

Polinización por insectos en palma de aceite: Una comparación de la viabilidad y sostenibilidad a largo plazo de ***Elaeidobious kamerunicus* en Papua Nueva Guinea, Indonesia, Costa Rica y Ghana***

Insect Pollination of Oil Palm - a Comparison of the Long Term
Viability and Sustainability of *Elaeidobious kamerunicus*
In Papua New Guinea, Indonesia, Costa Rica and Ghana

Caudwell, R.W.
Hunt, D.²,
Reid, A.³,
Mensah B.A.³,
Chinchilla, C.⁴

Palabras clave

Palma de aceite, polinización,
sostenibilidad

Resumen

El insecto polinizador de la palma de aceite, *Elaeidobious kamerunicus* fue introducido desde África hasta Asia continental y el Pacífico a comienzos de los años ochenta. Estas introducciones fueron muy exitosas en cuanto se eliminó la necesidad de la polinización asistida, se mejoró la formación de frutos, y se incrementaron los rendimientos por hectárea; todo lo cual contribuyó de manera significativa a la viabilidad económica de la actividad de la siembra de la palma de aceite en esta región del mundo. Recientemente, sin embargo, ha surgido la preocupación sobre la estrecha variabilidad genética de la población de insectos introducida, así como también sobre los efectos perjudiciales del parasitismo por nematodos.

En este trabajo se evalúa la viabilidad y sostenibilidad en el largo plazo de la población de *E. Kamerunicus* en algunos de los países en donde fue introducido. Los tres objetivos del trabajo fueron: i) Analizar la población existente de *E. kamerunicus* en Papua Nueva Guinea, Indonesia, Costa Rica y Ghana, para buscar infección por nematodos parasíticos. ii) Determinar el grado de separación genética entre las poblaciones de insectos provenientes de Papua Nueva Guinea y Ghana, y las poblaciones naturales en África Occidental, utilizando la técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). iii) Evaluar el potencial para mejorar la base genética de la población existente de *E. kamerunicus* dentro de las áreas donde ha sido introducido. El trabajo de campo se realizó en Papua Nueva Guinea, Indonesia, Ghana y Costa Rica.

Se encontraron nematodos parasíticos en varias muestras de *E. kamerunicus* procedentes de PNG: hembras maduras, huevos y varios estadios larvales, pero no

* Tomado de ASD Oil Palm Papers (25): 1-16 (2003). Traducido por Fedepalma.

1. PNG Oil Palm Research Association, Dami Research Station P.O. Box 97, Kimbe, West New Britain Province, Papua New Guinea.
2. CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, UK.
3. Department of Zoology, University of Cape Coast. Cape Coast, Ghana.
4. ASD de Costa Rica, c.chinchilla@asd-cr.com

machos del nematodo. El porcentaje de infestación varió entre 0 y 50% de los insectos analizados según su procedencia. Desde un punto de vista práctico todas las muestras de *E. kamerunicus* procedentes de Ghana estaban libres de nematodos, con excepción de una hembra. En las muestras de Costa Rica no se encontraron nematodos. El nematodo que parasita los adultos de *E. kamerunicus* en PNG se localiza en el hemoceolo y es una nueva especie en un nuevo género, *Elaeolenchus parthenonema* n.g., sp.

La comparación de las poblaciones de *E. kamerunicus* indicó que las muestras de insectos procedentes de PNG son genéticamente diferentes a las de Ghana, pero similares a las de Costa Rica, lo cual indicaría que los insectos ahora presentes en este último país, son una subpoblación de la que fue introducida en PNG, y no una población traída de África.

Durante las visitas de campo en África, se determinó que posiblemente existen al menos dos nuevas especies de *Elaeodobious* que no han sido descritas aún, lo cual tiene implicaciones para definir cuáles nuevas especies podrían introducirse en una localidad particular para ampliar la base genética de la población existente de polinizadores.

Summary

The African pollinator weevil *Elaeodobious kamerunicus* was introduced from Africa into the oil palm growing of Asia and the Pacific in the early 1980s. These introductions were very successful, dispensing with the need for assisted pollination, significantly improving fruitset, and hence increasing yield. The introduction therefore made a significant contribution to the economic viability of oil palm throughout the region. However there have recently been serious concerns expressed about the narrow genetic base of the weevil population, as well as the detrimental effects of parasitism of the weevils by nematodes. This paper describes work undertaken to evaluate the long-term viability and sustainability of insect pollination of oil palm by *E. kamerunicus*. The study had three main objectives: (1) To screen existing *E. kamerunicus* populations within Papua New Guinea, Indonesia, Costa Rica and Ghana for evidence of infection by parasitic nematodes; (2) To determine the degree of genetic separation between weevil populations in Papua New Guinea and Ghana, and natural populations in West Africa, using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique for genetic fingerprinting; and (3) To assess the potential to improve the genetic base of the existing population of *E. kamerunicus* within areas into which it has previously been introduced. Field work for the study was undertaken in Papua New Guinea, as well as Indonesia, Ghana and Costa Rica. The results of the study are presented, and recommendations made for future work.

