

Interacciones planta-patógeno-vector-ambiente en el amarillamiento letal del cocotero

AUTORES



Carlos Oropeza;
Daniel Zizumbo; Luis Sáenz;
Maria Narvaez; Ivan Cordova
Centro de Investigación Científica
de Yucatán (CICY), Mérida, México

Nigel Harrison
University of Florida,
Fort Lauderdale, EE.UU

Maria Mercedes Roca
Escuela Agrícola Panamericana,
Zamorano, Honduras

Wayne Myrie
Coconut Industry Board (CIB),
Kingston, Jamaica

Michel Dollet; Jean-Luc Dzido
Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique
pour le Développement (Cirad),
Montpellier, France

Ramón Castillo
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales Agrícolas y Pecuarias
(Inifap), Tabasco, México

Carlos F. Ortiz
Colegio de Postgraduados
Campus-Tabasco, Tabasco, México

Palabras CLAVE

Amarillamiento letal, Fitoplasmas,
Vectores homópteros, Cocotero,
Palmas y otras plantas hospedadas.

Lethal yellowing, phytoplasmas,
homopteran vectors, coconut, palm
and non-palm hosts

Plant-pathogen-vector-environment interactions in coconut lethal yellowing disease

Resumen



El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad destructiva que afecta principalmente al cocotero (*Cocos nucifera*) y otras palmas en partes de la región Caribe. Se atribuye a fitoplasmas del grupo 16SrIV compuesto de varias cepas. Los fitoplasmas son transmitidos por insectos chupadores a por lo menos 38 especies de palmas, algunas de las cuales permanecen asintomáticas y pueden servir como fuentes prolongadas de inóculo. Se han reportado dos patrones de propagación en plantaciones de coco en Jamaica, Florida y México. Uno de ellos se caracteriza por el desarrollo de la enfermedad inicialmente en solo una o dos palmas, seguido por la aparición de nuevos casos dentro de un radio equivalente a dos palmas, y el otro involucra un “salto” de la propagación de 70 km o más. La forma más efectiva de combatir el AL ha sido el uso de germoplasma resistente identificado en ensayos de selección implementados en diferentes países. Cuando se combina con varias prácticas culturales, como por ejemplo monitoreo diario de síntomas, oportuna eliminación y destrucción de palmas afectadas, y eliminación de malezas, el manejo satisfactorio de la enfermedad parece ser posible.

Abstract

Lethal yellowing (LY) is a very destructive disease that primarily affects coconut (*Cocos nucifera*) as well as other palm species in parts of the Caribbean region. LY is attributed to phytoplasmas within the 16SrIV group comprising several strains. *Phytoplasmas* are transmitted by sap feeding insects to at least 38 palm species some of which remain symptomless and might serve as protracted sources of inoculums. Two patterns of disease spread have been reported within coconut groves in Jamaica, Florida and



Mexico. One pattern is characterized by disease development on one or two palms only at first, followed by the appearance of new nearby cases in a radius equivalent to two palms. As LY progresses, new aggregates form locally that eventually coalesce resulting in uniform distribution of the disease. A second pattern involves a jump spread of a few to 70 km or more. The most effective way to combat LY has been the use of resistant germplasm that has been identified in screening trials implemented in different countries. When combined with various cultural practices such as daily monitoring of symptoms, prompt removal and destruction of affected palms and elimination of weeds, satisfactory management of LY seems to be possible



Introducción

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) se encuentra ampliamente distribuido en todo el trópico húmedo, ocupando más de 12 millones de hectáreas. Es un cultivo perenne muy importante, por su contribución sustancial a la seguridad alimentaria, a una mejor nutrición, y porque genera empleo y es fuente de ingresos.

Es una especie monoespecífica que consta de numerosos ecotipos e híbridos, todos con propiedades agronómicas deseables, incluyendo fibra, concha, nuez y agua. Existe una gran diversidad étnica en las formas en que los diferentes recursos del cocotero se producen y se usan (Foale, 2005). Con frecuencia se le llama “el árbol de la vida”, debido a los múltiples usos que se han desarrollado para todas las partes de la palma. Los usos más recientes de importancia económica incluyen productos a base de fibra para la industria automotriz; carbón activado; aceite virgen; agua embotellada, y aceite para la producción de biodiésel de coco. En el año 2006, en Filipinas se instaló una planta industrial para la producción de 75 millones de litros/año de biodiésel de coco que se usa como aditivo (Lao, 2009). Se ha comprobado que una mezcla de 2% de aceite de coco con diésel reduce las emisiones nocivas de escape (índice de opacidad) hasta en 63% (Lao, 2008).

A pesar del creciente potencial económico del cocotero, existen tres limitaciones importantes para la producción sostenible de esta especie de palma, que son la falta de variedades adaptadas de alto rendimiento, baja productividad de los agricultores, y bajo nivel de rendimiento debido a las constantes amenazas de

plagas y enfermedades, erosión genética y situaciones adversas como huracanes y sequías (Batugal, 1999).

Entre las enfermedades, la más destructiva es el amarillamiento letal causado por fitoplasmas. La distribución geográfica del AL se limita a partes de la región Caribe y la costa Atlántica del continente Americano, donde ha destruido millones de cocoteros y otras especies de palmas en los últimos 50 años.

La investigación para combatir el amarillamiento letal se ha venido intensificando desde los años setenta, de manera que se pueda adquirir el conocimiento fundamental para entender la enfermedad y, en consecuencia, desarrollar medidas prácticas para su control sostenible. Este documento presenta una reseña de la investigación sobre las interacciones planta-patógeno-vector-ambiente asociadas con el amarillamiento letal.

Historia y distribución geográfica del amarillamiento letal

Se conocen descripciones de los síntomas de amarillamiento letal en cocotero desde finales del siglo XIX en la región Caribe (Eden-Green, 1997), pero la primera devastación generalizada del cultivo debido a la enfermedad ocurrió en Jamaica durante la década del sesenta (Been, 1991). Informes posteriores de comenzaron a surgir en otros países, incluyendo Estados Unidos (McCoy *et al.*, 1983), México (Oropeza y Zizumbo, 1997), Belice (Eden-Green, 1997a), Honduras (Ashburner *et al.*, 1996), Guatemala (Mejia *et al.*, 2004), y otras islas del Caribe incluyendo Bahamas, Islas Caimán (Eden-Green, 1997a), Cuba (Llauger *et*

al., 2002), Haití (Leach, 1946), República Dominicana (Martínez et al., 2007) y Nevis en las Islas Leeward (Myrie, et al., 2006).

Además de Jamaica, se han presentado brotes de AL en la Florida, Honduras y México. Enfermedades similares conocidas colectivamente como “Enfermedades tipo amarillamiento letal” también se han descrito en otras partes del trópico. En África occidental: Marchitez Awka, en Nigeria (Ekpo y Ojomo, 1990); Marchitez Cape St. Paul, en Ghana (Dery y Philippe, 1997); Kaïncopé, en Togo (Dabek et al., 1976), y Kribi, en Camerún (Dollet et al., 1977). En África oriental: Enfermedad letal, en Kenia, Tanzania y Mozambique (Mpunami et al., 1999; Schuiling y Mpunami, 1990). En el sureste asiático: Marchitez Kalimantan, en Kalimantan Central; Marchitez natura, en las Islas Natura, y Marchitez malaya, en la Península de Malasia (Eden-Green, 1997b; Jones et al., 1999; Warokka, 1999). Las enfermedades de tipo amarillamiento letal también han destruido millones de palmas causando grandes pérdidas, particularmente en Ghana y Tanzania (Schuiling et al., 1992). Por tanto, AL y EAL son una amenaza cada vez mayor para la producción mundial de coco. Más información sobre las enfermedades de tipo amarillamiento letal se puede encontrar en Allorerung et al. (1999) y Legoupil (2009).

El agente causal

Identificación del agente causal

Un fitoplasma (Figura 1a) es la causa aceptada del amarillamiento letal con base en su consistente detección en palmas enfermas pero no en palmas sanas, por medio de microscopía electrónica (ME) (Plavsic-Banjac et al., 1972; Thomas, 1979); la remisión de los síntomas en palmas en respuesta a la terapia antibiótica con tetraciclina, pero no con penicilina (McCoy et al., 1982), y la ausencia de otros patógenos.

