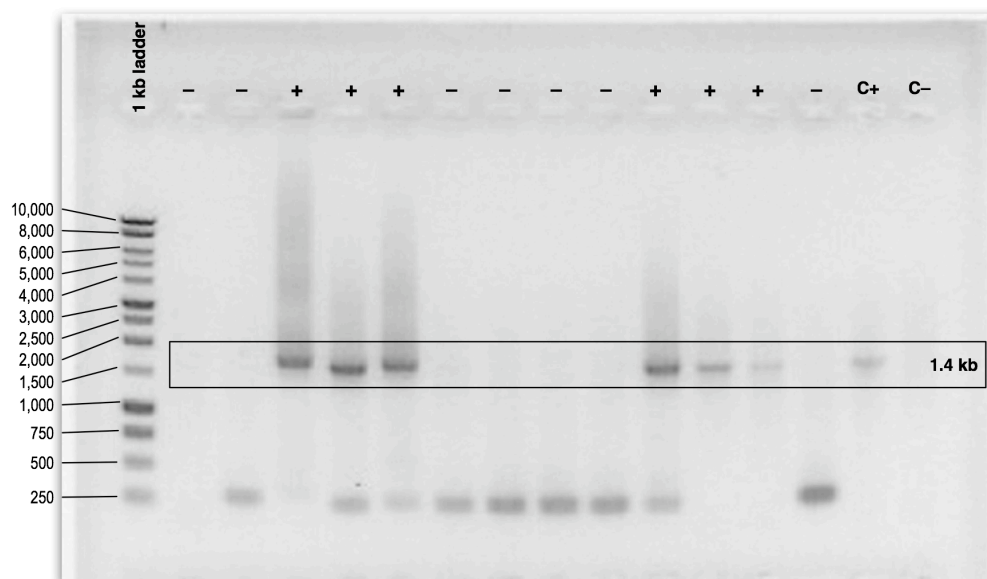
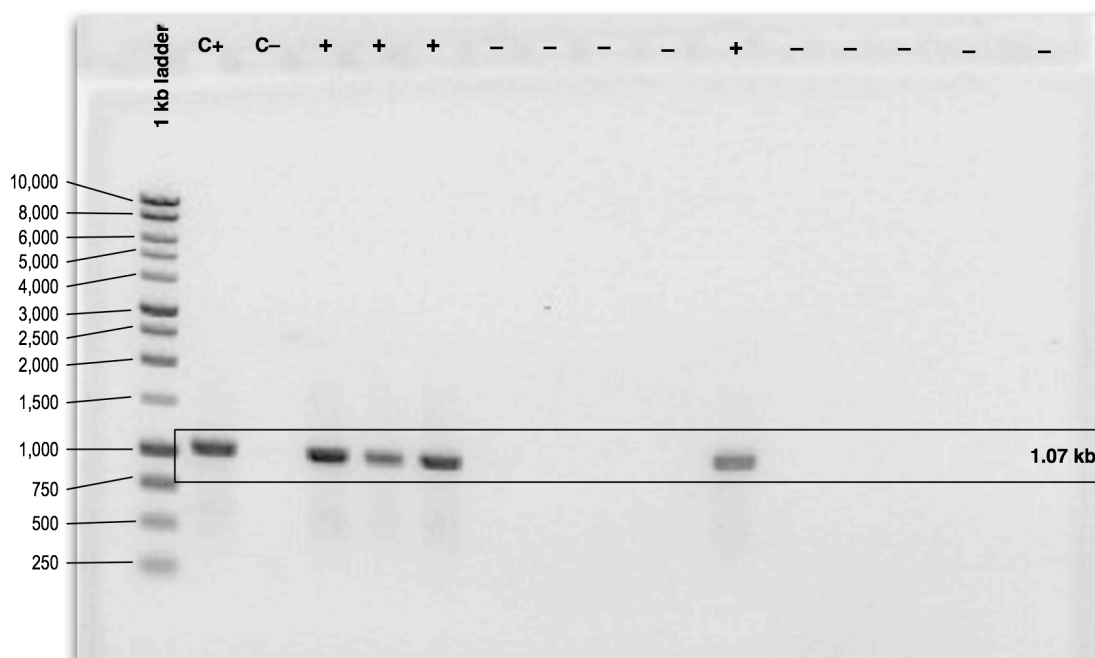


Figura 7. Resultados de PCR específica para ALC



En resumen, a cada una de las muestras se les realizó 3 pruebas distintas, que se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Pruebas de laboratorio usadas para el diagnóstico del ALC

Código	Descripción	Nombre corto
A	Prueba de referencia para evaluar el desempeño de las otras pruebas	PCR anidada
B	PCR para la detección de fitoplasmas en general	PCR universal
C	PCR para la detección de fitoplasmas causantes del ALC en la región del Caribe	PCR específica

D. Caracterización de fitoplasmas por polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción, RFLP

Para el análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), se usó el producto de PCR con los primers P1/P7. La digestión se hizo con cuatro enzimas de restricción: *AluI*, *HinfI*, *RsaI* y *TaqI*. Todas las enzimas fueron adquiridas de Promega y sus especificaciones se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Características generales de las enzimas de restricción usadas para el análisis de RFLPs de las muestras de fitoplasmas amplificados

Enzima de restricción	Fabricante y No. de catálogo	Buffer	Temperatura (°C)	Sitio de restricción
Alul	Promega (R6281)	B	37	5'- AG↓CT -3'
Hinfl	Promega (R6201)	B	37	5'- G↓ANTC -3'
Rsal	Promega (R6371)	C	37	5'- CT↓AC -3'
TaqI	Promega (R6151)	Multicore	65	5'- T↓CGA -3'

Para la digestión se mezclaron en un tubo eppendorf de 0.5 ml 14 µl del producto de PCR, 2 µl de albúmina sérica bovina (BSA, 1 mg/ml) acetilada, 2 µl de buffer para la enzima (ver Cuadro 10) y 2 µl de la enzima. El resultado es una mezcla de 20 µl, la cual se dejó toda la noche a la temperatura óptima de cada enzima, según se muestra en el Cuadro 10.

El resultado de la digestión se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 4% usando un voltaje de 60 V durante 120 minutos en buffer TBE 1x (Tris-base 89 mM, Na₂EDTA 2 mM, ácido bórico 89 mM). Después de la electroforesis se tñió el gel con bromuro de etidio y se documentó usando un sistema de documentación de geles UVP (Upland). Como marcador de tamaño molecular se usó una escalera de 50 bp (Promega).

El cálculo de la similitud genética entre las muestras analizadas se hizo con el índice de Nei-Li:

$$S = \frac{2 \times N_{xy}}{N_x + N_y}$$

En donde N_{xy} es el número de bandas en común presentes entre los individuos x y y; N_x y N_y es el número de bandas totales en el individuo x y y, respectivamente. La distancia genética (D) es igual a $1 - S$. A partir de las distancias genéticas se construyó un dendrograma usando el método UPGMA.

E. Análisis de resultados

Los datos de las muestras y los resultados de PCR se introdujeron en una hoja de Microsoft® Excel® 2004 para Macintosh. La base de datos se analizó usando el programa estadístico R© (R Development Core Team 2006) versión 2.4.1. para Macintosh. Para el análisis de RFLP se usó la misma metodología.

Debido a que los valores de sensibilidad y especificidad son proporciones, se usó una prueba de proporciones múltiples para determinar diferencias significativas entre los valores de

estos parámetros en las pruebas diagnósticas evaluadas. La prueba de hipótesis para comparar proporciones sin corrección de continuidad se calculó con el programa R© usando la función “prop.test”; esta función no usa una aproximación normal de las proporciones y por lo tanto la prueba de hipótesis se basa en la distribución χ^2 (chi-cuadrado), en vez de la distribución normal.

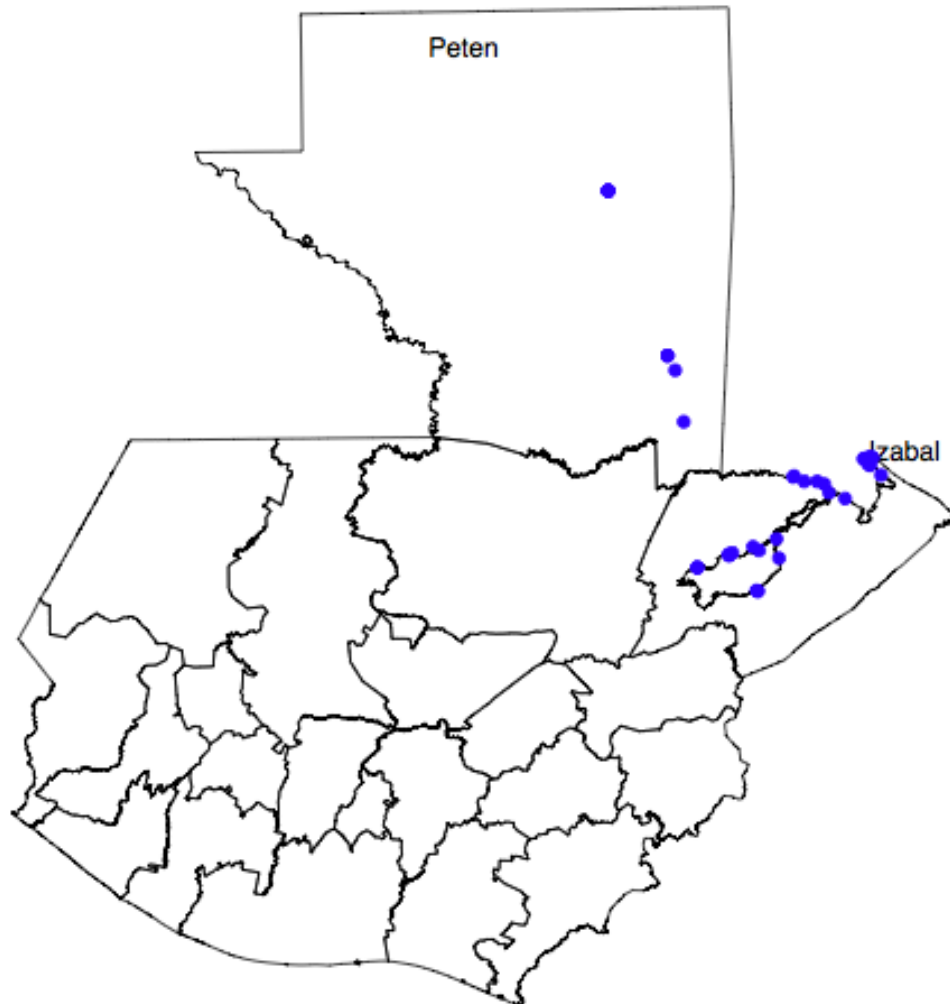
El dendrograma construido a partir de los resultados de RFLP se hizo programando una función para el cálculo de la matriz de similitud de Nei-Li (ver inciso I.A.2.d.iv.) y agrupando los datos con el método UPGMA.

VII. RESULTADOS

A. Muestras recolectadas y su ubicación geográfica

Se recolectó un total de 52 muestras de cocoteros en los departamentos de Izabal y Petén (ver Apéndice A). La ubicación geográfica de las muestras se presenta en la Figura 8. Todas las muestras fueron tomadas en los departamentos de Izabal y Petén. Aunque se recolectaron muestras de distintas especies vegetales durante las giras, solo se presentan los datos de los cocoteros.