La introducción de *E. kamerunicus* en Papua Nueva Guinea mejoró los niveles de formación de fruto y las tasas de extracción de aceite, por tanto, los rendimientos

Introducción

Antecedentes

Hasta finales de los años setenta, se pensaba que la palma de aceite era anemófila y no entomófila (Turner y Gillbanks, 1974; Hardon y Corley, 1976). La creencia de que la palma de aceite se polinizaba con el viento surgió de la supuesta falta de evidencia de insectos polinizadores efectivos, y aparentemente corroborado por las altas densidades de polen atmosférico observadas a distancias considerables de las inflorescencias masculinas (Hardon y Turner, 1967).

Sin embargo, Hardon y Turner encontraron que el comienzo de las lluvias causaba una reducción inme-

diata en la densidad de polen atmosférico y que la densidad del polen se veía afectada más por el número de días de lluvia que por la precipitación total. Syed (1979) reportó que esta observación condujo a algunos cultivadores, en especial, los que habían trabajado en Camerún, a sospechar sobre la participación de otros agentes en la dispersión del polen, ya que aunque en la estación húmeda llovió casi todos los días, la polinización durante este período fue adecuada.

Antes del documento de Syed (1979), existía muy poca evidencia publicada que hiciera pensar que los insectos desempeñaran un papel importante en la polinización de la palma de aceite. Syed comenzó un proyecto a finales de los años setenta

para determinar si insectos u otros organismos contribuían a la polinización de la palma. Los estudios iniciales de Syed se llevaron a cabo en Camerún, en un área donde la palma de aceite crece en forma natural, sin polinización asistida. En esta área los niveles de formación de fruto se consideraban adecuados sin intervención humana y, por tanto, era razonable asumir que la polinización natural era satisfactoria. Este fue el caso aún durante la estación de lluvias cuando la dispersión de polen por el viento no es común.

El trabajo de Syed (1979) incluyó estudios de dispersión eólica de polen a partir de inflorescencias masculinas. Estos estudios indicaron que parte del polen, en especial, de las palmas más altas, llegaba a las palmas aledañas y, por tanto, polinizaba de manera adecuada las inflorescencias femeninas. Sin embargo, Syed concluyó que en ausencia de un número sustancial de inflorescencias masculinas bien colocadas, el viento por sí solo no era capaz de proporcionar una polinización adecuada, en particular, durante la época de lluvia.

Al revisar las inflorescencias masculinas y femeninas, Syed encontró gran número de insectos. Estos insectos se hallaban en la inflorescencia masculina durante la antesis y en las flores femeninas durante los primeros días de receptividad. De los insectos encontrados en inflorescencias masculinas, *Elaeidobious spp.* y *Athela spp.* eran los más abundantes, incluyendo *E. kamerunicus*, *E. plagiatus*, y *Elgeidobious subvittatus*. De los insectos que se presentaban en gran cantidad de las inflorescencias masculinas, sólo *E. subvittatus* y *Athela sp.* se detectaron en inflorescencias femeninas y en pocas cantidades.

Sin embargo, la observación continua de inflorescencias femeninas a lo largo del período de receptividad

reveló que un gran número de insectos las visitaban durante el día y que tendían a llegar en bandadas intermitentes.

Syed (1979) observó que todas las especies encontradas en inflorescencias masculinas también visitaban las femeninas. Se encontró un gran número de insectos en inflorescencias masculinas y se reportó que algunos de estos continuamente se alejaban de las flores cargados de polen. Para investigar si el polen era transportado a las flores femeninas, Syed capturó insectos en las inflorescencias femeninas y los examinó bajo el microscopio.

Syed halló que las especies de *Elaeidobious* transportaban la mayor cantidad de granos de polen, pero existía una considerable variación en el número de granos transportados. La viabilidad del polen obtenido de los insectos capturados en las inflorescencias femeninas se examinó en pruebas de germinación. Se reportó que 68,5% del polen era viable, y se concluyó que la mayoría del polen era fresco.

Introducción de *Elaeidobious kamerunicus* en Asia y Papua Nueva Guinea

Se seleccionó el *E. kamerunicus* para ser introducido en Asia y Papua Nueva Guinea porque Syed (1979) reportó que era el insecto más numeroso tanto en tiempo seco como lluvioso, y transportaba más granos de polen que las otras especies de *Elaeidobious*. También reportó que *E. kamerunicus* tenía alta tasa de reproducción, buena habilidad de búsqueda, y era específico del huésped. Se concluyó que este gorgojo se podía introducir con seguridad a áreas palmeras.

El *E. kamerunicus* llegó a Malasia entre julio y diciembre de 1980 en cuarentena bajo el cuidado del Departamento de Agricultura (Kang y

Zam, 1982). Una vez se confirmó que la palma de aceite era su huésped específico, el gorgojo fue liberado en dos haciendas en Johor y Sabah en febrero y marzo de 1981. Para abril de 1982. el *E. kamerunicus* se encontraba prácticamente en todas las plantaciones de palma de Malasia.