Los fitoplasmas (previamente conocidos como organismos similares a micoplasmas) son bacterias incultivables sin pared celular de la clase *Mollicutes* (IRPCM, 2004) con pequeños genomas entre 530 y 1350 kb en tamaño (Marcone et al., 1999), y un contenido de ADN rico en A+T de 23 a 29.5 Mol% (Kollar y Seemüller, 1989). En el caso del fitoplasma del amarillamiento letal, el tamaño estimado del genoma es 650 kb (Davis y Konai, 1991). Los fitoplasmas colonizan los elementos cribosos del floema de las plantas y aparecen en

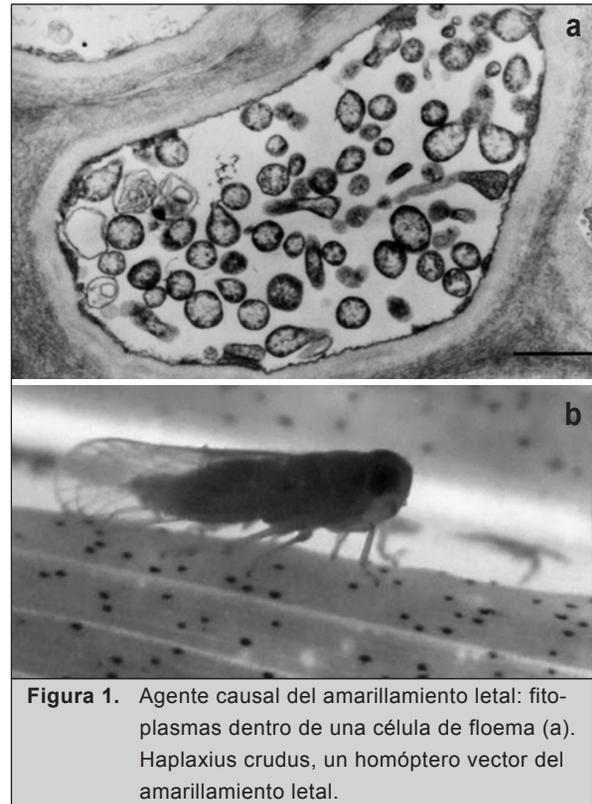


Figura 1. Agente causal del amarillamiento letal: fitoplasmas dentro de una célula de floema (a). *Haplaxius crudus*, un homóptero vector del amarillamiento letal.

forma de granos o filamentos o ramificados cuando se observan por medio de un microscopio electrónico de transmisión (Thomas, 1979; Waters y Hunt, 1978). Los fitoplasmas también son parásitos intracelulares de insectos que se alimentan del floema que los adquieren o transmiten durante su actividad alimentaria (Weintraub y Beanland, 2006).

Diversidad del patógeno

Recién se han identificado también cepas de fitoplasma estrechamente relacionadas, pero diferentes, con el agente causal del amarillamiento letal. Varias de estas cepas se han clasificado por medio de tipificación rADN RFLP y, con base en esto, se asignaron al grupo 16SrIV como miembros de subgrupo (Lee et al., 1998). En la actualidad, el grupo 16SrIV comprende los siguientes subgrupos de cepas: 16SrIV-A, amarillamiento letal del cocotero; 16SrIV-B, decaimiento letal del cocotero en Yucatán (LDY); 16SrIV-C, decaimiento letal del cocotero en Tanzania (LDT); 16SrIV-D, amarillamiento de la hoja *Carludovica palmata* (CPY) (Cordova et al., 2002) y Texas Phoenix decline (TPD) (Harrison et al., 2002b), y 16SrIV-F, enfermedad letal de *Washingtonia robusta* (Harrison et al., 2008).



Los grupos y subgrupos de fitoplasmas definidos por tipificación RFLP han sido ampliamente apoyados por clasificaciones basadas en análisis filogenético de genes del ARN ribosomal 16S (Gundersen *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000). Este último enfoque se ha adoptado como base para una taxonomía formal de fitoplasmas (IRPCM, 2004). Dentro del clase de fitoplasmas, se han resuelto 32 subclases distintos (especies putativas) de fitoplasmas (Seemüller *et al.*, 2002) para los que actualmente se están asignando nombres de especies bajo el carácter provisional de 'Candidatus' (IRPCM, 2004). El agente causal del amarillamiento letal, propuesto como un tipo de cepa del subclase vii (Gundersen *et al.*, 1994) para el que se ha sugerido el nombre de 'Ca. Phytoplasma palmae' (IRPCM, 2004), consta de dos linajes distintos. Un linaje está compuesto únicamente de cepas del subgrupo 16SrIV-A que induce síntomas típicos del amarillamiento letal en cocotero y otras especies de palma (McCoy *et al.*, 1983) y la monocotiledónea arborescente, *Pandanus utilis* (*Pandanaceae*) (Thomas y Donselman, 1979). Un segundo linaje está compuesto de cepas que inducen síntomas atípicos de amarillamiento letal (como, por ejemplo, síndromes de decaimiento letal y amarillamiento de la hoja) en cocotero en el sur de México (Harrison *et al.*, 2002b); decaimiento letal (TPD) de la palma de dátil de las Islas Canarias (*Phoenix canariensis*) en Corpus Christi, al sur de Texas (Harrison *et al.*, 2002c); amarillamiento de la hoja y decaimiento (CPY) de la monocotiledónea arborescente *C. palmata* (*Cyclanthaceae*) en el sur de México (Cordova *et al.*, 2002), y el decaimiento letal (KPD) de la palma *Kentia* (*Howea forsteriana*) en el sur de la Florida.

Interacción de los fitoplasmas con las plantas hospederas

Período de incubación

Los estudios del ecotipo del cocotero Alto del Atlántico altamente susceptible han mostrado que la infección de la planta por el patógeno del amarillamiento letal es seguida por un período asintomático de incubación. En estudios basados únicamente en el desarrollo de síntomas, la duración estimada del período de incubación fue de 210-450 días en palmas maduras (Heinze *et al.*, 1972; Romney, 1972) y 112-262 días en palmas jóvenes sin frutos (Dabek, 1975). Más recientemente,

utilizando muestreos mensuales de tejidos del tronco y análisis PCR para detección de fitoplasmas para monitorear una población de 400 palmas maduras en un área afectada por la enfermedad en el sureste de México, se encontró que pasaron de 1 a 4 meses entre la primera detección positiva del patógeno y la aparición de síntomas visibles en la mayoría de las palmas estudiadas (Canche *et al.*, 2001).

Síntomas visuales

Después de un período de incubación, el primer síntoma visual de la infección de amarillamiento letal en palmas con frutos es la caída prematura de la mayoría de los frutos, independientemente de su estado de desarrollo (Figura 2a). El siguiente síntoma que aparece es el ennegrecimiento de las inflorescencias nuevas (figuras 2b y 2c). Este síntoma es el más aparente ya que la inflorescencia primero emerge de la espata. Las inflorescencias afectadas generalmente muestran necrosis parcial, pero a medida que la enfermedad progresa, las nuevas inflorescencias muestran una necrosis más extendida. Como resultado, la mayoría de las flores masculinas mueren y no producen fruto. El amarillamiento de las hojas generalmente comienza una vez que la necrosis de dos inflorescencias se ha desarrollado. El patrón de la decoloración de las hojas debido al amarillamiento letal es más rápido que la decoloración causada por la senescencia normal de las hojas. El amarillamiento aparece primero en las hojas de abajo (las más viejas) (Figura 2d), luego progresa hacia arriba involucrando sucesivamente hojas más jóvenes en el medio (Figura 2e) y la copa de la palma (Figura 2f). Las hojas amarillas eventualmente se tornan color café, se secan y mueren.

Cuando el amarillamiento llega a un estado avanzado, ocurre una pudrición blanda en la base de la hoja más joven (flecha). La hoja flecha colapsa e invariablemente ocurre una pudrición del meristema apical subyacente, después de lo cual todo el cogollo perece y cae de la palma, dejando un tronco desnudo en pie (Figura 2g). Las palmas infectadas generalmente mueren entre 3 y 6 meses después de la aparición de los síntomas visibles (Harrison y Jones, 2003; McCoy *et al.*, 1983). Se han observado variaciones de este síndrome. Ocasionalmente la hoja bandera o flecha muestra un amarillamiento prematuro (McCoy *et al.*, 1983). A veces la necrosis de la inflorescencia aparece única-



Figura 2. Síntomas de amarillamiento letal en orden de aparición: caída prematura de los frutos (a); ennegrecimiento de inflorescencias nuevas, antes de emerger de la espata (b) y después (c); amarillamiento de la hoja bajera más vieja (d), del medio (e) y hojas jóvenes superiores (f); finalmente el cogollo parece decaído dejando el tronco desnudo (g).

mente después del amarillamiento de la hoja, como se ha observado en Guatemala (Mejía *et al.*, 2004). Además de estos síntomas aéreos, las raíces también muestran necrosis, que se va extendiendo a medida que la enfermedad progresa (Islas *et al.*, 1999).

En general, los síntomas del amarillamiento letal en otras especies de palmas son similares en apariencia y progresión, pero existen variaciones (McCoy *et al.*, 1983). Los síntomas en cocoteros afectados por enfermedades tipo amarillamiento letal en África Occidental y Tanzania son similares a los descritos para amarillamiento letal en el continente Americano (Mpunami *et al.*, 1999).