Figura 8. Ubicación geográfica de las muestras recolectadas



B. Validación de las pruebas de PCR

Cuadro 11. Validación de la PCR para fitoplasmas en general

		Resultado de la PCR anidada	
		Positivo	Negativo
Resultado de la PCR para fitoplasmas en general	Positivo	13	1
	Negativo	3	35

Cuadro 12. Validación de la PCR específica para ALC

		Resultado de la PCR anidada	
		Positivo	Negativo
Resultado de la PCR específica para ALC	Positivo	12	0
	Negativo	4	36

Cuadro 13. Comparación entre sensibilidad y especificidad para las dos pruebas diagnósticas evaluadas

H₀: No existe diferencia significativa entre las dos proporciones

H_a: Existe una diferencia significativa entre las dos proporciones

	PCR general	PCR específica	χ^2 *	p**	Conclusión
Sensibilidad	81.3	75.0	0.1829	0.67	Se acepta H ₀
Especificidad	97.2	100.0	1.0141	0.31	Se acepta H ₀

* χ^2 tiene siempre 1 grado de libertad debido a que se compararon dos proporciones únicamente.

** Si $p \leq 0.05$, se rechaza H₀ (no existe diferencia significativa entre las dos proporciones)

Los resultados de la validación de las dos técnicas muestran que no existe diferencia significativa entre la sensibilidad y especificidad de las pruebas. Además, estos resultados sugieren que ambas pruebas son altamente específicas y moderadamente sensibles.

Cuadro 14. Probabilidades posprueba de enfermedad

	PCR para fitoplasmas en general	PCR específica para ALC
Probabilidad preprueba	0.31	0.31
Disparidad preprueba	0.44	0.44
Disparidad posprueba	13.00	$+\infty$
Probabilidad posprueba	0.93	1.00

Los resultados sugieren que el uso de ambas pruebas diagnósticas triplica la probabilidad de encontrar a un individuo enfermo dentro de la población.

C. Caracterización molecular de algunos fitoplasmas encontrados por medio de RFLP

Para analizar la diversidad genética del fitoplasma causante del ALC en Guatemala se analizaron 8 muestras de cocoteros provenientes de Izabal. Estas muestras (ver Cuadro 15 y Figura 9) presentaban una sintomatología característica del ALC, y dieron resultados positivos para las tres pruebas diagnósticas por PCR. En las Figuras Figura 10, Figura 11,

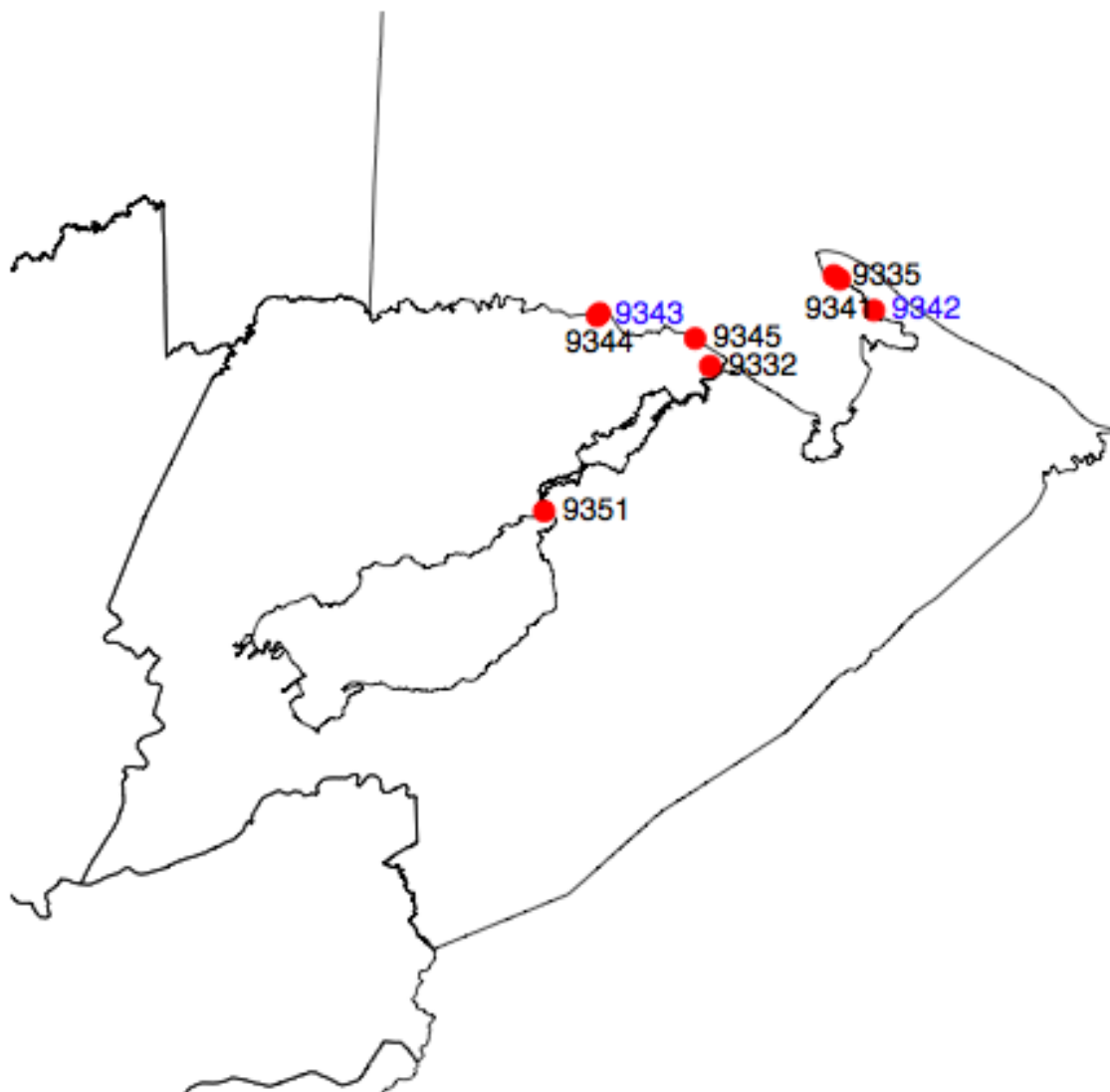
Figura 12 y

Figura 13 se muestran los patrones obtenidos al digerir el producto de PCR con los primers P1/P7 con las enzimas de restricción *TaqI*, *RsaI*, *HinfI* y *AluI*, respectivamente. Todas las muestras provenían de cocoteros de la variedad alta del atlántico (criolla).

Cuadro 15. Descripción de las muestras analizadas para RFLP

Código	Muestra	Lugar	Resultado de PCR		
			P1/P7	nPCR	LY
A	9332	Livingston	+	+	+
B	9335	Estero Lagarto	+	+	+
C	9341	Estero Lagarto	+	+	+
D	9342	Cabo Tres Puntas	+	+	-
E	9343	Sarstún	+	+	-
F	9344	Sarstún	+	+	+
G	9345	Siete Altares	+	+	+
H	9351	Castillo San Felipe	+	+	+

Figura 9. Ubicación geográfica de las muestras usadas para el análisis por RFLPs



De todas las ocho muestras usadas para el análisis de diversidad genética por RFLPs, solamente las muestras 9342 (Cabo Tres Puntas) y 9343 (Sarstún) no amplificaron con los iniciadores específicos para ALC (LYF1/LYR1). Estas muestras se presentan en azul en la Figura 9.

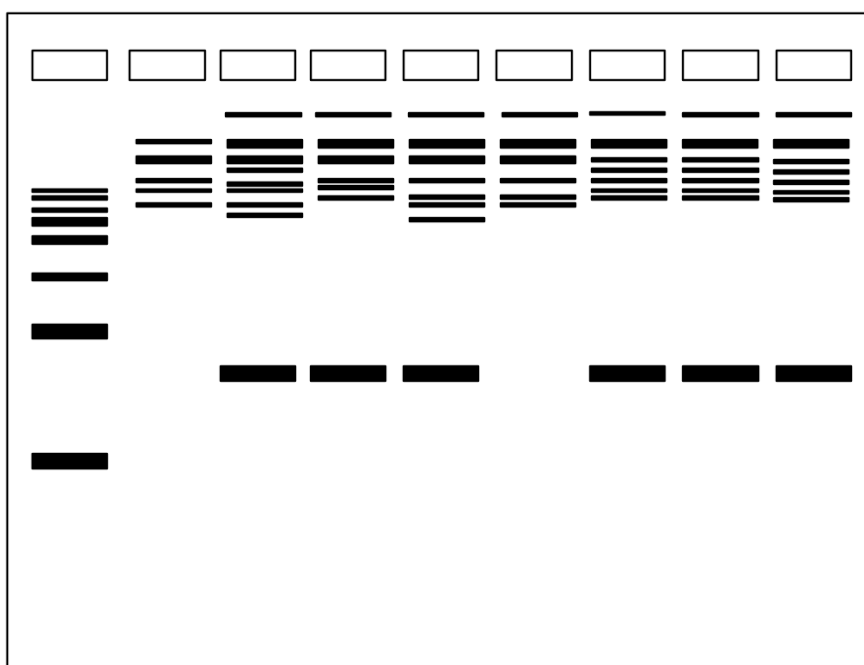
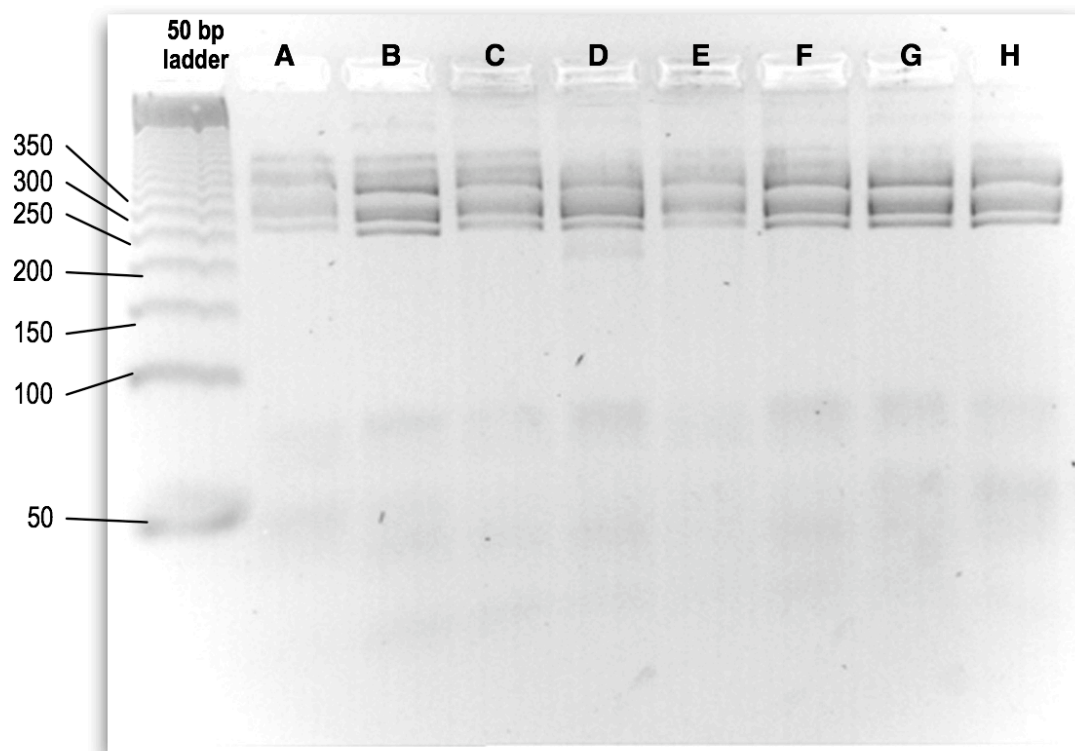
Figura 11. Patrón de digestión del producto P1/P7 con *RsaI*