Basri (1984) concluyó que las introducciones de *E. kamerunicus* en Malasia trajeron los siguientes beneficios:

1. Satisfacer la necesidad de polinización asistida
2. Mejora significativa en formación de fruto de un promedio de 52 a 71%
3. Aumento de la proporción fruto/racimo de un promedio de 57.7 a 64,7%
4. Aumento en el promedio de peso de racimo de 14.6 a 18,7 kilogramos
5. Mejora en la proporción aceite/racimo de un promedio de 23,3 a 25,4%
6. Mejora en la proporción de palmito/racimo de 4,6 a 6,6%.

El *E. kamerunicus* se introdujo en Papua Nueva Guinea en 1982. Esto trajo como resultado una mejora significativa en la polinización de la palma de aceite, similar a la descrita por Basri (1984) en Malasia. Las introducciones mejoraron los niveles de formación de fruto y las tasas de extracción de aceite, por tanto, los rendimientos. La introducción del gorgojo polinizador contribuyó de manera significativa a la viabilidad económica de la industria palmera en PNG y fue, en especial, de gran ayuda para los pequeños productores al aumentar los rendimientos de manera considerable sin costo para los cultivadores, situación que así continuó a mediano y largo plazos.

Introducción de *Elaeidobious kamerunicus* en Centroamérica y Latinoamérica

Antes de la reciente introducción de varias especies de *Elaeidobious*, la polinización de la palma de aceite en Latinoamérica se atribuía a dos especies de polinizadores. *Mystrops costaricensis* y *E. subvittatus*. El género *Mystrops*, que es exclusivo de este continente, se encuentra a lo largo del Pacífico y en toda Centroamérica hasta el sur de México. También se halla en la Costa Atlántica hasta el extremo occidental de Venezuela, así como ha penetrado a los Andes a lo largo del valle del río Magdalena, en Colombia. Las especies *Costaricensis* se han subdividido en tres subespecies: *C. costaricensis* en Centroamérica, *C. orientalis* en el interior de Colombia. y *C. pacificus* en la costa. El género *Elaeidobious* está representado por una sola especie. *E. subvittatus*. Esta especie probablemente vino de África Occidental a través de la costa oriental de Brasil, para luego colonizar toda América neotropical.

Mariau y Genty (1988) reportaron que en Colombia por lo general la lluvia tiene un efecto depresivo en las poblaciones de *Mystrops* y *Elaeidobious*. Estas fluctuaciones producen considerables variaciones en la formación de fruto, que para inflorescencias polinizadas en la estación de lluvias puede caer a 40%. mientras que en la estación seca, son posibles niveles de formación de fruto de más de 80%. Los bajos niveles de formación de fruto generaron interés en la introducción de otros polinizadores en Latinoamérica para mejorar los rendimientos. Por tanto, otras especies de *Elaeidobious* se introdujeron en este continente en 1986: *E. kamerunicus* en Colombia, *E. singularis* en Brasil, y una mezcla de cuatro especies de *Elaeidobious* en otras plantaciones, en la región de Manaos.

En Ecuador la situación presenta grandes diferencias entre la zona pacífica, donde se encuentra el *Mystrops costaricensis pacificus* y la zona del Amazonas donde ninguno de los insectos ha penetrado, y se introdujo el *E. kamerunicus*.

Las observaciones de Syed (1985) en Costa Rica y Honduras lo han llevado a recomendar la introducción de un nuevo polinizador para complementar el trabajo hecho por *M. costaricensis* y *E. subvittatus*. A pesar de los bajos valores de formación de fruto observados durante algunos meses del año, la polinización asistida no ha sido considerada necesaria en Centroamérica, excepto para algunas áreas localizadas y bajo situaciones muy particulares (Bulgarely *et al.*, 2002).

El *E. kamerunicus* se introdujo en Costa Rica en marzo de 1986, y los cambios observados en formación de fruto y poblaciones de polinizadores nativos e introducidos fueron documentados por Chinchilla y Richardson (1991).

Sostenibilidad y viabilidad a largo plazo de *Elaeidobius kamerunicus* en Papua Nueva Guinea, Indonesia, Costa Rica y Ghana

Recientemente han surgido preocupaciones acerca de la ocurrencia periódica de baja polinización y disminución de rendimiento en ciertas áreas en Malasia (Ming, 1999). Este autor reportó que las bajas poblaciones del gorgojo estaban asociadas con el problema y sugirió que podía ser causado por efectos directos o indirectos del clima, o por parasitismo de nematodos estimulado por cambios climáticos. Sugirió que con un segundo polinizador, por ejemplo, *E. subvittatus*, se podría superar este problema y complementar el *E. kamerunicus*.

Rao y Law (1998) reportaron que el problema de baja formación de fruto en áreas de Malasia Oriental se debía a una polinización deficiente. Se encontró que la baja formación de fruto en ciertas épocas se debía a baja polinización debido a la escasez de gorgojos. El número de gorgojos se redujo de manera dramática cuando las inflorescencias masculinas y su hábitat de reproducción, disminuyeron y esto coincidió con una infección generalizada de nematodos parasíticos y clima desfavorable. Rao y Law sugirieron la posibilidad de que las poblaciones de gorgojo derivadas de unas pocas parejas pueden estar sufriendo de depresión endogámica y por tanto sucumben con rapidez al parasitismo por nematodos. Se ha sugerido además, que estos gorgojos carecen de las características necesarias para adaptarse a condiciones húmedas.