Distribución y multiplicación del patógeno en la planta hospedera

Los primeros estudios sobre la distribución de fitoplasmas en palmas afectadas por el amarillamiento letal utilizando técnicas de microscopía (ME o tinción de DAPI) revelaron su presencia en el ápice del tallo, inflorescencias no expandidas y en las puntas de las raíces (Parthasaraty, 1974; Deutsch y Nienhaus, 1983). Se obtuvieron resultados posteriores similares utilizando sondas de ADN (Harrison *et al.*, 1992; 1994; Escamilla *et al.*, 1995) o PCR (Harrison *et al.*, 1994). Esta última técnica también permitió la detección positiva en tejidos del tallo (Harrison *et al.*, 1999).



Los análisis recientes por PCR de varias partes de las palmas afectadas por amarillamiento letal en diferentes estados de desarrollo de la enfermedad (sintomáticas y asintomáticas), mostraron diferencias en el porcentaje de detecciones de fitoplasma entre las diferentes partes (Cordova, 2000). Ciertas partes (tronco, hojas jóvenes, inflorescencias, ápice del tallo y puntas de las raíces) produjeron una mayor proporción de positivos que otras partes (hojas maduras y raíces sin puntas) mientras que no se obtuvieron positivos en hojas maduras. También se observó un patrón asociado con el desarrollo de la enfermedad. El porcentaje de detección fue más bajo en palmas infectadas asintomáticas en todas sus partes con excepción del tallo, en el que las acumulaciones de fitoplasma se detectaron antes de la aparición de síntomas visibles.

A medida que se desarrollaban los primeros síntomas, los porcentajes de detección alcanzaron el máximo en el momento de la aparición de inflorescencias necróticas y luego disminuyeron durante los últimos estados de desarrollo de la enfermedad (amarillamiento progresivo de las hojas). En el caso del tallo de la palma, el porcentaje de detecciones por PCR fue del 100% durante toda la duración del estudio. Este patrón de detección entre las partes parece consistente con la hipótesis previamente propuesta por Parthasarathy (1974) y Zimmerman (1979) de que los fitoplasmas se mueven de los tejidos que son fuente de fotosintatos a tejidos de demanda por medio del floema como resultado de un proceso de flujo de masa.

Cambios bioquímicos y fisiológicos en palmas afectadas por el amarillamiento letal

Se midieron las concentraciones de proteína, tasas de respiración (Islas *et al.*, 1999) y concentraciones de carbohidratos (Maust *et al.*, 2003) en las raíces en varios estados de desarrollo de la enfermedad. Los tres indicadores fisiológicos fueron más bajos en palmas infectadas asintomáticas que en palmas no infectadas, y siguieron disminuyendo a medida que los síntomas se intensificaron en las palmas. Al principio no se presentaron síntomas visuales evidentes en las raíces de palmas asintomáticas pero infectadas, hasta la aparición del amarillamiento de las hojas cuando se observó necrosis en los tejidos (Islas *et al.*, 1999). En las partes aéreas también se observaron cambios tempranos. Se observaron reducciones en conductancia estomática en palmas asintomáticas (incubando

(Maust *et al.*, 2003) y fue casi totalmente suprimida antes de la aparición del amarillamiento de las hojas (Leon *et al.*, 1996). Las tasas fotosintéticas también se redujeron en palmas infectadas asintomáticas, mientras que las concentraciones de azúcar y almidón en las hojas intermedias y superiores fueron más altas que en palmas no infectadas. Estas dos tendencias aumentaron continuamente a medida que los síntomas se intensificaron en las palmas (Maust *et al.*, 2003) en contraste con las reducciones en los niveles de azúcar y almidón en las raíces. Estas diferencias juntas sugieren que el transporte de fotosintatos en el floema de palmas enfermas fue afectado (Maust *et al.*, 2003). Asimismo, se reportó una reducción en la corriente de transporte del xilema en cocotero debido al amarillamiento letal, atribuida al cierre anormal de los estomas (Eskafi *et al.*, 1986). Otros cambios medibles que ocurren durante la fase de decoloración foliar del desarrollo de la enfermedad incluyen reducciones en proteína foliar, carotenoides y contenido de clorofila (Leon *et al.*, 1996), todos indicadores de senescencia prematura de las hojas.

Matteoni y Sinclair (1983) sugirieron que un desequilibrio hormonal puede estar involucrado en la respuesta de las plantas a enfermedades causadas por fitoplasmas. Los síntomas del amarillamiento letal, como la caída prematura de los frutos (desprendimiento del fruto), cierre estomático y senescencia de las hojas, pueden explicarse por un desequilibrio hormonal.

En general, el desprendimiento de los frutos puede ser estimulado por el etileno (Henderson y Osborne, 1994) y está bien documentado que el cierre estomático puede ser inducido por el ácido abscísico (ABA) (Davies y Jones, 1991; Jones y Mansfield, 1970; Zhang *et al.*, 1987) o niveles reducidos de citocininas (Davies y Zhang, 1991). La senescencia de las hojas puede ser inducida por etileno (Aharoni 1989; Alejar *et al.*, 1988; Matoro & Aharoni 1988) y ácido abscísico (Norden 1988), o niveles reducidos de citocininas (Singh *et al.*, 1992). Un estudio realizado por Dabek y Hunt (1976) indica que las hojas en palmas afectadas por el amarillamiento letal contienen niveles reducidos de citocininas, giberelinas y auxinas. El tratamiento de palmas de coco asintomáticas con el agente liberador de etileno, etefón, indujo la caída prematura del fruto y la senescencia de las hojas, y ocurrió un aumento en la actividad de la enzima que produce etileno antes

de comenzar el amarillamiento en palmas de coco afectadas por la enfermedad (Leon et al., 1996).

También se midió el contenido de ácido abscísico de las hojas y la savia del xilema foliar y se encontró que aumenta en palmas enfermas, pero únicamente después de suprimida la conductancia estomática (Martinez et al., 2000). Por otro lado, se encontró que el contenido de citocininas tipo Z y tipo iP disminuyó drásticamente en hojas de palmas afectadas por el

Los hallazgos sugieren que estas especies de palmas y otras plantas de sotobosque pueden servir como reservorio de inóculo.

amarillamiento letal durante los estados tempranos de desarrollo de síntomas, mientras que en las raíces el contenido de citocininas tipo Z también disminuyó, pero el de las citocininas tipo iP aumentó (Aguilar et al., 2009). Infortunadamente, los análisis en este estudio se realizaron antes de la aparición de los síntomas.

Colectivamente, estos resultados sugieren que un desequilibrio fitohormonal puede estar asociado con el comienzo de por lo menos algunos de los síntomas, como la caída de los frutos y la senescencia de las hojas que invariablemente están asociados con el amarillamiento letal en cocotero.

Otras especies de plantas hospederas

En la Florida, donde crece una gran diversidad de palmas ornamentales, se sabe que por lo menos 35 especies de palmas, además del ecotipo Alto Atlántico (AT), son afectadas por el amarillamiento letal (Harrison y Oropeza, 2008). Para la mayoría de estas especies no hay suficiente información como para evaluar adecuadamente su relativa susceptibilidad. Las pocas excepciones incluyen *Adonidia merrillii*, *Phoenix dactylifera* y *Pritchardia* sp. que han sufrido pérdidas sustanciales a lo largo del tiempo y no se recomiendan para uso ornamental. De igual manera, estas tres especies han demostrado ser las más susceptibles en Yucatán, además del ecotipo AT.

Existen otras especies de palma y otras plantas que ocasionalmente han resultado positivas para amarillamiento letal causado por fitoplasmas y pueden o no mostrar síntomas similares al amarillamiento letal. En un estudio exhaustivo de vegetación de sotobosque en plantaciones de cocotero en Jamaica, se encontró que ocho especies contenían fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal (16SrIV) pero no desarrollaban síntomas. Estas especies incluyen: *Emilia fosbergii*, *Synedrella nodiflora* y *Vernonia cinerea*, (Brown et al., 2008a, 2008b). Asimismo, en México se han detectado fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal por análisis PCR en varias especies de palmas diferentes al cocotero. El agente causal del amarillamiento letal, una cepa del subgrupo 16SrIV-A se encontró en *Thrinax radiata* y *Cocothrinax redii*, dos palmas que están ampliamente distribuidas a lo largo de las costas de la península de Yucatán (Narvaez et al., 2006).