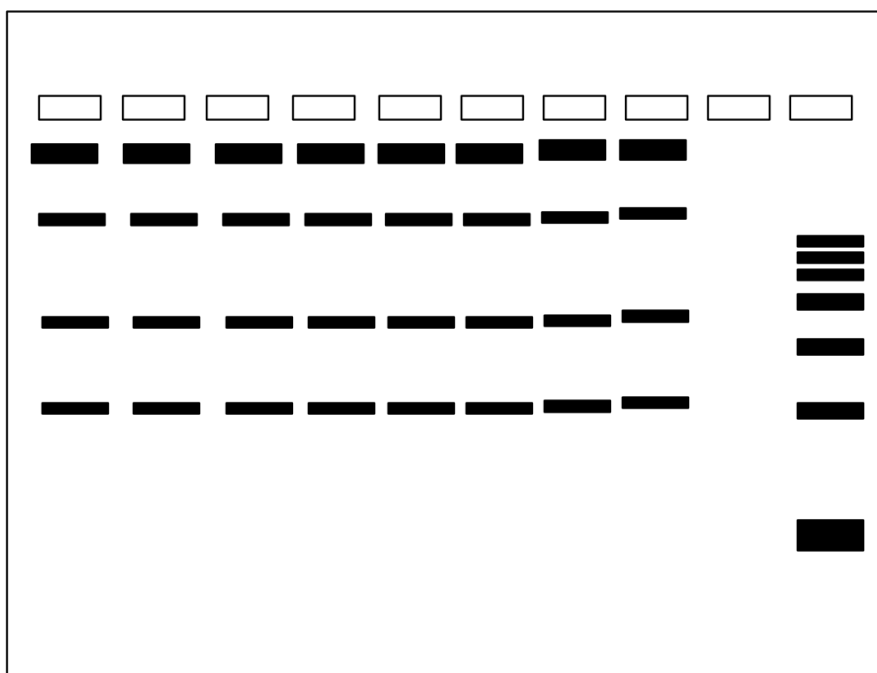
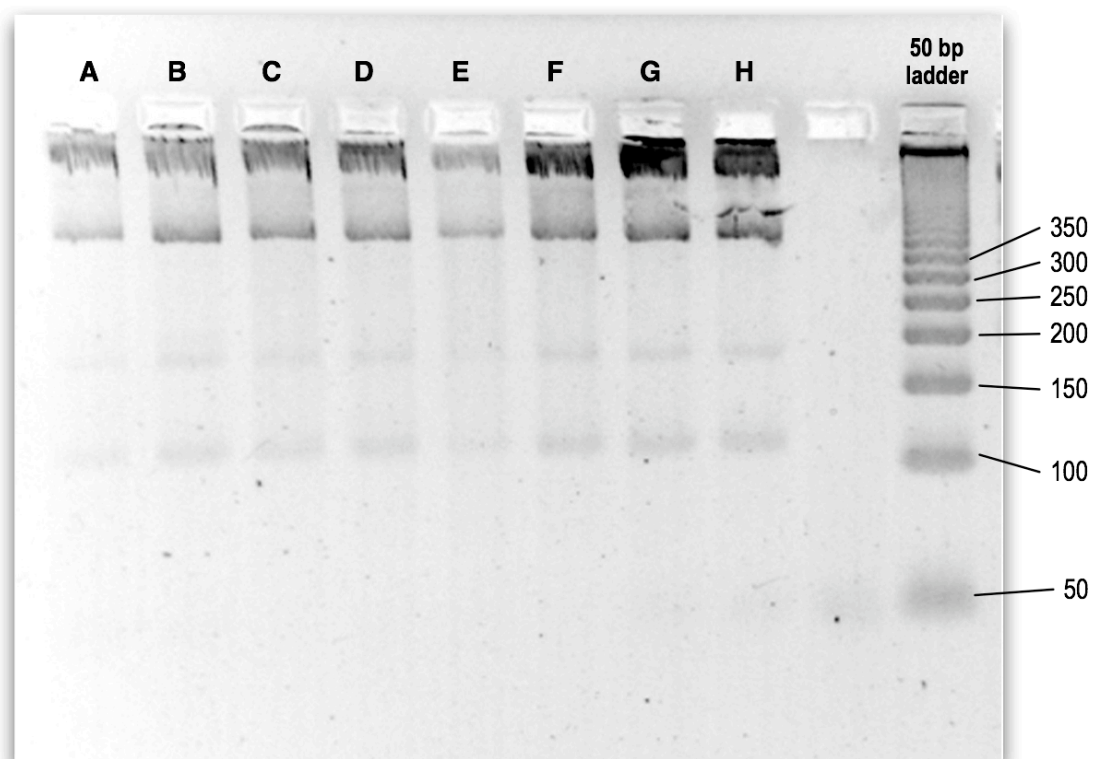
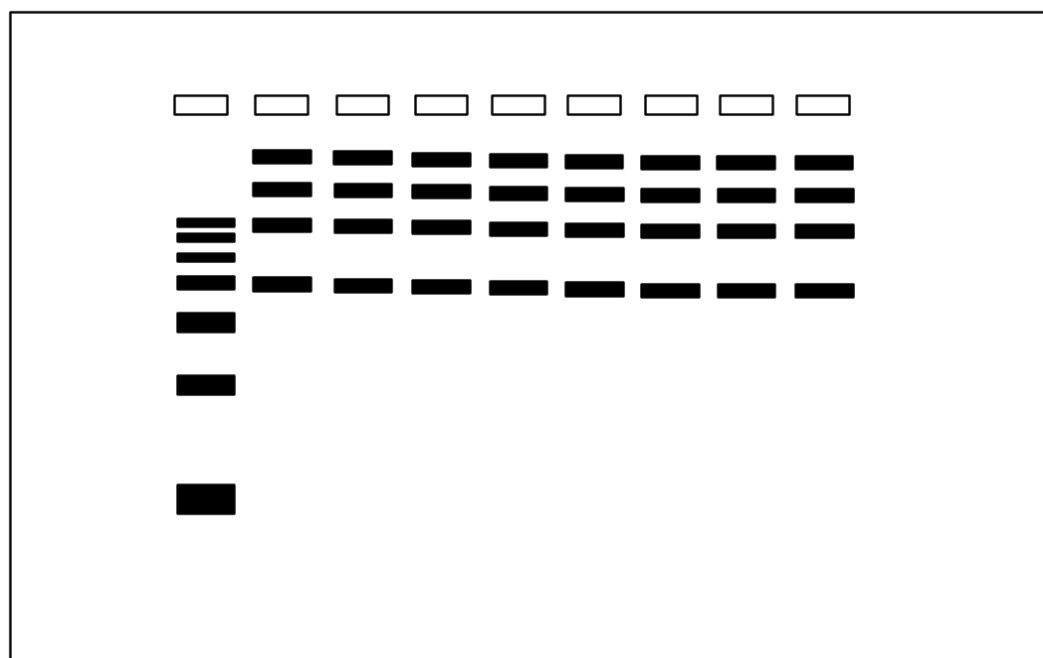
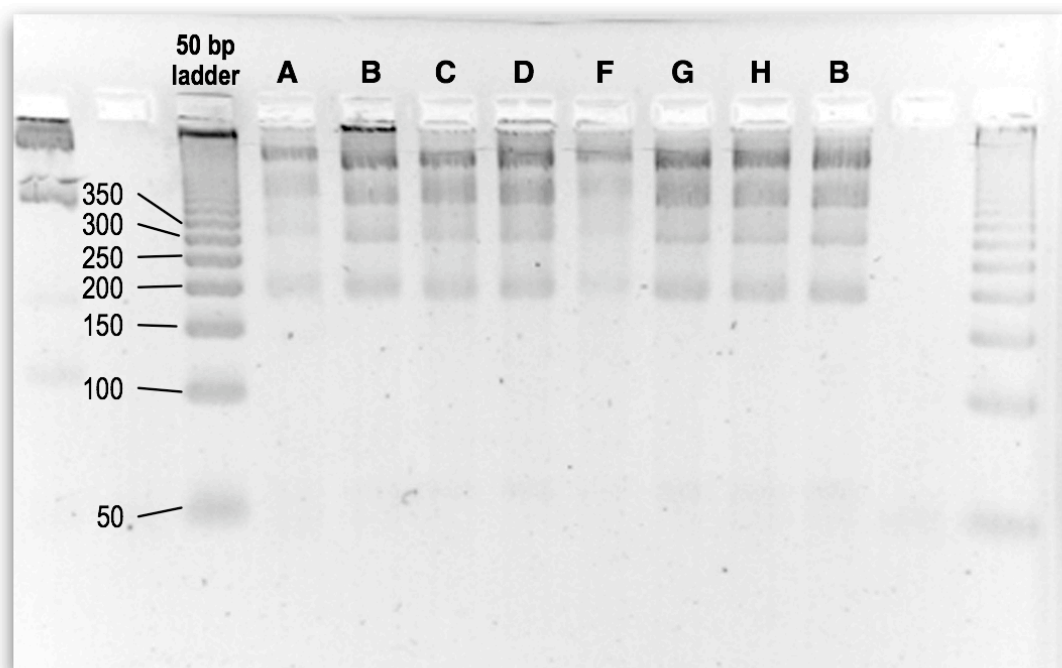
Figura 12. Patrón de digestión del producto P1/P7 con *Hinf*I

Figura 13. Patrón de digestión del producto P1/P7 con *AluI*



De las cuatro enzimas usadas, sólo se logró detectar una diferencia mínima en los patrones de RFLPs con *RsaI*. La matriz de los fragmentos obtenidos por la digestión con las cuatro

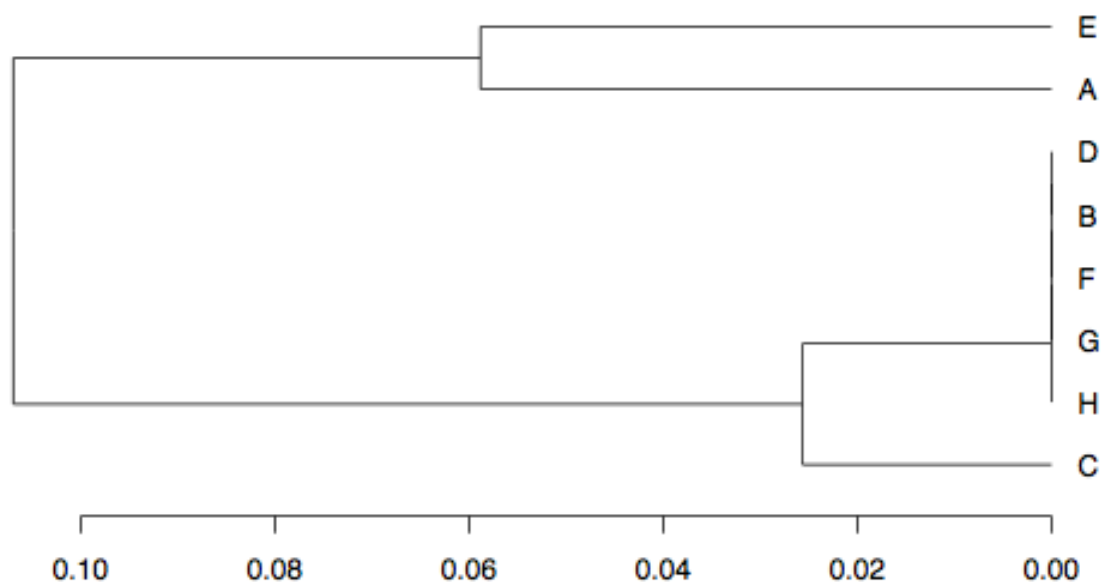
enzimas se presenta en el Cuadro 16, y el dendrograma construido a partir de esta información se presenta en Figura 14.