Rao y Law (1998) consideraron que un complejo de insectos polinizadores, incluyendo algunos cuyo nicho no es la inflorescencia de la palma de aceite, puede ser necesario. Estos autores resaltaron que las sugerencias de importar lotes frescos de *E. kamerunicus* u otras especies de insectos polinizadores de Camerún requiere de una investigación previa. Por ejemplo, se ha observado que las poblaciones de gorgojo en su tierra nativa, Camerún, también disminuyen durante la época de lluvias, aunque la reducción es menos marcada. Por ello sería muy útil determinar la causa de esta disminución en Camerún.

Un alto porcentaje de las pupas y gorgojos muertos de la importación original a Malasia estaban infectados con nematodos y por tanto destruidos. De tal manera se sugirió que los nematodos que están causando los problemas probablemente fueron traídos con las poblaciones originales.

El *E. kamerunicus* se introdujo en Papua Nueva Guinea en 1982. Esto trajo como resultado una mejora significativa en la polinización de la palma de aceite

Estos autores consideraron que la idea de depresión endogámica u homocigosidad extrema plantea la pregunta de por qué los efectos no se manifestaron más temprano después de la introducción, dada la corta transición generacional del gorgojo. Más aún, las poblaciones en otras zonas, algunas que experimentan clima húmedo, también crecieron a partir de un número limitado de parejas. Ellos sugieren que sería interesante averiguar qué tan serio es el potencial del parasitismo por nematodos en estas áreas.

Concluyeron además que contener el parasitismo por nematodos requiere del entendimiento del mecanismo del parasitismo y los factores que aumentan su riesgo en la población de gorgojos. También resaltaron que la introducción de nuevos gorgojos en un área necesita de la determinación previa de niveles de resistencia, o por lo menos la heterocigosidad en subgrupos y en las diferentes especies del género.

Aunque se están logrando excelentes niveles de formación de fruto en la mayoría de las áreas en PNG, se considera que es urgente tomar medidas para abordar la sostenibilidad de los niveles actuales de polinización por insectos, y para hacer mejoras hacia el futuro. La población actual de gorgojos polinizadores en PNG se deriva de un número relativamente pequeño de gorgojos introducidos de África Occidental en 1982. En consecuencia, es aparente que se enfrentan los mismos problemas del Sureste Asiático, de que la posible infección por nematodos junto con la estrecha base genética de la población de gorgojos plantea un riesgo significativo a la producción viable y sostenible.

Un proyecto de investigación financiado por la Unión Europea en Papua Nueva Guinea se llevó a cabo

entre el 2000 y el 2002. Los objetivos del proyecto fueron:

1. Buscar evidencias de parasitismo por nematodos en las poblaciones existentes de *E. kamerunicus* en PNG, Indonesia, Costa Rica y Ghana
2. Determinar el grado de separación genética entre poblaciones de gorgojos en Papua Nueva Guinea, Costa Rica y poblaciones naturales de África Occidental, con base en la técnica de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)
3. Evaluar la posibilidad para mejorar el potencial de la base genética de la población existente de *E. kamerunicus* en PNG, ya sea introduciendo lotes frescos de las mismas especies, o de una o más especies nuevas de insectos polinizadores de África Occidental o Sur América.

Muestreo en campo

Durante el proyecto se recolectaron gorgojos de PNG, Ghana, Costa Rica e Indonesia. En PNG se recogieron gorgojos de todas las regiones palmeras (Figura 1): la Provincia de Nueva Irlanda (plantaciones Lamerika y Kabil), Provincia de Milne Bay (plantaciones Baraga y Waigini). Provincia de Oro (plantaciones Sangara y Embi) y Provincia de Nueva Bretaña Occidental (plantaciones Dami, Kumbango, Kavugara, Kautu y Hargy). Un total de nueve muestras se recopilaban de varias áreas palmeras en Ghana: Región Oriental (Kade), Región Occidental (plantaciones Ajumako, Twifo, Ankaako, Assin Dadieso y Egyirkrom) y Región Occidental (plantaciones Benso, Ewusiedjoe y escuela para sordos Sekondi.) También se recolectaron gorgojos del Centro de Investigación Bah Lias, cerca a Medan, en Indonesia y de las plantaciones Palma