Un estudio en curso de tres años sobre mortalidad en una población de *T. radiata* reveló que algunas palmas infectadas desarrollaban síntomas y morían, mientras que otras palmas infectadas sobrevivieron y eventualmente la infección desapareció. Además, la incidencia de la infección disminuyó en palmas *T. radiata* a medida que el tamaño de la población aumentaba (CICY, México 2008, no publicado). En Honduras se encontraron fitoplasmas del grupo del amarillamiento letal en palma coyol (*Acrocomia aculeate*) (Roca et al., 2006). En un hallazgo más reciente en Yucatán, se encontró un fitoplasma del grupo palmas del amarillamiento letal muy similar al agente causal de la enfermedad "Texas *Phoenix* decline," una cepa del subgrupo 16SrIV-D, (Harrison et al., 2002b), en palmas asintomáticas *Sabal mexicana* (CICY, México 2008, no publicado). En conjunto, estos hallazgos sugieren que estas especies de palmas y otras plantas de sotobosque pueden servir como reservorio de inóculo y ayudar a explicar por qué las enfermedades de tipo amarillamiento letal persisten en las regiones afectadas.

Interacciones vector-patógeno-planta

Identificación del vector

Cuando el agente causal del amarillamiento letal fue descubierto, la búsqueda de un vector se enfocó en especies de *Auchenorrhyncha*, un suborden



de Homóptera al que pertenecen la mayoría de los vectores asociados con enfermedades causadas por fitoplasmas (Tsai, 1979). Estudios realizados en áreas afectadas por amarillamiento letal en Jamaica (Schuiling, 1976; Schuiling *et al.*, 1976), y la Florida (Howard, 1980a; Howard y McCoy, 1980; Howard y Mead, 1980), determinaron que la única especie común encontrada en palmas de cocotero en los dos sitios era el cixido *Myndus crudus*. Posteriormente se demostró que la tasa aparente de propagación del amarillamiento letal disminuyó en áreas donde las poblaciones de *M. crudus* se redujeron con insecticidas (Howard & McCoy, 1980) y que las poblaciones de *M. crudus* eran 40 veces más altas en áreas fuertemente afectadas que en áreas libres de la enfermedad en la Florida (Howard 1980b).

Cuando palmas de cocotero y otras palmas encerradas en jaulas a prueba de insectos se expusieron a adultos de *M. crudus* recolectados en áreas de palmas afectadas por el amarillamiento letal, la transmisión de la enfermedad a la mayoría de las palmas de la prueba ocurrió dentro de un período de 34 meses, mientras que palmas similares protegidas contra *M. crudus* permanecieron sanas (Howard *et al.*, 1982). El perfeccionamiento de los experimentos de transmisión dio por resultado transmisiones más eficientes del amarillamiento letal a palmas jóvenes (Howard *et al.*, 1984). Más recientemente se reportó la detección por PCR de infección de fitoplasma en *M. crudus* nativa en la Florida (Harrison y Oropeza, 1997). Estos estudios juntos indican la importancia de este patógeno como un vector del amarillamiento letal en la Florida.

Comenzaron a surgir pruebas del papel de *M. crudus* como vector más allá de la Florida. En México se desarrolló un sistema *in vitro* para probar la transmisión del vector. El sistema consiste en un contenedor cerrado con una plántula adentro en un ambiente altamente controlado. *M. crudus* capturados en palmas se introdujeron en este sistema y varias de las plántulas expuestas a insectos adquirieron el patógeno con base en confirmación por análisis PCR de ambas plantas e insectos después de la inoculación (CICY, México, 2009, no publicado). Además, hoy día se están realizando estudios de transmisión en campo con jaulas. Después del análisis de más de 800 individuos de *M. crudus* capturados en Yucatán en sitios

infectados con amarillamiento letal, se obtuvieron detecciones positivas en aproximadamente 3% de los insectos de prueba (CICY, México 2009, no publicado). En Jamaica también se han detectado fitoplasmas relacionados con el amarillamiento letal tanto en *M. crudus* como en *Cedusa* spp, recolectados de palmas de cocotero en sitios afectados por la enfermedad (Brown *et al.*, 2006). Estos resultados apoyan el papel de *M. crudus* como un vector en México y Jamaica, y sugieren que otras especies vectores pueden estar involucradas en la diseminación de la enfermedad. Además, en sitios afectados por el amarillamiento letal en el sur de México, se encontró que el número de individuos de *M. crudus* en palmas de cocotero era varias veces menor que el de muchas otras especies de homópteros (Escamilla *et al.*, 1994). Estudios de entomofauna en México han detectado varias especies de homópteros asociados con las palmas de cocotero (Julia *et al.*, 2007) y su evaluación como vectores del amarillamiento letal está en curso.

Biología del vector pertinente a la enfermedad

En relación con las condiciones ambientales que favorecen las poblaciones del vector, se han hecho estudios de campo de poblaciones de *M. crudus* en pasto San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*), pasto bahía (*Paspalum notatum*) y pasto bermuda (*Cynodon dactylon*). El *M. crudus* completó su desarrollo en todas las tres especies de pastos, pero se recolectó un número significativamente más alto de adultos y ninfas en el San Agustín (Reinert, 1980). Se encontró una mayor proporción de machos durante los picos de población de adultos (Reinert, 1980). En otro estudio, se probaron los diferentes pastos usando el San Agustín como estándar; el número de individuos de *M. crudus* capturados en trampas en este pasto fue por lo menos cinco veces mayor que el número de individuos capturados en otros, incluyendo los pastos palisade grass (*Brachiaria brizantha*), Rhodes grass (*Chloris gayana*) y una selección de limpo grass (*Hemarthria altissima*) (Howard, 1990). Los pastos, y particularmente el San Agustín, pueden estar favoreciendo la incidencia del amarillamiento letal. Por tanto, su manejo en plantaciones de palma representa un método potencial de control de poblaciones de *M. crudus* y, en consecuencia, para la reducción de la propagación de la enfermedad (Howard, 1990).

Vías alternativas de propagación de la enfermedad

La propagación de los fitoplasmas causantes del amarillamiento letal no necesariamente requiere un insecto. Se ha considerado la posibilidad de una transmisión indirecta mediante embriones infectados en semillas de palmas maduras después de que ADN de fitoplasma fuera detectado usando técnicas moleculares en embriones de frutos de palmas de cocotero del ecotipo Alto Atlántico afectadas por el amarillamiento letal (Cordova, 1994; Harrison et al., 1995).

En cortes de tejidos de embriones infectados se demostró, por PCR *in situ*, que la distribución del ADN de fitoplasma se localiza en áreas correspondientes a la plúmula y capas de células adyacentes (Cordova et al., 2003). Posteriormente se demostró la presencia

La propagación de los fitoplasmas causantes del amarillamiento letal no necesariamente requiere un insecto.

de ADN de fitoplasma en embriones de frutos en diferentes estados de desarrollo en palmas de cocotero infectadas con amarillamiento letal (Chumba, 2003). Además, cuando se investigó la germinación de los embriones, la proporción de embriones germinados de palmas enfermas fue menor (60,5%) que la de los embriones de palmas asintomáticas (74%), presumiblemente palmas sanas (Chumba, 2003). De igual manera, Nipah et al. (2007) reportaron recientemente la detección de ADN de fitoplasma en embriones de palmas de cocotero con la enfermedad conocida como marchitez del Cabo St. Paul (CSPWD). Sin embargo, en contraste con hallazgos anteriores, la proporción de embriones germinados de palmas enfermas (71%) fue más alta que la de palmas sanas (50,6%). Por otro lado al analizar por PCR plantas obtenidas de la generación de nueces o de la germinación *in vitro* de embriones, no se ha reportado ningún caso de detección positiva (Chumba, 2003;

Nipah et al., 2007). Dado que el número de plantas analizadas hasta la fecha es reducido, será necesario continuar estudiando este tema.

Interacciones ambientales

Patrón espacio-temporal de la propagación del amarillamiento letal

La mayoría de lo que se sabe acerca de la propagación del amarillamiento letal se ha aprendido de estudios de sus efectos en poblaciones de cocotero Alto Atlántico altamente susceptibles. A raíz de un brote inicial de la enfermedad, se han observado dos patrones de propagación. Uno involucra un centro localizado o foco de infección que se desarrolla en una o dos palmas únicamente, seguido de la aparición de nuevos casos al azar alrededor del centro inicial, extendiendo así la propagación local. El otro patrón involucra un "salto de la propagación" a distancias de 70 km o más (Carter, 1964), seguido por la aparición de nuevos focos de la enfermedad y el establecimiento de la propagación localizada.

El "salto" de la propagación es característico de la diseminación de la enfermedad por un vector volador. Se han observado diferencias en las distancias de dispersión de la enfermedad en diferentes sitios. En el sur de la Florida, la propagación de la enfermedad de Miami a Palm Beach, una distancia de alrededor de 128 km, ocurrió en un período de tres años (McCoy et al., 1983). En Jamaica, sin embargo, la enfermedad requirió cerca de 60 años para propagarse del oeste al extremo este de la isla, una distancia de unos 238 km. En México, la enfermedad se propagó aproximadamente 900 km hacia el oeste del área Cozumel-Cancún, donde se observó por primera vez en 1979, a la frontera Campeche-Tabasco en un período de 15 años (Oropeza y Zizumbo, 1997).