Cuadro 16. Matriz de patrones de fragmentos de digestión

Enzima	Banda	kb	Muestra*							
			A	B	C	D	E	F	G	H
Hinf	1	395	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	212	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	119	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq	4	839	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	424	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	386	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	158	1	1	1	1	1	1	1	1
Alu	8	521	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	404	1	1	1	1	1	1	1	1
	10	321	1	1	1	1	1	1	1	1
	11	233	1	1	1	1	1	1	1	1
Rsa	12	572	0	1	1	1	1	1	1	1
	13	425	1	1	1	1	1	1	1	1
	14	385	1	1	1	1	1	1	1	1
	15	351	0	1	1	1	1	1	1	1
	16	293	1	1	1	1	1	1	1	1
	17	272	1	1	1	1	1	1	1	1
	18	268	1	0	1	0	1	0	0	0
	19	230	0	1	0	1	0	1	1	1
	20	75	0	1	1	1	0	1	1	1

*Nota: 1 indica la presencia de una banda y 0 indica su ausencia.

Figura 14. Dendrograma construido a partir de los largos de los fragmentos obtenidos después de digerir los productos de PCR con 4 enzimas de restricción



Matriz de disimilitud ($D = 1 - S$)							
	A	B	C	D	E	F	G
B	0.143						
C	0.111	0.026					
D	0.143	0.000	0.026				
E	0.059	0.081	0.053	0.081			
F	0.143	0.000	0.026	0.000	0.081		
G	0.143	0.000	0.026	0.000	0.081	0.000	
H	0.143	0.000	0.026	0.000	0.081	0.000	0.000

En el dendrograma se pueden apreciar claramente dos subgrupos; el primero lo constituyen las muestras A (Livingston) y E (Sarstún); el segundo está formado por la muestra C (Estero Lagarto) y las muestras B (Estero Lagarto), D (Cabo Tres Puntas), F (Sarstún), G (Siete Altares) y H (Castillo San Felipe).

Tanto el dendrograma como la matriz de disimilitud muestra que no hay diferencia entre las muestras D, B, F, G y H.

VIII. DISCUSIÓN

En la actualidad, el Gobierno de Guatemala tiene mucho interés en monitorear y prevenir la expansión de enfermedades vegetales potencialmente perjudiciales para la economía del país. Una de estas enfermedades es el amarillamiento letal del cocotero (ALC). Se ha reportado que el ALC afecta a más de 33 especies vegetales, principalmente arecáceas (palmáceas), muchas de las cuales están presentes en Guatemala. La necesidad de determinar áreas libres de ALC y de identificar a los potenciales vectores y hospederos alternos de la enfermedad en el país dependen de técnicas de diagnóstico rápidas, confiables y económicas. A continuación, se presentan los resultados de la validación de dos técnicas de diagnóstico del ALC por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), comparándolas con la prueba de referencia generalmente aceptada: PCR anidada.

Las dos pruebas evaluadas fueron la PCR para fitoplasmas en general y la PCR para ALC específica. En el Cuadro 13 se presentan la sensibilidad y especificidad calculadas para ambas pruebas diagnósticas. Se puede observar que, aunque la sensibilidad de la PCR general sea ligeramente mayor que la de la PCR específica, y la especificidad de esta última pareciera ser mayor que la primera, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos parámetros para las dos pruebas.

En el Cuadro 14 se presentan las probabilidades posprueba de enfermedad calculadas para la PCR general y la PCR específica. Estos resultados indican que, si en la población muestreada se toma una cantidad finita de individuos, la probabilidad de encontrar individuos afectados por el ALC es de 0.31 (probabilidad preprueba); ahora bien, si después de hacer la prueba diagnóstica selecciono al azar individuos cuyo resultado haya sido positivo, la probabilidad de encontrar sujetos enfermos aumenta casi el triple (0.93 para la PCR general y 1.00 para la PCR específica). En la literatura consultada no se encontró una prueba estadística para comprobar que no existe diferencia entre dos probabilidades posprueba de la enfermedad. Sin embargo, la similitud entre los valores calculados para ambas pruebas sugiere que no existe una diferencia significativa entre ambas.

Tomando en cuenta los dos puntos discutidos hasta ahora, se puede concluir que, desde un punto de vista práctico, no existe ninguna diferencia importante entre los resultados obtenidos usando la PCR general y la PCR específica. Ambas pruebas demuestran ser altamente específicas, por lo tanto, son útiles para confirmar la presencia del ALC ya que un resultado positivo será un buen indicador de la presencia de la enfermedad. Sin embargo, la sensibilidad de ambas pruebas es moderada, por lo que los resultados negativos no son útiles para descartar la presencia de la enfermedad en una muestra.

Se podría concluir que, para fines prácticos, ambas pruebas se podrían usar indiferentemente en programas de vigilancia epidemiológica del ALC, pero existen algunas diferencias técnicas que deben tomarse en cuenta. En primer lugar, está el tiempo que se requiere para obtener los resultados. La PCR general demora un total de 3.3 horas aproximadamente, mientras que la PCR específica toma 2.5 horas. Esto podría parecer una diferencia de tiempo mínima, pero un ahorro de casi una hora de tiempo para obtener los resultados podría ser un factor importante para un laboratorio que se dedica a la certificación de plantas para importación o exportación.

En segundo lugar, debe considerarse la utilidad posterior de los resultados de las pruebas. La PCR específica amplifica una región desconocida, hasta ahora, del fitoplasma causante del ALC, mientras que la PCR general amplifica el gen 16S ARNr completo, parte del gen 23S ARNr y la región intermedia (ver

Figura 4). Esto implica que los resultados de la PCR específica pueden ser usados exclusivamente para diagnóstico, mientras que el producto de la PCR general puede usarse para otras aplicaciones. Una de ellas es confirmar un resultado negativo por PCR anidada y la segunda es la caracterización de los fitoplasmas por RFLP.

Tomando en cuenta las evidencias y consideraciones anteriores, se recomienda el uso de la PCR específica para los trabajos rutinarios, pero la PCR general para futuros estudios de investigación. La principal razón es que esta última técnica permitiría caracterizar a los fitoplasmas que se encuentren en otras especies vegetales o insectos y permitiría confirmar, con una PCR anidada posterior, la ausencia de la enfermedad en plantas aparentemente sanas.

La caracterización molecular de los fitoplasmas encontrados se hizo por medio de polimorfismo de largo de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). Para este análisis se usaron 8 muestras de palmeras que amplificaron con PCR general (P1/P7) y nPCR. Las muestras provenían de diferentes puntos en el departamento de Izabal. Las muestras B y C provinieron de Estero Lagarto (ver Cuadro 15). En el año 2002 se tomaron muestras de esta ubicación y se enviaron al Zamorano, Honduras, y al CICY, México; ambos centros confirmaron la presencia del fitoplasma causante del ALC en algunas de las muestras y confirmaron que por su patrón de RFLP eran indistinguibles del ALC clásico que está presente en todo el Caribe. Por lo tanto, es razonable asumir que los patrones de bandas de estas muestras sean representativos de la población del Caribe. Además, estas muestras dieron un resultado positivo con la PCR específica para ALC. Para el análisis se usaron 4 enzimas reportadas como las que mayor información brindan para distinguir grupos e individuos entre los fitoplasmas: Taq I, Rsa I, Hinf I y Alu I. Usando las primeras tres enzimas se obtuvo un patrón de bandas indistinguible entre todas las muestras (Figura 10 y

Figura 12). Solamente con Rsa I se obtuvo lo que parecía ser un patrón distinto en algunas muestras (

Figura 13). La matriz usada para los cálculos de distancia genética y construcción del dendrograma se muestra en el Cuadro 16.

Según la publicación de Harrison *et al.* (2002), la única enzima que probó ser útil para la diferenciación de variantes de fitoplasmas en la región Caribe fue HinfI. Después de digerir los productos de la PCR general para fitoplasmas con HinfI, se obtienen 4 fragmentos para los fitoplasmas causantes del ALC clásico (Florida) y 3 para los aislados de variedades enanas en Jamaica. Debido a que se obtuvieron 4 fragmentos para todas las muestras en este estudio (ver

Figura 12), se puede decir que los patógenos analizados en Guatemala pertenecen al mismo grupo que los causantes del ALC clásico en la región Caribe.

En la Figura 14 se muestra el dendrograma construido con esta información. El hecho de que las dos muestras tomadas en Estero Lagarto sean ligeramente distintas, así como las tomadas en Sarstún, sugiere que en estas dos localidades ha habido variaciones genéticas (al menos a nivel del gen 16S ARNr) en los fitoplasmas causantes del ALC. Las muestras que no amplificaron con la PCR específica fueron la D y la E; estas muestras podrían no haber amplificado por falta de una concentración suficiente de ADN del fitoplasma en la extracción o por una mutación que no permita el reconocimiento del fitoplasma por los iniciadores específicos. Sin embargo, debido a que la muestra D haya sido agrupada dentro del resto de las muestras parece indicar que la región detectada por los iniciadores LYF1/LYR1 no refleja necesariamente cambios dentro del gen 16S ARNr. Aunque las diferencias entre los fitoplasmas observados son mínimas, si se demostrara que son estadísticamente significativas, sugerirían que en Guatemala los fitoplasmas causantes del ALC están mutando. Por lo tanto, lo más probable es que las muestras D y E no hayan sido amplificadas por la PCR específica debido a una concentración del ADN del fitoplasma muy baja.

Es posible que la extinción de las variedades susceptibles (altos del atlántico, o criollos) esté forzando a los fitoplasmas a cambiar para adaptarse a otras variedades de cocos o incluso otras especies vegetales. El número de muestras analizado es muy bajo para comprobar esta hipótesis, y sería aconsejable repetir el análisis usando un mayor número de enzimas de restricción, pero la inquietud queda latente. También podría ser útil enviar a secuenciar los fragmentos amplificados para obtener una información más exacta sobre las posibles diferencias genéticas entre las muestra. Un tamaño de muestra más aceptable se podría calcular a partir de

la siguiente ecuación (McDonald and Martínez 1990), derivada de la teoría de probabilidades de una distribución binomial:

$$n = \frac{\log(1 - P)}{\log(1 - p)}$$

En esta ecuación, n es el número de muestras necesaria para tener una certeza P (generalmente 0.95, ó 95%) de muestrear un alelo presente en una proporción p . El alelo más raro es el de la muestra A, el cual está presente en 1 de 8 casos, por lo tanto un buen estimado para $p = 1/8 = 0.125$. Con este valor, un número de muestra apropiado tendría que ser de al menos 23 individuos.

Este trabajo muestra la importancia de validar una prueba de diagnóstico que será usada con fines de vigilancia epidemiológica de una enfermedad. Se suele aceptar que los resultados de un diagnóstico son infalibles, pero como este estudio demuestra, la validez de los mismos debe someterse primero a una validación objetiva. Además, la selección de la mejor técnica de diagnóstico para una enfermedad, en este caso el ALC, depende también de consideraciones prácticas como la utilidad del diagnóstico para pruebas posteriores.

IX. CONCLUSIONES

1. La sensibilidad y especificidad de la PCR para fitoplasmas en general y la PCR específica para ALC no son estadísticamente significativas. Ambas pruebas son altamente específicas y moderadamente sensibles, por lo tanto, un resultado positivo prácticamente descarta la posibilidad de que la muestra esté sana, pero los resultados negativos no implican necesariamente la ausencia de la enfermedad.
2. El producto obtenido a partir de la PCR para fitoplasmas en general, aunque demora más tiempo en sintetizarse, permiten la confirmación de los resultados negativos por PCR anidada y la caracterización de los fitoplasmas por RFLP.
3. Después de la digestión de los productos de la PCR general de 8 muestras analizadas con *HinfI* se obtuvieron 4 fragmentos en cada una; esto es consistente con el patrón de bandas obtenido a partir de la digestión de fitoplasmas causantes del ALC clásico en el Caribe. Por lo tanto, los fitoplasmas causantes del ALC en Guatemala pueden agruparse dentro del grupo de ALC clásico.
4. Aunque los resultados del análisis genético de 8 fitoplasmas analizados por RFLP no son concluyentes, es posible que en Guatemala existan al menos 2 variedades de los fitoplasmas causantes del ALC. Esta diferencia se observa con la digestión del producto de la PCR general para fitoplasmas con la enzima *RsaI*.