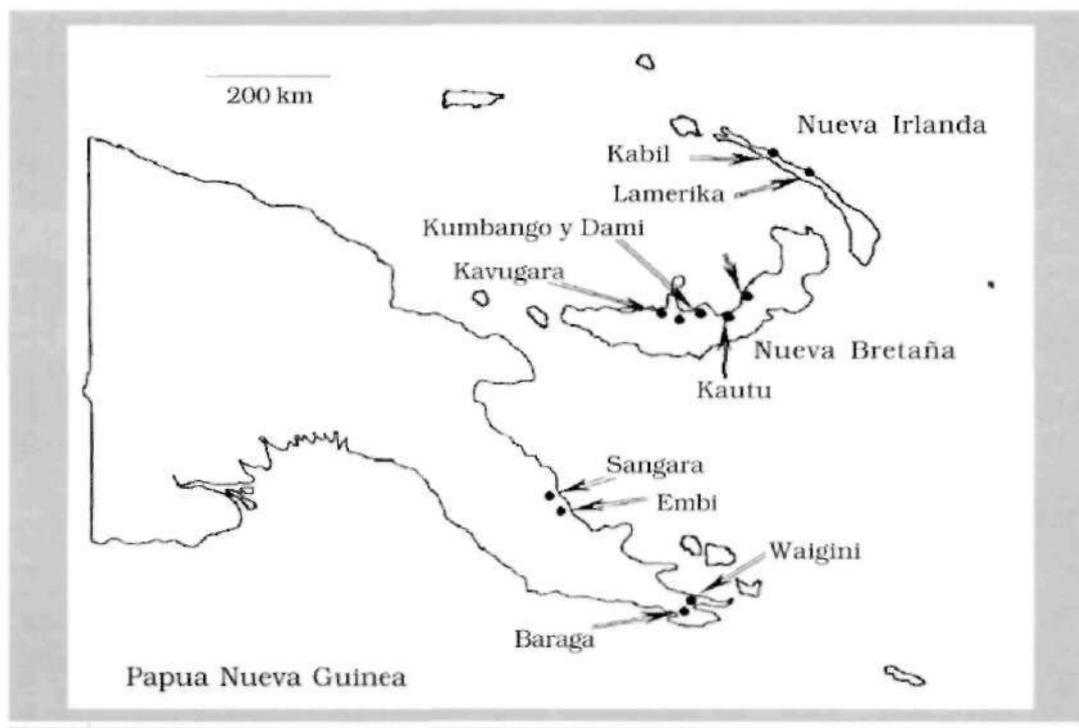


Figura 1 Mapa de Papua Nueva Guinea indicando los principales sitios de muestreo para el proyecto.

Tica en Costa Rica (Coto, Celajes, Mirador, y Quepos). Una parte de los gorgojos se preservó en formaldehído y otros se conservaron vivos y fueron enviados al Reino Unido donde especímenes vivos fueron seleccionados y congelados a -80°C para análisis de ADN.

Estudio para detección de nematodos

Materiales y métodos

Se hicieron disecciones bajo esteoscopio a aumentos de 25X y 50X. Insectos individuales se colocaron en una pequeña gota de fijador en una caja de petri, y usando pinzas de relojero se montaron en microafilares. Con una jeringa fina se retiraron los elitros para examinar la presencia de estados juveniles infecciosos de nemátodos y ácaros. Luego se diseccionó con cuidado el abdomen para buscar nematodos parasíticos internos (hembras maduras, huevos y jóvenes). Los instrumentos

se lavaron entre cada disección para evitar contaminación cruzada.

La intención original era diseccionar 50 insectos de cada sexo, pero no siempre fue posible debido a la falta de material de *E. kamemnicus* en algunas muestras de Ghana. Los resultados iniciales indicaron que no había diferencias en tasa de infección por nematodos entre hembras y machos y por tanto en la mayoría de los casos se diseccionaron hembras.

Resultados

Los principales resultados del estudio de nematodos se presentan en las tablas 1, 2 y 3, y la Figura 2. En el estudio, los primeros nematodos se encontraron en las poblaciones de PNG. Se halló que el número de hembras parasíticas por gorgojo varió de manera considerable, siendo uno el mínimo y 15 el máximo.

La mayoría de los gorgojos infectados con hembras maduras tam-

bién contenían un gran número de huevos y varios estados juveniles de nematodos parasíticos. En gorgojos altamente infectados, casi toda la cavidad hemocélica estaba ocupada por diferentes estados del parásito.

Las muestras de PNG revelaron que en apariencia algunas poblaciones de gorgojo se encontraban libres de nematodos, mientras que en otras se encontró el parásito en 50% de los gorgojos examinados. En las de Nueva Bretaña Occidental prevalecen bajas

tasas de infección donde se encontraron nematodos parasíticos en tres (Kumbango, Kavugara y Kautu) de las cinco disecciones. En los cinco sitios de muestreo de Nueva Bretaña Occidental, la tasa fluctuó entre 0 y 10% con un valor promedio de 4,8%, y el promedio de hembras maduras por gorgojo infectado fluctuó entre 1.4 y 2.0.