McCoy (1976) estudió la propagación de la enfermedad y la tasa aparente de infección durante la aparición de un brote en zonas urbanas de Miami en el condado de Dade (Florida) a comienzos de la década del setenta. Allí se observó que después de una fase de retraso inicial, el número de palmas enfermas aumentó en forma logarítmica. Se estimó que cada palma de cocotero afectada en un foco primario de infección sirvió para infectar otras 4,6 palmas durante los primeros ocho meses del brote, y otras 9,3 palmas en un período de



dos años. De la población original estimada de 350.000 palmas de coco, el 0,015% ya estaban enfermas cuando comenzó el estudio; 0,6% había sufrido de amarillamiento letal a finales del año 1972; casi el 6% para el otoño de 1973; 50% a finales de 1974, y 75% a finales de 1975. Dentro de áreas localizadas del sureste de la Florida, las tasas aparentes de propagación de la enfermedad fueron significativamente más bajas en las palmas localizadas cerca del mar que en las palmas del interior bajo alto mantenimiento cultural (McCoy *et al.*, 1983), pero la razón de esta relación nunca fue determinada adecuadamente.

También se han investigado los gradientes de diseminación del amarillamiento letal dentro de una plantación y entre plantaciones de cocotero, junto con el patrón de propagación palma a palma en Yucatán, México. Se encontró que a medida que aumentaba la proporción de palmas infectadas, mayor era la distancia de propagación de la enfermedad y en un gradiente radial simétrico (Gongora *et al.*, 2001; 2004). Para diseminación a grandes distancias entre plantaciones, los gradientes fueron asimétricos y hacia la dirección prevalente del viento. Debido a que la dirección prevalente del viento es oriente-occidente en Yucatán, la propagación del amarillamiento letal fue mayor hacia el occidente (Mora y Escamilla, 2001).

Cuando se monitoreó la diseminación de la enfermedad por síntomas visuales únicamente, la propagación palma a palma se distribuyó al azar dentro de los primeros diez meses del estudio, comenzó a formar agregados después de doce meses, y eventualmente se distribuyó uniformemente en toda el área de estudio (Perez *et al.*, 2000; 2004). Sin embargo, cuando se utilizó la detección del patógeno por diagnóstico molecular para seguir la propagación palma a palma, se obtuvo evidencia de formación de agregados más temprano cuando, según los síntomas, la distribución del amarillamiento letal era todavía al azar (Canché, 2002). Además, el análisis de auto-correlación espacial basado en síntomas visuales indicó que una palma enferma puede infectar palmas adyacentes hasta una distancia equivalente a ocho veces la separación entre dos palmas, en este caso 8 m (Escamilla y Mora 2003). Esto también fue confirmado por análisis PCR (J. Escamilla, México 2004, comunicación personal.).

Estudios sobre CSPWD en plantaciones de coco en Ghana también han revelado que, en casi todos los casos, la enfermedad se presenta primero al azar en palmas aisladas, propagándose a toda la parcela en parches y luego poco a poco a todas las plantaciones de coco en la región (Dery y Philippe, 1997). La propagación también puede “saltar” a diferentes distancias (Dery y Philippe, 1997).

Control

A pesar de décadas de investigación, todavía no existe una cura para el amarillamiento letal, pero se pueden tomar medidas para tratar de reducir la tasa de propagación. Los métodos actuales y potenciales incluyen cuarentena, control químico, control del vector, prácticas culturales y el uso de variedades resistentes.

Control químico

El control del vector se ha hecho utilizando insecticidas. En pruebas realizadas por Howard y McCoy (1980), y Reinert (1977), las poblaciones de *M. crudus* fueron reducidas con el uso de insecticidas, pero no lo suficiente como para ser recomendado para fines prácticos (McCoy *et al.*, 1983). Debido a la naturaleza de fitoplasma del agente causal del amarillamiento letal, se probaron antibióticos en la Florida (McCoy *et al.*, 1983) y Jamaica (Hunt *et al.*, 1974). Se encontró que la aplicación de tetraciclinas inhibe el desarrollo de síntomas si se aplican antes de la expresión del amarillamiento foliar. El tratamiento con químicos ha sido exitoso en palmas hospederas ornamentales, pero no es viable en plantaciones comerciales por el alto costo y los riesgos para la salud.

Eliminación de plantas enfermas y cuarentena

Según McCoy *et al.* (1983), la eliminación de las palmas enfermas puede ayudar a controlar la propagación de la enfermedad si se hace durante la fase temprana del brote. McCoy observó que una gran desventaja de esta práctica es que el amarillamiento letal tiene un largo período de latencia. Sin embargo, de acuerdo con el conocimiento epidemiológico actual de la enfermedad, como se mencionó en la sección anterior, si la eliminación de palmas enfermas se practica rigurosamente al comienzo del brote, puede contribuir sustancialmente a disminuir la propagación de la enfermedad. Por otro lado, aunque el amarillamiento letal se propaga con rapidez

en un sitio donde se ha establecido y salta grandes distancias para establecer nuevos sitios de infección, la cuarentena de las áreas infestadas podría retardar la propagación de la enfermedad, ya que la gran mayoría de los nuevos casos ocurren en un radio de 100 m de cualquier caso establecido de la enfermedad (McCoy et al., 1976).

De acuerdo con datos más recientes (presentados atrás), Mora y Escamilla (2001) propusieron que la eliminación de una palma sintomática y los árboles a su alrededor puede ser efectiva si una detección temprana, principalmente molecular, se combina con monitoreo mensual del foco durante seis meses de acuerdo con el periodo estimado de incubación evaluado con PCR (Canche et al., 2001). En este enfoque, la eliminación de las palmas enfermas en un radio de 20 m (o una distancia igual a dos palmas a partir de la palma sintomática) se combina con un muestreo restrictivo en un radio de 80 m (o la distancia equivalente a ocho palmas) menos el área de eliminación. El muestreo restrictivo ha demostrado ser efectivo en muestreos simulados en *Citrus tristeza closterovirus* en México (Mora et al., 2005; Ruiz et al., 2005).

En el enfoque de manejo de focos se incluye un cordón sanitario basado en la probabilidad de movimiento discontinuo del vector putativo ('saltos'). Este 'cordón' es asimétrico hacia la principal dirección del viento y varía entre 4 y 27 km y entre 6 y 80 km al 'salto' más corto y más largo. Se pueden utilizar datos preliminares de campo para definir la distancia a la que dicho 'cordón' se debe establecer ya que la dirección y la velocidad del viento local afecta su ubicación. Los supuestos básicos fundamentales de la propuesta incluyen: (a) existencia de un vector alado con hábitos migratorios fuertemente influenciados por el viento, (b) tamaño del foco igual a una planta, y (c) uniformidad genética y topológica razonable. Un ejemplo de cálculo de áreas de eliminación, muestreo y cordón sanitario, se puede encontrar en Mora et al. (2001; 2002).

Germoplasma resistente

Después de la extensa devastación de cocoteros en Jamaica en los años cincuenta, se llevaron a cabo pruebas de campo para resistencia al amarillamiento letal y se seleccionaron dos variedades: Enano Amarillo de Malasia (MYD) baja mortalidad del 4% y el cocotero Alto de Panamá (PNT) con una mortalidad intermedia

del 44%. Con estas variedades se formó el híbrido MYD x PNT (Maypan), para combinar la resistencia al amarillamiento letal de MYD y las mejores características agronómicas de PNT.

El híbrido Maypan se convirtió en el cocotero más sembrado en Jamaica y otros países. Después de la llegada del amarillamiento letal a México, se comenzó una búsqueda de germoplasma resistente en 1989. Se recolectaron 18 poblaciones de cocotero, principalmente de la costa pacífica de México y se establecieron ensayos de resistencia en Yucatán en un área afectada por la enfermedad. Estas poblaciones se agruparon en 5 ecotipos: Alto Atlántico Mexicano, MYD, Alto Pacífico Mexicano 1, Alto Pacífico Mexicano 2, y Alto Pacífico Mexicano 3. Después de más de 10 años de ensayos, se ha identificado nuevo germoplasma altamente resistente al amarillamiento letal: Alto Pacífico 1 y Alto Pacífico 2 (Zizumbo et al., 2009), que han sobrevivido en sus sitios originales de siembra conviviendo con diferentes cepas de fitoplasma amarillamiento letal identificadas allí (Harrison et al., 2002a).