X. RECOMENDACIONES

1. Para futuros trabajos de investigación se recomienda el uso de la PCR para fitoplasmas en general como técnica de diagnóstico del ALC debido a que su producto puede ser usado para otras aplicaciones, entre ellas, la confirmación de resultados negativos por PCR anidada o la caracterización de fitoplasmas por RFLP. Para trabajos de rutina, se recomienda el uso de la PCR específica para ALC como técnica de diagnóstico por ser un poco más específica y rápida que la PCR general.
2. Se recomienda hacer un análisis de diversidad genética de los fitoplasmas encontrados por secuenciación del producto de la PCR general. Debido a que se sospecha la presencia de al menos 2 a 3 variantes del fitoplasma, una de ellas con una frecuencia de 0.125, se debería tomar al menos una muestra de 23 individuos positivos para tener un 95% de certeza de encontrar las variantes y confirmar su existencia. Estas muestras deberían recolectarse dentro de la región más afectada, que por el momento sigue siendo el departamento de Izabal.
3. De los resultados obtenidos en este estudio podrían derivarse otras investigaciones. Una de ellas sería la búsqueda de otras especies vegetales que pudieran ser susceptibles o servir de hospederos para el ALC. Este estudio sería importante para evitar la prohibición a la exportación de palmeras ornamentales como el Xate (*Chamaedorea elegans*). También podría validarse las pruebas de PCR en insectos para identificar posibles vectores de la enfermedad en Guatemala y diseñar estrategias de control más efectivas.

XI. LITERATURA CITADA

- Arellano, J. and C. Oropeza. 1995. *Letal Yellowing*. In: Oropeza, C., F. W. Howard and G. R. Ashburner (eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 1 – 15
- Been, B. O. 1995. *Integrated pest management for the control of lethal yellowing: quarantine, cultural practices and optimal use of hybrids*. In: Oropeza, C., F. W. Howard and G. R. Ashburner (eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 101-109
- Berges, R., M. Rott and E. Seemüller. 2000. *Range of Phytoplasma Concentrations in Various Plant Hosts as Determined by Competitive Polymerase Chain Reaction*. *Phytopathology* 90(10):1145 – 1152.
- Boudon-Padieu, E., J. Larrue, and A. Caudwell. 1989. *ELISA and dot-blot detection of flavescente doree-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state*. *Current Microbiology* 19:357 – 364.
- Christensen N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M. and A. Schulz. 2005. *Phytoplasmas and their interactions with hosts*. *Trends in Plant Science* 10(11):526 – 535.
- Davis, R. E. and W. A. Sinclair. 1998. *Phytoplasma Identity and Disease Etiology*. *Phytopathology* 88(12):1372 – 1376.
- Deeley, J., W. A. Stevens, and R. T. V. Fox. 1979. *Use of Dienes' satin to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms*. *Phytopathology* 69:1169 - 1171
- Doi, Y. M., Teranaka, M., Yora, K. And Asuyama, H. 1967. *Mycoplasma or PLT-group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows and apulownia witches' broom*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259 – 266.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *BRL Focus* 12(1):13 – 15.

- Eden-Green, S. J. 1995. *A brief history of letal yellowing*. In: Oropeza, C., F. W. Howard and G. R. Ashburner (eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 17 – 31
- Errampalli, D., J. Fletcher and J. L. Sherwood. 1989. *Production of monospecific polyclonal antivodies against the aster yellows mycoplasmalike organisms (AY MLO) of Oklahoma*. *Phytopathology* 79:1137.
- Firrao, G. et al. 2004. '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that coloniza plant phloem and insects. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1243 – 1255.
- Greenberg, R. S., S. R. Daniela, W. D. Flanders, J. W. Eley y J. R. Boeing. 2005. *Epidemiología médica*. 4ta ed. Manual Moderno. México. 236 pp.
- Gundersen, D. E. and I. M. Lee. 1996. *Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs*. *Phytopathologia mediterranea* 35:144 – 151.
- Harrison, N. A., C. M. Bourne, R. L. Cox, J. H. Tsai, and P. A. Richardson. 1992. *DNA Probes for Detection of Mycoplasmalike Organisms Associated with Letal Yellowing Disease of Palms in Florida*. *Phytopathology* 82(2):216 – 224.
- Harrison, N. A., P. A. Richardson and J. H. Tsai. 1995. *Detection and diagnosis of letal yellowing: convencional methods and molecular techniques*. In: Oropeza, C., F. W. Howard and G. R. Ashburner (eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 79 – 91
- Heinrich, M., S. Botti, L. Caprara, W. Arthofer, S. Strommer, V. Hanzer, H. Katinger, A. Bertaccini, and M. Laimer da Câmara Machado. 2001. *Improved Detection Methods for Fruit Tree Phytoplasmas*. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:169 – 179.
- Henson, J. M. and R. French. 1993. *The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis*. *Annual Review of Phytopathology* 31:81 – 109.
- Howard, F. W. and N. A. Harrison. 2000. *Lethal Yellowing of Palms*. *University of Florida*. USA. Webpage in <http://www.ftld.ufld.edu/lyfacts.htm> (última accesión: marzo 2007)
- Howard, F. W. and C. Oropeza. 1998. *Organic mulch as a factor in the nymphal habitat of Myndus crudus (Hemiptea:Auchenorrhyncha:Cixiidae)*. *Florida Entomologist* 81(1):92 – 97.

- Howard, F. W., T. J. Weissling and L. B. O'Brien. 2001. *The larval habitat of Cedusa inflata (Hemiptera:Auchenorrhyncha:Derbidae) and its relationship with adult distribution on palms*. Florida Entomologist 84(1):119 – 122.
- Jones, P. 2002. *Phytoplasma Plant Pathogens*. In: Waller, J. M., J. M. Lenné and S. J. Waller (eds.) Plant Pathologist's Pocketbook. CAB Internacional. U. S. A. pp. 126 – 139
- Lee, I. M., R. W. Hammond, R. E. Davis, and D. E. Gundersen. 1993. *Universal amplification and Analysis of Pathogen 16S rDNA for Classification and Identification of Mycoplasma-like Organisms*. Phytopathology 83(8):834 – 842.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen, R. W. Hammond, and R. E. Davis. 1994. *Use of Mycoplasma-like Organisms (MLO) Group-Specific Oligonucleotide Primers for Nested-PCR Assays to Detect Mixed-MLO Infections in a Single Host Plant*. Phytopathology 84(6):559 – 566.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis, R. y I.M. Bartoszyk. 1998. *Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences*. International Journal of Systematic Bacteriology 48:1153 – 1169.
- McDonald, B. A. and J. P. Martínez. 1990. *DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms Among Mycosphaerella graminicola (Anamorph Septoria tritici) Isolates Collected from a Single Wheat Field*. Phytopathology 80(12):1368 – 1369.
- Oropeza, C., I. Córdova, J. A. Escamilla, L. Alpizar, M. Narváez, y N. A. Harrison. 2001. *La toma de muestras de palmas de cocotero para la detección de fitoplasmas*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY. México.
- R Development Core Team. 2006. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
- Schneider, B., E. Seemüller, C. D. Smart, and B. C. Kirkpatrick. 1995. *Phylogenetic classification of plant pathogenic micoplasma-like organisms or phytoplasmas*. In: Razin, S. and J. G. Tully (eds.) Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, Vol. I. Academia Press. U. S. A. pp. 369 – 380

- Seemüller, E. 1976. *Fluorescence optical demonstration of mycoplasma-like organisms in the phloem of trees with pear decline or proliferation disease*. *Phytopathologische Zeitschrift* 85:368 – 372.
- Seemüller, E., C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino y M. Göschl. 1998. *Current status of molecular classification of the phytoplasmas*. *Journal of Plant Pathology* 80(1):3 – 26
- Thomas, D. L. 1979. *Mycoplasma-like Bodies Associated with Lethal Declines of Palms in Florida*. *Phytopathology* 69(9):928 – 934.
- Zizumbo, D. and J. Arellano. 1995. *Coconut variation and genetic resources*. In: Oropeza, C., F. W. Howard and G. R. Ashburner (eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 123-138

XII. APÉNDICE

Apéndice 1: Ubicación geográfica y resultados de la PCR de las muestras analizadas