Las muestras de Baraga, Mime Bay mostraron una tasa de infección del 50% con un promedio de 1,6 hembras

Tabla 1 Ocurrencia de nematodos parasíticos, juveniles infecciosos y ácaros en hembras de *Elaeidobius kamerunicus* de Papua Nueva Guinea en el 2000

Sitio		% infectados parasíticos con nematodos	Número promedio de hembras maduras de nematodos/insecto	% con larvas infecciosas	% con ácaros
Provincia	Lamerica	0	0	0	0
Nueva Irlanda	Kabil	0	0	0	0
Provincia	Waigini	4	3.0	0	0
Milne Bay	Baraga	50	1.6	0	0
Provincia Oro	Sangara	8	2.5	0	2
	Embi	20	1.8	0	0
	Dami	0	0	0	0
Nueva Bretaña Occidental	Kumbango	8	2.0	0	0
	Kavugara	6	2.0	0	0
	Kautu	10	1.4	0	0
	Hargy	0	0	0	0

Tabla 2 Ocurrencia de nematodos parasíticos, larvas infecciosas y ácaros en hembras y machos de *Elaeidobius kamerunicus* en Costa Rica

Sitio		% infectados parasíticos con nematodos	Número promedio de hembras maduras de nematodos/insecto	% con larvas infecciosas	% con ácaros
Hembras	Coto 1	0	0	16	0
	Coto 2	0	0	0	0
	Celajes	0	0	18	0
	Mirador	0	0	22	0
	Quepos 1	0	0	10	0
	Quepos 2	0	0	12	0
Machos	Coto 1	0	0	12	0
	Coto 2	0	0	2	0
	Celajes	0	0	20	0
	Mirador	0	0	18	0
	Quepos 1	0	0	6	0
	Quepos 2	0	0	16	0

Tabla 3 Datos combinados de todos los sitios (por país) para incidencia de nematodos hembra, nematodos juveniles infecciosos y ácaros

	País de origen					
	PNG 2000	PNG 2001	PNG combinado	Sumatra	Ghana	Costa Rica
Total gorgojos diseccionados	500	450	950	100	450	600
Número de gorgojos con nematodos	53	28	81	6	1	0
% de infectados con nematodos	10,6	6,2	8,5	6,0	0,2	0
Total nematodos hembra	190	161	350	11	1	0
Promedio hembras/gorgojos infectados	3,58	5,75	4,32	1,83	1	0
Promedio hembras parasíticas/gorgojo	0,38	0,36	0,37	0,11	0,002	0
Gorgojos con larvas infecciosas	1	3	4	15	76	76
% larvas infecciosas	0,20	0,67	0,42	15,0	16,9	12,7
Número de gorgojos con ácaros	0	0	0	0	90	0
% con ácaros	0	0	0	0	20	0

por gorgojo mientras que las de Waigini, el otro sitio de Mime Bay, presentó un porcentaje mucho menor (4%). Las muestras de Sangara, Provincia de Oro, presentaron 8% de parasitismo, pero con un promedio de 2,5 nematodos hembra por gorgojo infectado, mientras que en Embi, también de la Provincia de Oro, fue del 20% con un promedio de 1,8 parásitos hembra por gorgojo infectado. Otras de Lamerika (Nueva Irlanda), Dami y Hargy (ambos de Nueva Bretaña Occidental) no presentaron nematodos parasíticos.

Las muestras de Ghana, por el contrario, no presentaron parasitismo por nematodos con excepción de un gorgojo hembra de Kade, Región Oriental. La infección consistía de un nematodo hembra, varios juveniles y huevos y varios machos inmaduros. Los gorgojos de Ghana presentaron gran cantidad de ácaros. de hecho, el espacio bajo los elitros se encontraba lleno de estos «pasajeros».

Se encontró que el nematodo que parasita el hemocelo del *E. kamerunicus* en PNG es una nueva especie y nuevo género: *E. parthenonema n.g. n. sp.* (Poinar *et al.* 2002). y es probable que esté diseminado en las áreas palmeras del Sureste Asiático. Este tipo de nematodo parasítico extrae

todos sus requisitos nutricionales del huésped y por tanto se espera un alto efecto en la fecundidad, tal vez causando esterilidad debido al agotamiento de la grasa del huésped. Una reducción en las reservas de energía