Además, después de nueve años de evaluación de híbridos en dos sitios en México se encontró que el 'Chactemal' (MYD x Alto Lázaro Cardenas, un cocotero Alto Pacífico Mexicano) era resistente al amarillamiento letal (Carrillo, 1998; Domínguez, 1994). Este híbrido se produce hoy día en cuatro semilleros donde los progenitores masculinos y femeninos están presentes y se ha logrado obtener altos rendimientos (Domínguez et al., 2003). Estos ecotipos Alto Pacífico e híbridos están siendo usados en la actualidad para programas de resiembra en México, Belice y Honduras. En un programa de selección más reciente, Castillo et al. (2009) están probando diez híbridos Enano x Alto y dos Alto x Alto en Tabasco, en un sitio con alta incidencia de amarillamiento letal. Los resultados preliminares después de seis años son muy promisorios en términos de resistencia al amarillamiento letal y rendimiento.

Manejo integrado

Según lo que se ha presentado aquí, la propagación del amarillamiento letal podría reducirse en forma más efectiva si se aplican diferentes prácticas junto con un sistema de manejo integrado que incluya: (a) monito-



reo permanente para detectar plantas sospechosas; (b) eliminación temprana de palmas enfermas inmediatamente después de la aparición de los primeros síntomas; (c) control directo o indirecto del vector y (d) resiembra con germoplasma resistente. Este tipo de manejo está siendo aplicado en Jamaica en la plantación Nut River ubicada en Santo Tomás, con una población de aproximadamente 60.000 palmas de coco.

La enfermedad fue identificada por primera vez en esta plantación por la Junta de la Industria Cocotera (Coconut Industry Board [CIB]) en abril de 2001, y desde entonces se han implementado las siguientes prácticas: monitoreo diario de las palmas para detección de síntomas de amarillamiento letal, eliminación oportuna de palmas sintomáticas mediante corte y quema, eliminación de malezas y resiembra oportuna para compensar las pérdidas causadas por la enfermedad. Este enfoque de manejo ha reducido el nivel de incidencia

del amarillamiento letal a menos del 0,4% por año. Los cocoteros se ven sanos y son muy productivos, y la plantación continúa prosperando. En contraste, y únicamente a 4 millas de distancia, la plantación de Cumming ha sido devastada por el amarillamiento letal. En esta plantación, prácticamente no existe el manejo de la enfermedad. Aunque es importante anotar que existen otras diferencias entre estas dos plantaciones, la plantación Nut River está ubicada en un sitio más elevado que la de Cumming, y en terreno inclinado; por tanto, los factores ambientales pueden contribuir, por lo menos en parte, a las diferencias en la incidencia de la enfermedad en los dos sitios.

En la actualidad, la CIB está realizando una investigación para definir si las diferencias entre las dos plantaciones están relacionadas, y hasta qué punto, con las diferentes prácticas de manejo, para proporcionarle una base a un programa integral de manejo del amarillamiento letal en Jamaica y en otros países.



Bibliografía

- Aguilar, M.L.; Espadas, F.; Maust, B.; Sáenz, L. 2009. Endogenous cytokinin content in coconut palms affected by lethal yellowing. *J Plant Pathol.* 91: 141-146
- Aharoni, N. 1989. Interrelationship between ethylene and growth regulators in senescence of lettuce leaf discs. *J Plant Growth Regul.* 8:309-317
- Alejar, A.A.; Viser, R.D.; Spencer, M.S. 1988. Ethylene production by attached leaves or intact shoots of tobacco cultivars differing in their speed of yellowing during curing. *Plant Physiol.* 88:329-332
- Allorerung, D.; Harries, H.C.; Jones, P.; Warokka, J.S. (eds.). 1999. Proceedings of the International Workshop on Lethal Diseases of Coconut Caused by Phytoplasmas in South East Asia. APCC Publishers, Jakarta (Indonesia).
- Ashburner, G.R.; Cordova, I.; Oropeza, C.; Illingworth, R.; Harrison, N.A. 1996. First report of coconut lethal yellowing disease in Honduras. *Plant Dis.* 80:960.
- Batugal, P. 1999. The role of international cooperation in the development of biotechnology in coconut. In: C Oropeza, J-L Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña & J. Santamaría (Eds.). *Current Advances in Coconut Biotechnology.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 19-30.
- Been, B.O. 1991. Observations on field resistance to lethal yellowing in coconut varieties and hybrids in Jamaica. *Oléagineux.* 36:9-11.
- Brown, S.E.; Been, B.O.; McLaughlin, W.A. 2006. Detection and variability of the lethal yellowing group (16SrIV) phytoplasmas in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Ann Appl Biol* 149: 53-62.
- Brown, S.E.; Been, B.O.; McLaughlin, W.A. 2008a. First report of the lethal yellowing group phytoplasmas in the weeds *Emilia fosbergii* and *Synedrella nodiflora* in Jamaica. *New Disease Reports* 57: 770.
- Brown, S.E.; Been, B.O.; McLaughlin, W.A. 2008b. The presence of the lethal yellowing group (16SrII) phytoplasmas in the weed *Vernonia cinerea*. *New Disease Note* 92: 1132.
- Canche, J.; Medina, F.; Guzmán, A.; Mora, G.; Escamilla, J.A. 2001. Determinación del periodo de incubación del amarillamiento letal del cocotero por medio de RCP. XXXVI Congreso Nacional de Entomología y XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Entomología y Sociedad Mexicana de Fitopatología. Querétaro, México. 15-18 julio. F-109.
- Canché, J. 2002. Determinación del período de incubación del amarillamiento letal del cocotero (*Cocos nucifera* L) en Sisal, Yucatán. BSc thesis. Instituto Tecnológico. Agropecuario No. 2, Conkal, México Carter W (1964). Present status of research on lethal yellowing disease of coconut palm in Jamaica. *FAO Plant Protection Bulletin* 2:67-69
- Carrillo, R.H. 1998. Amarillamiento letal del cocotero en México. En *Memorias de la Primera Reunión Nacional de la Palma de Coco*, Acapulco, México pp 49-80.
- Castillo, G.R.A.; Oropeza, S.C.; Domínguez, C.E.; Azpeitia, M.A.; Ortiz, G.C.F.; Dzido J.L. 2009. El amarillamiento letal del cocotero en