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.54123	-88.85546	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.73971	-88.59348	1	1	NA
2003	Izabal	Finca San Luis, Aldea el Calvario	15.88956	-89.36675	0	0	NA
2003	Izabal	Finca San Luis, Aldea el Calvario	15.88953	-89.36681	0	0	NA
2003	Izabal	Aldea Arenales, Livingston	15.91278	-89.29375	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Los Pintos, Livingston	15.90369	-89.24464	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Los Pintos, Livingston	15.90369	-89.24461	0	0	NA
2003	Escuintla	Puerto de San José	13.92102	-90.86786	0	0	NA
2003	Escuintla	Puerto de San José	13.92411	-90.84818	0	0	NA
2003	Escuintla	Puerto de San José	13.92524	-90.82809	0	0	NA
2003	Escuintla	Islas Chicalas	13.98919	-91.39395	0	0	NA
2003	Escuintla	Islas Chicalas	13.98951	-91.39450	0	0	NA
2003	Escuintla	Islas Chicalas	13.98894	-91.39318	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.71991	-88.60060	0	0	NA
2003	Escuintla	Nueva Concepción	14.10517	-91.29812	0	0	NA
2003	Escuintla	Nueva Concepción	14.10618	-91.29721	0	0	NA
2003	Escuintla	Nueva Concepción	14.10943	-91.29424	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.71752	-88.59892	0	0	NA
2003	Escuintla	Nueva Concepción	14.18453	-91.30316	0	0	NA
2003	Escuintla	Nueva Concepción	14.18410	-91.30133	0	0	NA
2003	Escuintla	Nueva Concepción	14.18691	-91.30064	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.71469	-88.59877	0	0	NA
2003	Escuintla	El Semillero	14.04300	-91.52831	0	0	NA
2003	Escuintla	El Semillero	14.04505	-91.53311	0	0	NA
2003	Escuintla	El Semillero	14.04502	-91.53349	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.71918	-88.59533	0	0	NA
2003	Escuintla	El Semillero	14.04536	-91.53358	0	0	NA
2003	Escuintla	El Semillero	14.04552	-91.53341	0	0	NA
2003	Escuintla	El Semillero	14.04543	-91.53306	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.70812	-88.59217	0	1	NA
2003	Escuintla	Tiquisate	14.24715	-91.36255	0	0	NA
2003	Escuintla	Tiquisate	14.27978	-91.36300	0	0	NA
2003	Escuintla	Tiquisate	14.28705	-91.36115	0	0	NA
2003	Izabal	Santo Tomás de	15.70302	-88.58785	1	1	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
		Castilla					
2003	Escuintla	Tiquisate	14.29957	-91.37761	0	0	NA
2003	Escuintla	Tiquisate	14.32216	-91.38096	0	0	NA
2003	Escuintla	Tiquisate	14.32241	-91.38062	0	0	NA
2003	Izabal	Santo Tomás de Castilla	15.68884	-88.61906	1	1	NA
2003	Retalhuleu	Ingenio El Pilar	14.54389	-91.58611	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Ingenio El Pilar	14.54552	-91.58543	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Ingenio El Pilar	14.54670	-91.58473	0	0	NA
2003	Izabal	Santo Tomás de Castilla	15.68867	-88.61903	0	1	NA
2003	Retalhuleu	Finca Ma. Victoria	14.54393	-91.59238	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Finca Ma. Victoria	14.54408	-91.59224	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Finca Ma. Victoria	14.54350	-91.59317	0	0	NA
2003	Izabal	Base Naval Santo Tomás	15.68864	-88.61903	1	1	NA
2003	Retalhuleu	Capitanía Pto.Champ	14.29348	-91.91435	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Capitanía Pto.Champ	14.29402	-91.91396	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Capitanía Pto.Champ	14.29394	-91.91431	0	0	NA
2003	Escuintla	ICTA Cuyuta	14.10630	-90.88319	0	0	NA
2003	Escuintla	ICTA Cuyuta	14.10965	-90.88596	0	0	NA
2003	Escuintla	ICTA Cuyuta	14.10428	-90.88226	0	0	NA
2003	Escuintla	San José Rama Blanc	13.93377	-91.22043	0	0	NA
2003	Escuintla	San José Rama Blanc	13.93349	-91.21973	0	0	NA
2003	Escuintla	San José Rama Blanc	13.93418	-91.21867	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.72170	-88.60193	0	0	NA
2003	Izabal	Base Naval Santo Tomás	15.69280	-88.62095	1	1	NA
2003	Retalhuleu	Puerto de Champeric	14.28846	-91.90640	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Puerto de Champeric	14.28784	-91.90488	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Puerto de Champeric	14.29421	-91.90955	0	0	NA
2003	Izabal	Base Naval Santo Tomás	15.69152	-88.62006	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Caballo Blanco	14.49895	-91.85078	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Caballo Blanco	14.49974	-91.85075	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Caballo Blanco	14.50154	-91.84968	0	0	NA
2003	Izabal	Frontera Cacao	15.69130	-88.62039	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Caballo Blanco	14.49697	-91.85047	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Caballo Blanco	14.49705	-91.85050	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Caballo Blanco	14.49717	-91.84985	0	0	NA
2003	Izabal	Frontera Cacao	15.58507	-88.44624	0	0	NA
2003	Quetzaltenango	Coatepeque	14.70301	-91.84266	0	0	NA
2003	Quetzaltenango	Coatepeque	14.70302	-91.84229	0	0	NA
2003	Quetzaltenango	Coatepeque	14.70340	-91.84646	0	0	NA
2003	Izabal	Frontera Cacao	15.58428	-88.44642	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Retalhuleu	Retalhuleu	14.58919	-91.77475	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Retalhuleu	14.58204	-91.77527	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Retalhuleu	14.58204	-91.77522	0	0	NA
2003	Izabal	Enar Ríos, km 286	15.58458	-88.44537	0	1	NA
2003	Retalhuleu	Retalhuleu	14.54554	-91.66770	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Retalhuleu	14.54890	-91.66470	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Retalhuleu	14.54896	-91.66423	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Baltimore	15.78597	-88.68847	0	0	NA
2003	Izabal	Colina Vista Hermosa	15.82848	-88.51822	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Baltimore	15.78599	-88.68858	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Barrios	15.63062	-88.52092	1	1	NA
2003	Izabal	Finca Baltimore	15.78562	-88.67912	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Macondo, km 263	15.68292	-88.57671	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Baltimore	15.78562	-88.67912	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Macondo, km 263	15.55488	-88.67946	0	0	NA
2003	Escuintla	Lote 47 Cuyuta	14.07553	-90.87898	0	0	NA
2003	Escuintla	Lote 2 Cuyuta	14.07675	-90.87996	0	0	NA
2003	Escuintla	Llanitos Cuy, Parce	14.08072	-90.88650	0	0	NA
2003	Escuintla	San José Rama Blanc	13.93058	-91.20106	0	0	NA
2003	Escuintla	San José Rama Blanc	13.93077	-91.20052	0	0	NA
2003	Escuintla	San José Rama Blanc	13.92948	-91.19708	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.73955	-88.60087	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Baltimore	15.78456	-88.86960	0	0	NA
2003	Izabal	Aldea Cayuga	15.55489	-88.67947	0	0	NA
2003	Izabal	Sta. María del Mar	15.77275	-88.67529	1	1	NA
2003	Izabal	Finca la Bendición	15.54182	-88.70181	0	0	NA
2003	Suchitepequez	El Triunfo	14.07314	-91.57809	0	0	NA
2003	Suchitepequez	El Triunfo	14.07206	-91.57907	0	0	NA
2003	Suchitepequez	El Triunfo	14.07379	-91.57962	0	0	NA
2003	Izabal	Sta. María del Mar	15.77265	-88.67527	0	0	NA
2003	Izabal	Mariscos	15.47463	-88.89244	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Puntarenas	14.05443	-91.55166	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Puntarenas	14.05640	-91.55512	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Puntarenas	14.05781	-91.55718	0	0	NA
2003	Izabal	Sta. María del Mar	15.77272	-88.67538	0	1	NA
2003	Izabal	Mariscos	15.41855	-89.23610	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Chicago	14.08813	-91.60903	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Chicago	14.08824	-91.60927	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Chicago	14.08973	-91.60917	0	0	NA
2003	Izabal	Punta Palma	15.75706	-88.64488	0	0	NA
2003	Izabal	Los Amates	15.41583	-89.09416	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Tahuesco	14.09545	-91.61866	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Suchitepequez	Tahuesco	14.09364	-91.61807	0	0	NA
2003	Suchitepequez	Tahuesco	14.09486	-91.61844	0	0	NA
2003	Izabal	Punta Palma	15.75709	-88.64471	0	0	NA
2003	Izabal	Los Amates	15.25478	-89.09461	0	0	NA
2003	Suchitepequez	San José Churirín	14.12414	-91.66425	0	0	NA
2003	Suchitepequez	San José Churirín	14.12403	-91.66447	0	0	NA
2003	Suchitepequez	San José Churirín	14.12323	-91.66456	0	0	NA
2003	Izabal	Punta Palma	15.75697	-88.64485	0	0	NA
2003	Izabal	Los Amates	15.25488	-89.09200	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Tulate	14.15874	-91.71517	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Tulate	14.15874	-91.71518	0	0	NA
2003	Retalhuleu	Tulate	14.16014	-91.71665	0	0	NA
2003	Izabal	Quegüeche	15.84295	-88.77165	1	0	NA
2003	Izabal	Los Amates	15.25409	-89.09443	0	0	NA
2003	Retalhuleu	La Barona	14.16055	-91.71700	0	0	NA
2003	Retalhuleu	La Barona	14.16087	-91.71833	0	0	NA
2003	Retalhuleu	La Barona	14.16283	-91.72218	0	0	NA
2003	Izabal	Quegüeche	15.84293	-88.77158	0	0	NA
2003	Izabal	Morales	15.27120	-89.05390	0	0	NA
2003	San Marcos	Los Faros	14.53261	-92.22143	0	0	NA
2003	San Marcos	Los Faros	14.53170	-92.22150	0	0	NA
2003	San Marcos	Los Faros	14.53398	-92.21964	0	0	NA
2003	Izabal	Quegüeche	15.84271	-88.77137	0	0	NA
2003	Izabal	Morales	15.31965	-89.04577	0	0	NA
2003	San Marcos	Puerto Ocos	14.51468	-92.19451	0	0	NA
2003	San Marcos	Puerto Ocos	14.51471	-92.19424	0	0	NA
2003	San Marcos	Puerto Ocos	14.51320	-92.19471	0	0	NA
2003	Escuintla	Overo	14.04275	-90.83248	0	0	NA
		Cementerio					
2003	Escuintla	Lote 6 Overo	14.04022	-90.83221	0	0	NA
2003	Escuintla	Lote 9 Overo	14.03888	-90.83187	0	0	NA
2003	Escuintla	Base Naval	13.92162	-91.08380	0	0	NA
		Sipacate					
2003	Escuintla	Base Naval	13.92174	-91.08413	0	0	NA
		Sipacate					
2003	Escuintla	Base Naval	13.92450	-91.08224	0	0	NA
		Sipacate					
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.73952	-88.60081	0	0	NA
2003	Izabal	Quegüeche	15.84274	-88.77127	0	0	NA
2003	Izabal	Morales	15.47342	-88.84430	0	0	NA
2003	San Marcos	Puerto Ocos	14.51067	-92.19696	0	0	NA
2003	San Marcos	Puerto Ocos	14.51021	-92.19423	0	0	NA
2003	San Marcos	Puerto Ocos	14.50960	-92.19286	0	0	NA
2003	Izabal	Punta Cocolí	15.86517	-88.81789	0	1	NA
2003	Izabal	Aldea Rosario,	15.63604	-89.00203	0	0	NA
		km 252.5					
2003	San Marcos	Platanares	14.56162	-92.18523	0	0	NA
2003	San Marcos	Platanares	14.56176	-92.19233	0	0	NA
2003	San Marcos	Platanares	14.56344	-92.18506	0	0	NA
2003	Izabal	Punta Cocolí	15.86515	-88.81787	0	0	NA
2003	Peten	Los Tulipanes,	15.49087	-88.66690	0	1	NA
		Flores					
2003	San Marcos	Tecun Umán	14.66581	-92.14037	0	0	NA
2003	San Marcos	Tecun Umán	14.66470	-92.13994	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	San Marcos	Tecun Umán	14.66804	-92.14215	0	0	NA
2003	Izabal	Punta Cocolí	15.86500	-88.81792	0	0	NA
2003	Peten	La Polvora, Melchor de Mencos	16.95859	-89.45898	1	1	NA
2003	San Marcos	La Blanca	14.57693	-92.14511	0	0	NA
2003	San Marcos	La Blanca	14.57782	-92.14655	0	0	NA
2003	San Marcos	La Blanca	14.56739	-92.13845	0	0	NA
2003	Izabal	Playa Blanca	15.86285	-88.87313	0	0	NA
2003	Peten	La Ceivita, Melchor de Mencos	17.02218	-89.27852	0	1	NA
2003	San Marcos	Tilapa	14.50789	-92.18226	0	0	NA
2003	San Marcos	Tilapa	14.51026	-92.17994	0	0	NA
2003	San Marcos	Tilapa	14.51214	-92.17551	0	0	NA
2003	Izabal	Aldea San Juan	15.86000	-88.87872	0	0	NA
2003	Peten	La Ceivita, Melchor de Mencos	17.05390	-89.18638	0	0	NA
2003	Izabal	Barra Sarstún	15.87804	-88.91592	0	0	NA
2003	Peten	Sta. Rosa la Zarca, Melchor	17.05352	-89.18664	1	1	NA
2003	Izabal	Barra Sarstún	15.87851	-88.91602	0	0	NA
2003	Peten	Sta. Rosa la Zarca, Melchor	17.14358	-89.15337	1	1	NA
2003	Izabal	Finca Paraíso	15.87851	-88.91602	0	0	NA
2003	Peten	Barrio Suchitan, Melchor	17.07742	-89.15142	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Paraíso	15.57243	-89.19852	0	0	NA
2003	Peten	Barrio Suchitan, Melchor	17.06940	-89.15026	1	1	NA
2003	Escuintla	Lote 81 Overo	14.03528	-90.82847	0	0	NA
2003	Escuintla	Lote 10 Overo	14.03392	-90.82950	0	0	NA
2003	Escuintla	Lote 2 Overo	14.03527	-90.83038	0	0	NA
2003	Escuintla	Ingenio	14.02224	-91.09917	0	0	NA
2003	Escuintla	Guadalupe, Ingenio	14.02149	-91.09766	0	0	NA
2003	Escuintla	Guadalupe, Ingenio	14.02066	-91.09605	0	0	NA
2003	Escuintla	Guadalupe, Ingenio	14.02066	-91.09605	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.74011	-88.60003	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Paraíso	15.57226	-89.19900	0	0	NA
2003	Peten	Barrio del Centro mmp	17.06467	-89.15015	0	0	NA
2003	Izabal	El Estor	15.57232	-89.19930	0	0	NA
2003	Peten	Barrio del Centro mmp	17.06467	-89.15015	0	1	NA
2003	Izabal	El Estor	15.52192	-89.33810	0	0	NA
2003	Peten	Barrio Fallabon mmp	17.05780	-89.15290	0	0	NA
2003	Izabal	El Estor	15.52233	-89.33384	0	0	NA
2003	Peten	Sta. Elena Petén	16.91205	-89.88623	1	1	NA
2003	Izabal	El Estor	15.52266	-89.33206	0	0	NA
2003	Peten	San Benito Petén	16.91709	-89.90212	0	1	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Izabal	El Boquerón	15.52416	-89.32752	0	0	NA
2003	Peten	Flores, Petén	16.92961	-89.89182	0	1	NA
2003	Izabal	El Boquerón	15.55861	-89.28501	0	0	NA
2003	Peten	San Benito Petén	16.92835	-89.89804	0	0	NA
2003	Izabal	Hacienda Esmeralda	15.55859	-89.28524	0	0	NA
2003	Peten	San Benito Petén	16.92556	-89.90987	1	1	NA
2003	Izabal	Hacienda Esmeralda	15.56622	-89.23319	0	0	NA
2003	Peten	San Benito Petén	16.92547	-89.92409	0	0	NA
2003	Izabal	Hacienda Esmeralda	15.56687	-89.23212	0	0	NA
2003	Peten	San Benito Petén	16.91246	-89.91699	0	1	NA
2003	Escuintla	Itzapa	13.93184	-90.71162	0	0	NA
2003	Escuintla	Itzapa	13.93198	-90.71140	0	0	NA
2003	Escuintla	Itzapa	13.93172	-90.71035	0	0	NA
2003	Escuintla	Sipacate	13.93248	-91.14706	0	0	NA
2003	Escuintla	Sipacate	13.93235	-91.14624	0	0	NA
2003	Escuintla	Sipacate	13.93290	-91.14647	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.74072	-88.59808	0	0	NA
2003	Izabal	Puente Sumach	15.56691	-89.23225	0	1	NA
2003	Peten	Barrio el Redentor, San Benito	16.78800	-89.93605	1	1	NA
2003	Izabal	Puente Sumach	15.60399	-89.09632	0	0	NA
2003	Peten	San Francisco Petén	16.79472	-89.93690	0	0	NA
2003	Izabal	San Felipe de Lara	15.60451	-89.09623	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Cruzadero, Melchor de Mencos	16.97561	-89.26375	0	0	NA
2003	Izabal	San Felipe de Lara	15.63579	-89.00188	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Cruzadero, Melchor de Mencos	16.97328	-89.26519	0	0	NA
2003	Izabal	San Felipe de Lara	15.63583	-89.00185	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Cruzadero, Melchor de Mencos	16.97319	-89.26514	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Cruzadero, Melchor de Mencos	16.97342	-89.26486	0	0	NA
2003	Peten	San Francisco Petén	16.79274	-89.95917	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Cruzadero, Melchor de	16.98103	-89.26311	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Peten	Mencos Sn. Juan de Dios,	16.78657	-90.12106	0	1	NA