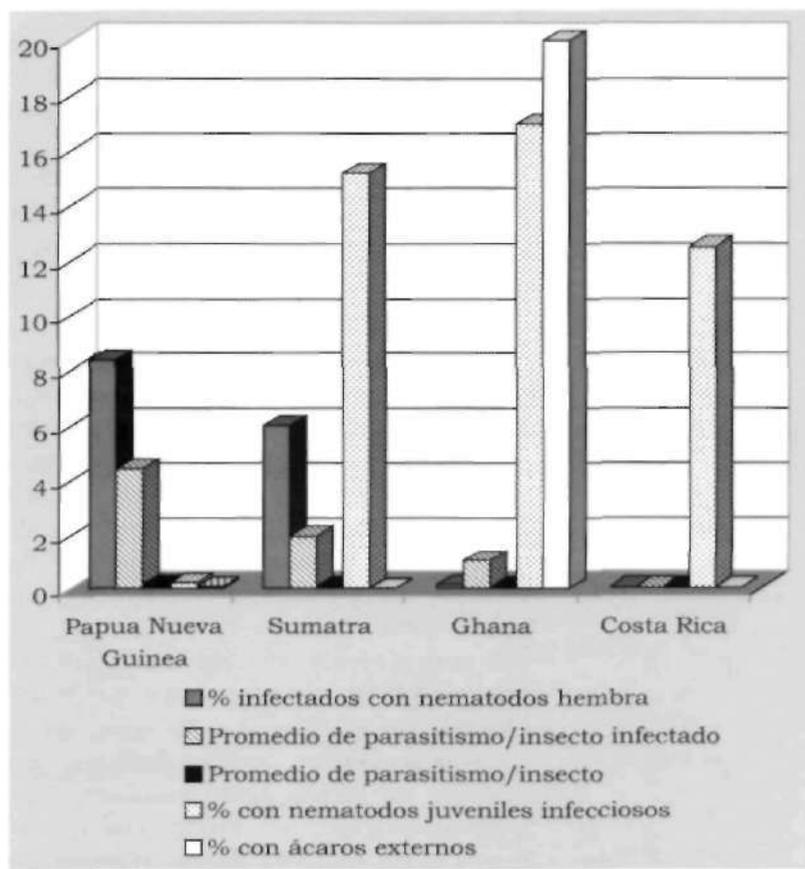


Figura 2 Comparación de parasitismo, por país (nematodos parasíticos, nematodos juveniles infecciosos y ácaros externos).

también puede inhibir la habilidad de vuelo de los gorgojos disminuyendo su habilidad para polinizar las flores de la palma de aceite en un área determinada.

Todavía no es claro si el nematodo *E. parthenonema* fue llevado al Sureste Asiático y a PNG con la introducción original proveniente de África Occidental (esto hubiera causado un nivel de infestación muy bajo ya que los gorgojos se seleccionaron antes de liberarlos), o posteriormente a partir de un foco de infección local. De las nueve poblaciones de gorgojo de Ghana examinadas, sólo una presentó nematodos parasíticos en el hemocelo y se limitó a un nematodo hembra con sus estados juveniles asociados en un solo gorgojo. Este nematodo no se encontraba bien preservado, pero en apariencia pertenecía a un género diferente al *E. parthenonema*. Ninguna de las seis muestras de Costa Rica, otro país en el que *E. kamerunicus* fue introducido para mejorar la polinización, presentó infección por causa de nematodos parasíticos. Desde luego, siempre es posible que el parásito esté presente, pero en cantidades mínimas para ser detectado por esta investigación.

El ciclo de vida del nematodo parece ser así: el nematodo hembra maduro se encuentra en el hemocelo del gorgojo adulto (también es posible que se halle en estado de larva de último instar). La hembra, en forma de salchicha, crece hasta una longitud de varios milímetros, pero menos en infecciones múltiples (Figura 3). El sistema genital ocupa casi todo el cuerpo de la hembra que produce cientos de huevos. En apariencia la reproducción es partenogénica, ya que no se detectaron machos. Los huevos eclosionan dentro del huésped y el parásito se desarrolla probablemente hasta la forma filariforme. Las hembras filariformes (y posi-

blemente larvas de cuarto instar) son ovipositadas por la hembra huésped junto con sus propios huevos. Los nematodos entonces viven por un tiempo en el ambiente en estado libre posiblemente alimentándose de hifas antes de penetrar en la larva del gorgojo y migrar al hemocelo. Aquí, se alimentan de la hemolinfa (posiblemente agotando las reservas de grasa del huésped) creciendo con rapidez hasta la madurez.

Desde luego, el hecho de que el nematodo de PNG no se encontró en las muestras de Ghana no necesariamente significa que el parásito no se haya originado en África Occidental, pero hace pensar en esa posibilidad. Si el nematodo proviene de África Occidental, entonces o tiene muy baja incidencia (sólo un gorgojo, que corresponde al 0,2% de los 450 insectos examinados, tenía entorno-parásitos), o puede ser de ocurrencia local o restringida. Por ejemplo, por razones logísticas no se examinó material de Camerún, y fue de allí que las colonias fundadoras de gorgojo se tomaron desde un principio.

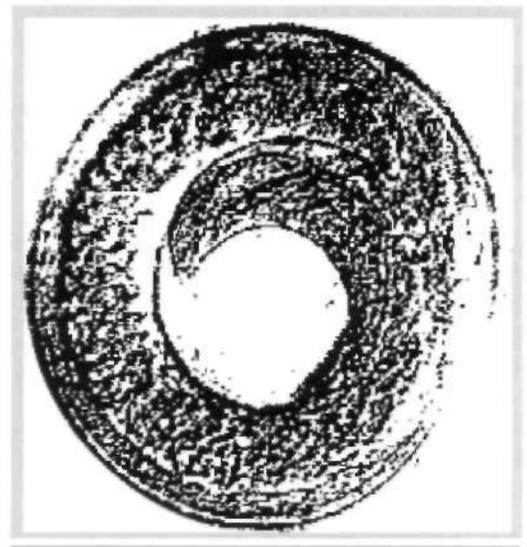


Figura 3 Fotografía de un nematodo hembra maduro del hemocelo de *E. kamerunicus*

Genética molecular de *Elaeidobious*

kamerunicus

Materiales y métodos

De cada sitio se seleccionó un número de gorgojos vivos y se congelaron a -80°C para extracción de ADN. Gorgojos individuales se colocaron en porta objetos en un buffer 100 pl I x TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). Los insectos se diseccionaron bajo microscopio y se examinó la contaminación por nematodos o ácaros. Hasta donde fue posible, sólo gorgojos sin estos contaminantes se usaron para extracción de ADN. Donde no fue posible, se escogió el material con el menor número posible de nematodos o ácaros. El material diseccionado de cada gorgojo individual se colocó en un tubo esterilizado de microcentrífuga de 1,5 mililitros y se guardó a -20°C hasta diseccionar todos los individuos de un mismo sitio. La extracción de ADN se realizó usando un kit Phytopure de extracción de ADN (*Nucleon Biosciences*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de extraer el ADN se colocó en 50 pl de agua destilada y se guardó a -20°C.