- México: nuevos híbridos en evaluación. En: *Memorias de la 55ª Reunión Anual del PCCMCA* (En prensa).
- Cordova, I. 1994. Evaluación de la presencia del organismo tipo micoplasma causante del amarillamiento letal en embriones de semillas de palmas de cocotero afectadas por esta enfermedad. BSc thesis. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
- Cordova, I. 2000. Estudio sobre el fitoplasma causante del amarillamiento letal en el cocotero mediante el uso PCR. MSc thesis. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
- Cordova, I.; Oropeza, C.; Almeyda, H.; Harrison, NA. 2000. First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern Mexico. *Plant Dis.* 84: 807.
- Cordova, I.; Jones, P.; Harrison, NA.; Oropeza, C. 2003. *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol Plant Pathol.* 4:99-108.
- Chumba, A. 2003. Estudio de la transmisión del amarillamiento letal del cocotero (*Cocos nucifera* L.) a través del embrión. BSc thesis. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.
- Dabek, AJ. 1975. The incubation period, rate of transmission and effect on growth of coconut lethal yellowing disease in Jamaica. *Phytopathologische Zeitschrift* 81(84): 1-9.
- Davis, MJ.; Konai, M. 1991. Separation of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms (MLO) by field-inversion gel electrophoresis. *Phytopathology* 81: 697.
- Dabek, AJ.; Hunt, P. 1976. Biochemistry of leaf senescence in coconut lethal yellowing, a disease associated with mycoplasma-like organisms. *Trop Agric.* 53:115-123
- Dabek, AJ.; Johnson, CG.; Harries, HC. 1976. Mycoplasma-like organisms associated with Kañcopé and Cape St. Paul wilt diseases of coconut palms in West Africa. *PANS* 22: 354-358.
- Davies, WJ.; Zhang, J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 42:55-76
- Davies, WJ.; Jones, HG. 1991. Abscisic acid, physiology and biochemistry. Oxford: Oxford Bios Scientific.
- Dery, SK.; Philippe, R. 1997. Preliminary study on the epidemiology of cape St. Paul wilt disease of coconut in Ghana. In: SJ Eden-Green and F Ofori (Eds.). *Proceedings of the International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut*, Elmina, Ghana, November 1995. Natural Resources Institute, Chatham (Reino Unido). pp 255-260.
- Deutsch, E.; Nienhaus, F. 1983. Further studies on the distribution of mycoplasma-like organisms in different tissues of lethal yellowing diseased coconut palms in Tanzania. *J Plant Dis Prot* 90: 278-284.
- Dollet, M.; Giannotti, J.; Renard, JL.; Ghosh, SK. 1977. Study of a lethal yellowing of coconut in Cameroon: the Kribi disease. Observations of mycoplasma-like organisms *Oléagineux* 32:317-322.
- Dominguez, CE.; Lopez, AJ.; Ruiz, BP. 1994. Preliminary evaluation of the coconut hybrid Malayan Yellow Dwarf x Lazaro Cardenas Tall in Tabasco. In: *Proceedings of the 7th Scientific Meeting Sagar-Inifap*. Villahermosa, Tabasco pp 14-16.
- Eden-Green, SJ. 1997a. History, distribution and present status of lethal yellowing-like disease of palms. In: SJ Eden-Green and F Ofori (Eds.). *Proceedings of the International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut*, Elmina, Ghana, noviembre 1995. Natural Resources Institute, Chatham (Reino Unido) pp 9-25.
- Eden-Green, SJ. 1997b. An updated survey of coconut diseases of uncertain etiology. In: SJ Eden-Green and F Ofori (Eds.). *Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-like Diseases of Coconut*, Elmina, Ghana, Noviembre 1995. Natural Resources Institute, Chatham (Reino Unido). pp 77-84.
- Epko, EN.; Ojomo, EE. 1992. The spread of lethal coconut diseases in West Africa: incidence of Awka disease (or bronze leafwilt) in the Ishan area of Bendel state in Nigeria. *Principles* 34:143-146.
- Escamilla, JA. Mora, G. 2003. Epidemiology of LY disease: spatial patterns and incubation period, and application to an eradication program. In: S Sandoval, P Rivas,
- Solis, N.; Romero, G.; Mora, G. (Eds.). *Abstracts of the Pan American Plant Disease Conference*, Sociedad Mexicana de Fitopatología, Texas (Estados Unidos). pp 225-226
- Escamilla, JA.; Oropeza, C.; Harrison, N.; Alpizar, L.; Cordova, I.; Islas-Flores, I. 1994. Evaluación de sondas de ADN para el estudio de OTM causantes del amarillamiento letal. Project Report, Conacyt, México.
- Escamilla, A.; Harrison, N.; Nuñez, H.; Apizar, L.; Cordova, I.; Islas-Flores, I.; Oropeza, C. 1995. Practical use of ADN probe for detection of lethal yellowing of *Cocos nucifera* L. in México. In: C Oropeza, WF Howard, GR Ashburner (Eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands pp 93-99
- Eskafi, F.; Basham, H.; McCoy, R. 1986. Decreased water transport in lethal yellowing-diseased coconut palms. *Trop Agric* 63:225-228.
- Foale, M. 2005. An introduction to the coconut palm. In: P Batugal, V Ramana, GP Rao and J Oliver (Eds.). *Coconut Genetic Resources*. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (Ipgr-APo), Serdang, Selangor DE, Malaysia. pp 1-8.
- Góngora, C.; Mora, G.; Pérez, HO.; Escamilla, JA. 2001. ¿El amarillamiento letal del cocotero progresa a partir de focos de infección? In: *Resúmenes del XXVIII Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Fitopatología*. SMF, Qro., México, pp 153.
- Góngora, C.; Escamilla, J.; Pérez, O.; Mora, G. 2004. Gradientes de diseminación del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Sisal Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:370-376.
- Gundersen, DE. ; Lee, IM.; Rehner, SA.; Davis, RE.; Kingsbury, DT. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J Bacteriol.* 176: 5244-5254.
- Harrison, NA.; Jones, P. 2003. Diseases of coconut. In: RC Ploetz (Ed.). *Diseases of Tropical Fruit Crops*, CAB Publishing, Wallingford (Reino Unido). pp 197-225.
- Harrison, NA.; Oropeza, C. 2008. Coconut lethal yellowing. In: NA Harrison, GP Rao and C Marcone (Eds.). *Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas*. Studium Press, Houston (Estados Unidos) pp 219-248.
- Harrison, NA.; Barner, R.; Cox, J.; Tsai, H.; Richardson, P. 1992. DNA probes for detection of mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida. *Phytopathology* 82: 216-224.
- Harrison, N.; Richardson, P.; Kramer, B.; Tsai, H. 1994. Detection of mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 43: 998-1008.
- Harrison, NA.; Richardson, P.; Tsai, JH. 1995. Detection and diagnosis of lethal yellowing: conventional methods and molecular techniques. In:



- C Oropeza, FW Howard and GR Ashburner (Eds.). *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 79-91.
- Harrison, NA.; Cordova, I.; Richardson, P.; Dibonito, R. 1999. Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: C Oropeza, J-L Verdeil, GR Ashburner, R Cardeña & J Santamaría (Eds.). *Current advances in coconut biotechnology* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 183-196.
- Harrison, NA.; Narváez, M.; Almeyda, H.; Cordova, I.; Carpio, ML.; Oropeza, C. 2002a. First report of group 16 SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of México. *New Dis Rep* 5:1-2.
- Harrison, NA.; Narváez, M.; Almeyda, H.; Cordova, I.; Carpio, ML.; Oropeza, C. 2002b. First Report of Group 16SrIV Phytoplasmas Infecting Coconut Palms with Leaf Yellowing Symptoms on the Pacific Coast of Mexico. <http://www.bspp.org.uk/ndrf/july2002/2002-21.asp>
- Harrison, NA.; Womack, M.; Carpio, ML. 2002c. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis* 86: 676-681.
- Harrison, NA.; Helmick, EE.; Elliott, ML. 2008. Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Ann Appl Biol* <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1744-7348.2008.00240.x>
- Heinze, KG.; Schuiling, M.; Romney, DH. 1972. The possible cause of lethal yellowing disease of coconut. *FAO Plant Protect Bull* 20:58-68.
- Henderson, J.; Osborne, DJ. 1994. Inter-tissue signalling during the two-phase abscission in oil palm fruit. *J Exp Bot* 45:943-951
- Howard, FW.; McCoy, RE. 1980. Reduction in spread in mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm *Veitchia merrillii* by the use of insecticides. *J Econ Entomol.* 73:268-270.
- Howard, FW. 1980a. Attractiveness of date and coconut palms to *Myndus crudus* and other homopterans. *Proc Florida State Hort Soc* 93:199-201.
- Howard, FW. 1980b. Population densities of *Myndus crudus* Van Duzee (Homoptera: Cixiidae) in relation to coconut lethal yellowing distribution in Florida. *Principles* 24:174-178.
- Howard, FW. 1990. Evaluation of grasses for cultural control of *Myndus crudus*, a vector of lethal yellowing of palms. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56: 131-137.
- Howard, FW.; McCoy, RE. 1980. Reduction in spread in mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm *Veitchia merrillii* by the use of insecticides. *J Econ Entomol* 73:268-270.
- Howard, FW.; Mead, FM. 1980. A survey of Auchenorrhyncha (Insecta: Homoptera) associated with palms in southern Florida. *Trop. Agric.* 57:145-153.
- Howard, FW.; Norris, RC.; Thomas, DL. 1982. Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus*. *Trop. Agric.* 60:168-171.
- Howard, FW.; Williams, DS.; Norris, RC. 1984. Insect transmission of lethal yellowing to young palms. *Int J Entomol.* 26:331-338.
- Hunt, P.; Dabek, AJ.; Schuiling, M. 1974. Remission of symptoms following tetracycline treatment of lethal yellowing infected coconut palms. *Phytopathology* 63:307-312.
- Islas, I.; Cordova, I.; Santamaría, J.; Oropeza, C. 1999. Biochemical changes in roots of coconut palms affected by lethal yellowing. *J Plant Physiol.* 155:48-53.
- Jones, RJ.; Mansfield, TA. 1970. Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. *J Exp Bot* 21:714-719.
- Jones, P.; Cronjé, CPR.; Warokka, JS. 1999. Investigations into coconut diseases of uncertain aetiology. *Phytopathology* 89:S37.
- Kollar, A.; Seemüller, E. 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J Phytopathol.* 127: 177-186.
- Lao, DA. 2008. Coco-biodiesel more than a diesel replacement. *Bioenergy Forum* 2008, Bangkok, abril 2008.
- Lao, DA. 2009. Coco-biodiesel in the Philippines. In: Coconut Philippines published by eAsia Outsourcing & Marketing Services - www.coconut-republic.org
- Leach, R. 1946. The unknown disease of coconut palm in Jamaica. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 23: 50-60.
- Lee, I-M.; Davis, RE.; Gundersen-Rindal, DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54: 221-255.
- Lee, I-M.; Gundersen-Rindal, DE.; Davis, RE.; Bartoszyk, IM. 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.
- Legoupil, JC. (Ed.) 2009. International Workshop on Lethal Yellowing Diseases on Coconut. Ghana, Accra, 3-6 June, 2008 (FARA/Cirad/CSIR/SCAC), Accra, Ghana, 322 p.
- León, R.; Santamaría, JM.; Alpizar, L.; Escamilla, JA.; Oropeza, C. 1996. Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytol* 134: 227-234.
- Llauger, R.; Becker, D.; Cueto, J.; Peralta, E.; González, V.; Rodríguez, M.; Rohde, W. 2002. Detection and molecular characterization of phytoplasma associated with lethal yellowing disease of coconut in Cuba. *J Phytopathol.* 1550:390-395.
- Marcone, C.; Neimark, H.; Ragozzino, A.; Lauer, U.; Seemüller E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.
- Martínez, S.; Cordova, I.; Maust, B.; Oropeza, C.; Santamaría, J. 2000. Is abscisic acid responsible for abnormal stomatal closure in lethal yellowing of coconut palms? *J Plant Physiol* 156: 319-323.
- Martínez, RT.; Narváez, M.; Fabre, S.; Harrison, NA.; Oropeza, C.; Dollet, M.; Hichez, E. 2007. Coconut lethal yellowing on the Southern Coast of the Dominican Republic is associated with a new 16Sr IV group phytoplasma. *New Dis Rep.* 15: 1
- Matoo, AK.; Aharoni, N. 1988. Ethylene and plant senescence. In: LD Nooden and AC Leopold (Eds). *Senescence and aging in plants*, San Diego: Academic Press, pp 241-280.
- Matteoni, JA.; Sinclair, WA. 1983. Stomatal closure in plants infected with mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 73:398-402.
- Maust, BE.; Espadas, F.; Talavera, C.; Aguilar, M.; Santamaría, J.; Oropeza, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93: 976-981.
- McCoy RE (1976). Comparative epidemiology of the lethal yellowing, kancopé and cadang-cadang diseases of coconut palm. *Plant Disease Reporter* 60:498-502.