2003	Peten	Sn. Francisco Finca Cabarric,	16.99569	-89.24997	0	0	NA
2003	Peten	Melchor de Mencos Barrio Sta. Cruz,	16.65394	-89.67106	1	0	NA
2003	Peten	La Libertad Finca Cabarric,	16.99556	-89.24997	0	0	NA
2003	Peten	Melchor de Mencos El Rosalito, Sta.	16.62888	-89.60245	0	0	NA
2003	Peten	Ana Finca Cabarric,	16.99547	-89.25006	0	0	NA
2003	Peten	Melchor de Mencos San Juan Dolores	16.71707	-89.55747	0	0	NA
2003	Escuintla	Itzapa	13.93224	-90.71707	0	0	NA
2003	Escuintla	Itzapa	13.93232	-90.71789	0	0	NA
2003	Escuintla	Itzapa	13.93293	-90.71837	0	0	NA
2003	Escuintla	La Gomera	14.04712	-91.08595	0	0	NA
2003	Escuintla	La Gomera	14.04645	-91.08571	0	0	NA
2003	Escuintla	La Gomera	14.04651	-91.08621	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.74089	-88.59801	0	0	NA
2003	Peten	Aldea Las Viñas, Flores	16.95331	-89.48411	0	0	NA
2003	Peten	El Ocote Sta. Ana	16.81073	-89.50208	0	1	NA
2003	Peten	Finca Sta. Teresita, Flores	16.97914	-89.57672	0	0	NA
2003	Peten	Aldea La Unión, Sta. Ana	16.60164	-89.52425	0	0	NA
2003	Peten	Finca Sta. Teresita, Flores	16.97900	-89.66014	0	0	NA
2003	Peten	Caserío Cerro Cortado, Dolores	16.38854	-89.44508	1	1	NA
2003	Peten	Finca Sta. Teresita, Flores	16.97897	-89.66008	0	0	NA
2003	Peten	Machaquila, Poptún	16.38854	-89.44508	1	1	NA
2003	Peten	Aldea El Caoba, Flores	17.02586	-89.67492	0	0	NA
2003	Peten	San Luis	16.18799	-89.42939	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Caoba, Flores	17.02567	-89.67519	0	0	NA
2003	Peten	La Cumbre, San Luis	16.08284	-89.35154	0	1	NA
2003	Peten	Aldea Jobonpiche, San José	17.01358	-89.75794	0	0	NA
2003	Izabal	Aldea Pto. Modesto Méndez, Cadenas	15.89038	-89.22528			NA
2003	Izabal	Finca Arrollo negro chomacte,	15.86003	-89.38819	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Izabal	Livinston Aldea Chocón, Livinston	15.87168	-89.22578	0	1	NA
2003	Peten	Aldea Jobonpiche, San José	17.01356	-89.75822	0	0	NA
2003	Izabal	Rancho Concepción, Livinston	15.87012	-89.22237	1	1	NA
2003	Peten	Aldea Jobonpiche, San José	17.01517	-89.76294	0	0	NA
2003	Izabal	Rancho Concepción, Livinston	15.87012	-89.22237	0	1	NA
2003	Escuintla	Aldea Buena Vista	13.93479	-90.74486	0	0	NA
2003	Escuintla	Aldea Buena Vista	13.93025	-90.74328	0	0	NA
2003	Escuintla	Aldea Buena Vista	13.93118	-90.74563	0	0	NA
2003	Escuintla	La Democracia	14.22289	-90.95047	0	0	NA
2003	Escuintla	La Democracia	14.22276	-90.94962	0	0	NA
2003	Escuintla	La Democracia	14.22273	-90.94917	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.73974	-88.59386	0	0	NA
2003	Peten	Aldea Jobonpiche, San José	17.01519	-89.76294	0	0	NA
2003	Izabal	Semox, Livinston	15.78691	-89.13204	0	0	NA
2003	Peten	Nuevo San José, San José	16.99267	-89.89806	0	0	NA
2003	Izabal	Aldea Sejo, Livinston	15.68449	-89.04566	0	0	NA
2003	Peten	Nuevo San José, San José	16.99247	-89.89769	0	0	NA
2003	Peten	La Libertad	16.79553	-90.12675	0	0	NA
2003	Peten	La Libertad	16.79547	-90.12675	0	0	NA
2003	Peten	Aldea Altamira, Flores	16.93425	-89.70039	0	0	NA
2003	Peten	Aldea Altamira, Flores	16.93428	-89.70036	0	0	NA
2003	Peten	Finca la Virgen, Melchor de Mencos	16.77244	-89.30936	0	0	NA
2003	Peten	Finca la Virgen, Melchor de Mencos	16.77242	-89.30944	0	0	NA
2003	Peten	Finca la Virgen, Melchor de Mencos	16.76989	-89.30978	0	0	NA
2003	Escuintla	Puerto Quetzal	13.93509	-90.76051	0	0	NA
2003	Escuintla	Puerto Quetzal	13.93479	-90.76310	0	0	NA
2003	Escuintla	Puerto Quetzal	13.93477	-90.76453	0	0	NA
2003	Escuintla	La Democracia	14.23351	-90.94949	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Escuintla	La Democracia	14.23351	-90.94936	0	0	NA
2003	Escuintla	La Democracia	14.23526	-90.95053	0	0	NA
2003	Izabal	Puerto Barrios	15.73973	-88.59372	0	0	NA
2003	Peten	Finca la Virgen, Melchor de Mencos	16.76983	-89.30994	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Bombillo, Dolores	16.72594	-89.35319	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Bombillo, Dolores	16.72589	-89.35325	0	0	NA
2003	Peten	Aldea El Bombillo, Dolores	16.72597	-89.35294	0	0	NA
2003	Peten	Calzada Mopán, Dolores	16.72619	-89.37931	0	0	NA
2003	Peten	Calzada Mopán, Dolores	16.72594	-89.37931	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Arrollo negro chomacte, Livinston	15.85994	-89.38789	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Arrollo negro chomacte, Livinston	15.85992	-89.38747	0	0	NA
2003	Izabal	Finca Arrollo negro chomacte, Livinston	15.85994	-89.38750	0	0	NA
2003	Izabal	Finca San Luis, Aldea el Calvario	15.88956	-89.36678	0	0	NA
2003	Escuintla	Pt. Sn. Jose, Base	13.92773	-90.80498	0	0	NA
2003	Escuintla	Pt. Sn. Jose	13.92927	-90.80536	0	0	NA
2003	Escuintla	Base Naval	13.93008	-90.80620	0	0	NA
2003	Escuintla	Islas Chicalas	13.99423	-91.40544	0	0	NA
2003	Escuintla	Islas Chicalas	13.99363	-91.40400	0	0	NA
2003	Escuintla	Islas Chicalas	13.99071	-91.39725	0	0	NA
2003	Jutiapa	Garita Chapina	13.75355	-90.12106	0	0	NA
2003	Jutiapa	Garita Chapina	13.76206	-90.11759	0	0	NA
2003	Jutiapa	Garita Chapina	13.76207	-90.11761	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Conacaste	13.93374	-90.67190	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Conacaste	13.93358	-90.67192	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Conacaste	13.93364	-90.67189	0	0	NA
2003	Escuintla	Buena Vista	13.93166	-90.74498	0	0	NA
2003	Escuintla	Buena Vista	13.93165	-90.74500	0	0	NA
2003	Escuintla	Buena Vista	13.93162	-90.74496	0	0	NA
2003	Escuintla	Buena Vista	13.93150	-90.74500	0	0	NA
2003	Escuintla	Buena Vista	13.93547	-90.74680	0	0	NA
2003	Escuintla	Buena Vista	13.93545	-90.74694	0	0	NA
2003	Jutiapa	Garita Chapina	13.76709	-90.11632	0	0	NA
2003	Jutiapa	Garita Chapina	13.76711	-90.11613	0	0	NA
2003	Jutiapa	Garita Chapina	13.76771	-90.11573	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Las Lisas	13.80425	-90.26722	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Las Lisas	13.80428	-90.26741	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Las Lisas	13.80421	-90.26660	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Las Lisas	13.80412	-90.26650	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Las Lisas	13.80428	-90.26666	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2003	Santa Rosa	Las Lisas	13.80498	-90.26894	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Monte Rico	13.80487	-90.26913	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Monte Rico	13.80495	-90.26336	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Monte Rico	13.89651	-90.47951	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Monte Rico	13.89576	-90.48044	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Monte Rico	13.89561	-90.48037	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Monte Rico	13.89191	-90.47689	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Candelaria	13.89214	-90.47720	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Candelaria	13.89213	-90.47718	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Candelaria	13.89232	-90.47729	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Candelaria	13.91980	-90.55717	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Candelaria	13.91982	-90.55700	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Candelaria	13.91992	-90.55696	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Conacaste	13.93307	-90.66247	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Conacaste	13.93309	-90.66242	0	0	NA
2003	Santa Rosa	Conacaste	13.93308	-90.66239	0	0	NA
2004	Izabal	Puente Sumach	15.60477	-89.09641	0	0	0
2004	Petén	Parque Poptún	16.33395	-89.41302	0	0	0
2004	Peten	Parque Poptún	16.33395	-89.41302	0	0	0
2004	Petén	El Rancho Alegre	17.07446	-89.68478	0	0	0
2004	Petén	El Rancho Alegre	17.07446	-89.68478	0	0	0
2004	Petén	El Rancho Alegre	17.07446	-89.68478	0	0	0
2004	Petén	El Rancho Alegre	17.07446	-89.68478	0	0	0
2004	Petén	Camino a Tikal	17.07433	-89.68483	0	0	0
2004	Peten	Camino a Tikal	17.07433	-89.68483	0	0	0
2004	Petén	Machaquilá	16.39457	-89.44458	0	0	0
2004	Petén	Machaquilá	16.39457	-89.44458	0	0	0
2004	Peten	Carretera a San Luis	16.12211	-89.38058	0	0	0
2004	Petén	Carretera a San Luis	16.12211	-89.38058	0	0	0
2004	Peten	Kilómetro 333.5	16.01860	-89.30975	0	0	0
2004	Izabal	El Estor	15.52345	-89.33363	0	0	0
2004	Izabal	El Estor	15.52345	-89.33363	0	0	0
2004	Izabal	El Estor	15.52345	-89.33363	0	0	0
2004	Izabal	Finca Paraíso	15.57322	-89.19821	0	0	0
2004	Izabal	Finca Paraíso	15.57322	-89.19821	0	0	0
2004	Izabal	Finca Paraíso	15.57322	-89.19821	0	0	0
2004	Izabal	Finca Paraíso	15.57322	-89.19821	0	0	0
2004	Izabal	Finca Paraíso	15.57322	-89.19821	0	0	0
2004	Izabal	Mariscos	15.42274	-89.07928	0	0	0
2004	Izabal	Mariscos	15.42274	-89.07928	0	0	0
2004	Petén	Camino a Tikal	17.07433	-89.68483	0	0	0
2004	Petén	Machaquilá	16.39457	-89.44458	0	0	0
2004	Izabal	Punta de Palma	15.75704	-88.64481	0	1	1
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	1	1
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Punta de Palma	15.75704	-88.64481	1	1	1
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	1	0	0
2004	Izabal	Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore 2	15.78555	-88.72098	0	1	1
2004	Izabal	Baltimore 2	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore 2	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore 2	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Baltimore 2	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	1	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore-Punta Palma	15.78555	-88.72098	0	0	NA
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	1	0
2004	Izabal	Camino Punta Palma-Sto. Tomás	15.69351	-88.60865	0	0	NA
2004	Izabal	Camino Punta Palma-Sto. Tomás	15.69351	-88.60865	0	0	NA
2004	Izabal	Sto. Tomás	15.69351	-88.60865	0	0	NA
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	0	0	0
2004	Izabal	Camino Baltimore	15.78555	-88.72098	1	1	1
2005	Peten	Parque Flores	16.92840	-89.89165	0	1	NA
2005	Peten	Barrio Villa Concepción	16.91600	-89.90212	0	1	NA
2005	Peten	Aldea San Juan de Dios	16.79143	-89.95927	0	0	NA
2005	Peten	Barrio El Pedregal	16.92919	-89.91521	0	1	NA
2005	Peten	Caserío Santa Rosa La Zarca	17.14258	-89.15432	0	0	NA
2005	Peten	Barrio el Centro	17.06563	-89.15178	0	0	NA
2005	Peten	Barrio el Centro	17.06065	-89.15297	0	0	NA
2005	Peten	Aldea El Arenal	17.02170	-89.15422	0	0	NA
2005	Peten	Barrio el Centro	17.05683	-89.15281	0	0	NA
2005	Chiquimula	La Avellana	14.27905	-90.30034	0	0	NA
2005	Chiquimula	La Avellana	13.91594	-90.47625	0	1	NA
2005	Chiquimula	Finca Evergreen	13.92884	-90.47477	0	1	NA
2005	Chiquimula	Finca Media Naranja	14.00025	-90.46598	0	0	NA
2005	Chiquimula	Finca Media Naranja	14.00025	-90.46598	0	0	NA
2005	Chiquimula	Finca Media Naranja	14.00025	-90.46598	0	0	NA
2005	Chiquimula	Aldea Margarita	14.00454	-90.29210	0	0	NA
2005	Chiquimula	Chiquimula	14.78327	-89.53630	0	0	NA
2005	Chiquimula	Finca de los Suchini	14.83103	-89.52320	0	0	NA
2005	Chiquimula	Chiquimula	14.78995	-89.52655	0	0	NA
2005	Chiquimula	Centro Recreativo de Nororiente	14.77854	-89.53307	0	0	NA
2005	Chiquimula	Finca Los Chorros	14.55216	-89.29419	0	0	NA
2005	Chiquimula	Aldea Sabana Grande	14.73935	-89.55839	0	0	NA
2005	Chiquimula	San José La Arada	14.73298	-89.56484	0	0	NA
2005	Chiquimula	San José La Arada	14.72504	-89.57505	0	0	NA
2005	Chiquimula	Aldea Pastores	14.70620	-89.49673	0	0	NA
2005	Chiquimula	San Jacinto	14.68703	-89.49948	0	0	NA
2005	Peten	Parque San Francisco	16.79780	-89.93594	0	0	NA
2005	Peten	El Cartucho	16.72191	-89.64937	0	0	NA
2005	Peten	El Juleque	16.76352	-89.66212	0	0	NA
2005	Peten	El Mango	16.83065	-89.69608	0	0	NA
2005	Peten	Barrio La Ceibita	17.05631	-89.17214	0	0	NA
2005	Peten	Rancho Getzemaní	17.04867	-89.19752	0	0	NA
2005	Peten	La Pólvara	17.00838	-89.31006	0	0	NA
2005	Peten	La Máquina	16.98361	-89.41484	0	0	NA
2005	Peten	Las Viñas	16.95124	-89.48598	0	0	NA
2005	Peten	El Naranjo	16.94940	-89.57408	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
2005	Peten	Macanché	16.96345	-89.63738	0	0	NA
2005	Santa Rosa	Chiquimulilla	14.00103	-90.29210	0	0	NA
2005	Santa Rosa	Aldea El Astillero	14.00103	-90.29210	0	0	NA
2005	Santa Rosa	Aldea Poza de Agua	14.02249	-90.43157	0	0	NA
2005	Santa Rosa	Finca Buenos Aires	14.01045	-90.29597	0	0	NA
2005	Santa Rosa	Finca García	15.22311	-89.21642	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca La Vega	15.20686	-89.24328	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca El Lobo	15.18038	-89.30269	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca Mayuelas	15.13097	-89.35155	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca Panaluya I	15.04887	-89.59518	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca Panaluya II	15.05373	-89.59569	0	1	NA
2005	Zacapa	Finca Santa Cruz	15.01372	-89.67634	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca Pasabien	15.01898	-89.67958	0	0	NA
2005	Zacapa	Finca La Paz	15.00322	-89.72032	0	1	NA
2005	Zacapa	Finca El Jute	14.96932	-89.82140	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Aldea San José Churirín	14.12069	-91.66299	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Aldea Tahuexco	14.09346	-91.61957	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Aldea Chiquistepeque	14.11606	-91.65441	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Caserío Puntarenas	14.05779	-91.56213	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Aldea El Triunfo	14.06602	-91.57654	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Aldea Chicago	14.08569	-91.60936	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Playas del Semillero	14.03880	-91.52434	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Colonia El Campesino	14.26436	-91.36109	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Playas de Tecojate	13.97692	-91.36072	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Aldea Nahualate	14.43636	-91.37539	0	0	NA
2005	Peten	Chacté	16.09752	-89.35825	0	0	NA
2005	Peten	Las Cañas	16.04671	-89.33902	0	0	NA
2005	Peten	Barrio Los Pinos	16.38721	-89.44835	0	0	NA
2005	Peten	Barrio Santa Bárbara	16.39066	-89.44908	0	0	NA
2005	Peten	Parcelamiento Cruce de Poite	16.18294	-89.23772	0	1	NA
2005	Peten	El Chal	16.64923	-89.64640	0	1	NA
2005	Peten	Aldea San Juan	16.62747	-89.60076	0	1	NA
2005	Peten	Aldea San Juan	16.62731	-89.60112	0	1	NA
2005	Peten	Aldea El Ocote	16.68582	-89.56700	0	1	NA
2005	Peten	Aldea La Puente	16.62626	-89.55385	0	1	NA
2005	Peten	Aldea Sabanetas	16.59198	-89.50913	0	0	NA
2005	Peten	Aldea Sabanetas	16.59230	-89.50956	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Finca San José Quila	14.53303	-91.47445	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Finca San Agustín	14.54804	-91.43812	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Finca Las Ilusiones	14.51377	-91.41499	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Ingenio Palo	14.48093	-91.39628	0	0	NA