- McCoy RE (1982). Use of tetracycline antibiotics to control yellows diseases. *Plant Dis* 66: 539-542.
- McCoy RE, Howard FW, Tsai M, Donselman HM, Thomas DL, Basham HG, Atilano RA, Eskafi FM, Britt L and Collins ME (1983). Lethal yellowing of palms. *Univ Florida Agric Exp Sta Tech Bull* No 834.
- Mejía F, Palmieri M, Oropeza C, Doyle M, Harrison NA, Aguilar M, Narváez M, Estrada R and Ortiz G. (2004). First Report of Coconut Lethal Yellowing Disease in Guatemala. *New Dis Rep* 9:1-2.
- Mora, G.; Escamilla, JA. 2001. Potencial de dispersión del amarillamiento letal del cocotero. Una enfermedad de importancia cuarentenaria en México. In: EA Bolaños, H Osada and C Mendoza (Eds.). *Memorias del XXVII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola*. IAP-UMSNH, Uruapan, México. pp 221-225.
- Mora, G.; Escamilla, A. 2002. Dispersal potential of lethal yellowing of the coconut palm. A quarantine disease in México. In: *Proceedings of the Expert Consultation on Sustainable Coconut production through Control of Lethal Yellowing Disease*, Enero 14-18, 2002. CFC Technical Paper No. 18. Kingston (Jamaica), pp 128-133.
- Mora, G.; Ochoa, DL.; Gutiérrez, MA.; Villegas, MA.; Álvarez, R.; Jasso, J.; Góngora, CC.; Ruiz, N.; Rivas, P.; Loeza, E.; Palacios, TC.; Perez Molphe-Bach, E.; Febres, V.; Moore G.; Moreno, P.; Mendoza, A.; Quiroz, J. 2005. *Citrus tristeza closterovirus*: consideraciones biológicas y epidemiológicas. In: *Memorias del IX Simposio Internacional de Citricultura*. Abril 19-23, 2005. Cd. Victoria, Tamaulipas, México, pp. 1-25.
- Mpunami, A.; Tymon, A.; Jones, P.; Dickinson, MJ. 1999. Genetic diversity in the coconut lethal yellowing disease phytoplasmas of East Africa. *Plant Pathol*. 48:109-114.
- Myrie, WA.; Dollet, M.; Wray, D.; Been, BO.; McLaughlin, W. 2006. First Report of Lethal Yellowing Disease of Coconut Palms Caused by Phytoplasma on Nevis Island. *Plant Dis* 90:834.
- Narvaez, M.; Cordova, I.; Orellana, R.; Harrison, NA.; Oropeza, C. 2006. First report of a lethal yellowing phytoplasma in *Thrinax radiata* and *Coccothrinax readii* palms in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Plant Pathol* 55: 292.
- Nipah, JO.; Jones, P.; Dickinson, MJ. 2007. Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. *Plant Pathol*. 56: 777-784.
- Nooden, LD. 1988 Abscisic acid, auxin and other regulators of senescence. In: LD Nooden and AC Leopold (Eds.). *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press, pp 329-368.
- Oropeza, C.; Zizumbo, D. 1997. The history of lethal yellowing in México. In: SJ Eden-Green and F Ofori (Eds.). *Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-like Diseases of Coconut*, Elmina, Ghana, November 1995. Natural Resources Institute, Chatham (Reino Unido), pp 69-76,
- Parthasarathy, MV. 1974. Mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology* 64: 667-674.
- Pérez, HO.; Mora, G.; Escamilla, JA.; Góngora, CC.; Oropeza, C. 2000. Patrón espacio-temporal del amarillamiento letal del cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Yucatán. In: EA Bolaños, H Osada and C Mendoza (Eds.). *Memorias del XXVII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola*. IAP-UMSNH, Uruapan, México, p 78.
- Pérez, O.; Mora, G.; Escamilla, JA.; Góngora, C. 2004. Patrón espacio-temporal del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:231-238.
- Plavsic-Barjac, B.; Hunt, P.; Maramorosch, K. 1972. Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathology* 58:298-299.
- Reinert, JA. 1977. Field biology and control of *Haplaxius crudus* on St. Augustine grass and Christmas palm. *J Econ Entomol*. 70:54-56.
- Reinert, JA. 1980. Phenology and Density of *Haplaxius crudus* (Homoptera: Cixiidae) on Three Southern Turfgrasses. *Environ Entomol*. 9: 13-15.
- Roca, MM.; Castillo, MG.; Harrison, A.; Oropeza, C. 2006. First report of a 16SrIV group phytoplasma associated with declining coyol palms in Honduras. *Plant Dis*. 90:526.
- Romney, DH. 1972. Past studies on and present status of lethal yellowing disease of coconuts. *PANS* 18:386-395.
- Ruiz, N.; Mora, G.; Rivas, P.; Ochoa, D.; Góngora, C.; Loeza, E.; Gutiérrez, A.; Alvarez, R. 2005. Probability model of citrus tristeza virus detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. In: Proc. 16th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA, pp 196-204.
- Schuiling, M.; Mpunami, A. 1990. Lethal disease of coconut palm in Tanzania: review of research up to date and preliminary results of resistance trials.. In: ML Robert and D Zizumbo (Eds.). *La problemática amarillamiento letal del cocotero en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida, México, pp 171-183.
- Schuiling, M.; Kaiza, DA.; Mpunami, A. 1992. Lethal disease of coconut palm in Tanzania. I. Comparison with other diseases in East Africa. *Oléagineux* 47:511-515.
- Seemüller, E.; Garnier, M.; Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In: S Razin and R Herrmann (Eds.) *Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas*. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 91-116
- Singh, S.; Latham, DS.; Zhang, X.; Palni, LMS. 1992. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VI. Effect of nitrogenous nutrients on cytokinin levels and senescence of tobacco leaves. *Physiol Plant* 84: 262-268.
- Thomas, DL. 1979. Mycoplasma-like bodies associated with lethal declines of palms in Florida. *Phytopathology* 69: 928-934.
- Thomas, DL.; Donselman, HM. 1979. Mycoplasma-like bodies and phloem degeneration associated with declining Pandanus in Florida. *Plant Disease Reporter* 63: 911-916.
- Tsai, JH. 1979. Vector transmission of mycoplasma agents of plant diseases. In: RF Whitcomb and JG Tully (Eds.). *The mycoplasmas* (3). Academic Press, New York (EE.UU.) pp 266-307.
- Warokka, JS. 1999. The impact and etiology of coconut wilt diseases in Indonesia. In: D Allorerung, HC Harries, P Jones and JS Warokka (Eds.). *Proceedings of the International Workshop on Lethal Diseases of Coconut Caused by Phytoplasmas in South East Asia*. APCC Publishers, Jakarta (Indonesia), pp 27-35.
- Weintraub, PC.; Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* 51: 91-111.
- Zhang, J.; Schurr, U.; Davies, WJ. 1987. Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. *J Exp Bot*. 38:1174-1181.
- Zimmermann, M. 1979. Mycoplasma diseases and long distance transport in plants. N.S.C. Symposium. Series, pp 37-42.
- Zizumbo, D.; Colunga-García Marín, P.; Fernández-Barrera, M.; Torres-Hernández, N.; Oropeza, C. 2009. Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Genet Resour Crop Evol* (Accepted).