Año	Departamento	Lugar	Latitud	Longitud	Resultados de la PCR		
					Universal	Anidada	Específica
		Gordo					
2005	Suchitepequez	Finca Palafox	14.44669	-91.38490	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Cuarta Brigada Militar	14.54378	-91.55818	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Finca San Andrés	14.53416	-91.49696	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Cantón Guachipilín	14.53639	-91.53649	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Finca La Esmeralda	14.54213	-91.33488	0	0	NA
2005	Suchitepequez	Finca Los Encantos	14.49107	-91.35026	0	0	NA
2005	Retalhuleu	Retalhuleu	14.53938	-91.67087	0	0	NA
2005	Retalhuleu	Las Maduras	14.24851	-91.83258	0	0	NA
2005	Retalhuleu	Las Palmas	14.70559	-92.00464	0	0	NA
2005	Retalhuleu	La Blanca	14.53882	-92.08189	0	0	NA
2005	Retalhuleu	ECA	14.53882	-92.08189	0	0	NA
2005	Retalhuleu	Finca Los Brillantes	14.55682	-91.62165	0	0	NA
2005	Retalhuleu	Parcela C-88	14.28114	-91.65522	0	0	NA
2005	Retalhuleu	La Barona	14.16023	-91.72212	0	0	NA
2005	Retalhuleu	San Sebastián	14.56731	-91.66647	0	0	NA
2005	Izabal	Cabo Tres Puntas	15.95918	-88.58129	0	0	0
2005	Izabal	Livingston	15.81974	-88.76970	1	1	1
2005	Izabal	Punta de Manabique	15.96419	-88.59606	0	0	0
2005	Izabal	Playa Blanca	15.86857	-88.87364	1	1	0
2005	Izabal	Estero Lagarto	15.93417	-88.60111	1	1	1
2005	Izabal	Cabo Tres Puntas	15.96187	-88.58666	0	0	0
2005	Izabal	Punta de Manabique	15.95710	-88.62028	0	0	0
2005	Izabal	Punta de Manabique	15.95514	-88.61979	1	1	1
2005	Izabal	Siete Alatares	15.86754	-88.81941	0	0	0
2005	Izabal	Estero Lagarto	15.93108	-88.59475	0	1	0
2005	Izabal	Estero Lagarto	15.92893	-88.59327	1	1	1
2005	Izabal	Cabo Tres Puntas	15.88765	-88.54802	1	1	0
2005	Izabal	Sarstún	15.88767	-88.92020	1	1	0
2005	Izabal	Sarstún	15.89117	-88.91659	1	1	1
2005	Izabal	Siete Alatares	15.85596	-88.78910	1	1	1
2005	Izabal	Yohoja	15.79476	-88.70261	1	1	1
2005	Izabal	Icacal	15.55584	-88.98719	0	0	0
2005	Izabal	Punta Caimanes	15.58935	-89.07086	0	0	0
2005	Izabal	La Ensenada	15.58134	-89.18396	0	0	0
2005	Izabal	Mariscos	15.42490	-89.08523	0	0	0
2005	Izabal	Castillo San Felipe	15.63533	-88.99629	1	1	1