Se analizaron cinco gorgojos individuales de cada sitio (Tabla 4). Se hicieron reacciones AFLP usando un protocolo modificado del original de Vos *et al.* (1995). Se realizó una restricción enzimática de 20 pl de ADN genómico usando 5 unidades de EcoR 1 y 5 unidades de Hpa II en Multi-Core Buffer (Promega) en volúmenes de 40 ul por 1 h a 37°C. Adaptadores de cadena doble se ligaron a los fragmentos digeridos de ADN genómico en volúmenes totales de 50 ul usando 1 unidad de T4 DNA Ligase (Promega) en 10x Multi-Core Buffer y 0.1 ul de ATP (100 mM). Las reacciones se incubaron de un día para otro a 37°C. Los adaptadores de

cadena fueron: ECO-AD1 5 segundos CTC GTA GAC TGC GTA CC 3 segundos y ECO-AD2 5 segundos AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3 segundos. HPA-AD 1 5 GAC GAT GAG TCC TGA G 3 y HPA-AD2 5 segundos CGC TCA GGA CTC ATC GT 3 segundos. Todos los iniciadores fueron sintetizados por *Amersham Pharmacia Biotech*. Los adaptadores de doble cadena se mezclaron en cantidades equimolares, se calentaron a 95-C durante 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para formar adaptadores de doble cadena. El ECO-AD se usó a una concentración de 5 pmols/ul y el HPA-AD a 50 pmols/ul. La mezcla de adaptadores ligados se diluyó 1 en 10 con agua destilada y se guardó a -20°C.

Se llevaron a cabo reacciones de preamplificación en una Hybaid PCR-Express usando los adaptadores ECO-AD1 y UPA-ADI como iniciadores en volúmenes de 20 ul mgCl₂ (25mM). 0.5 ul de cada dNTP (20 mM). 0.5 ul de cada iniciador (100 pmol/ul), 0.2 pl

Tabla 4 Origenes de muestras del gorgojo *Elaeidobious kamerunicus* examinados por AFLP y códigos de identificación usados en los árboles

Pais	Sitio de muestra	Código
PNG	Sangara, Provincia Oro	1
PNG	Hargy, Oeste Nueva Britain	2
PNG	Lamerika, Nueva Irlanda	3
PNG	Waigini, Bahía Milne	4
PNG	Dami, Oeste Nueva Britain	5
PNG	Kavugara, Oeste Nueva Britain	6
PNG	Kumbango, Oeste Nueva Britain	7
PNG	Kautu, Oeste Nueva Britain	8
Costa Rica	Coto	CR
Ghana	Kade, región Este	A
Ghana	Ajumato, región Central	B
Ghana	Plantación de aceite de palma Benso, región Oeste	C
Ghana	Colegio Sekondi, región Oeste	D
Ghana	Plantación de aceite de palma Twifo, región Central	E
Ghana	Ankaako, región Central	F
Ghana	Assin Dadieso, región Central	G
Ghana	Ewusiedjoe, región Oeste	H

Taq polimerasa (5 U/ul) (Sigma) y 1 ul de la muestra diluida. Las condiciones de amplificación fueron. 94°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 60 segundos. 72°C por 90 segundos y un paso final de 72°C por 5 minutos. Después de la amplificación, las reacciones se diluyeron 1 en 10 con agua esterilizada y se guardaron a -20°C.

Se realizaron reacciones PCR selectivas usando tres combinaciones de iniciadores. ECO-AT y HPA-CAT, ECO-AT y HPA-CTC. ECO GC y HPA-CTC. Las secuencias esenciales de los iniciadores fueron ECO-NN 5 segundos GAC TGC GTA CCA AAT TC-NN 3 segundos y HPA-NNN 5 segundos GAT GAG TCC TGA GCG G-NNN 3 segundos. Los iniciadores ECO marcados con sustancia fluorescente fueron sintetizados por MWG Biotech y los iniciadores HPA por *Amersham Pharmacia Biotech*.

Se hicieron amplificaciones selectivas en la misma forma en que se hicieron las amplificaciones preselectivas, excepto que el iniciador ECO se usó a la concentración de 2 pmols/ul y 5 mililitros de la amplificación preselectiva se agregó a cada reacción. Las condiciones del ciclo fueron, 94°C por 2 minutos seguido por 13 ciclos de 94°C por 30 segundos. 65°C por 30 segundos (reduciendo 0.7°C cada ciclo). 72°C por 90 segundos seguido de 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos. 72°C por 90 segundos y un paso final de 72°C por 10 minutos. Antes de la electroforesis 10 pl de buffer de cargue (Cambio) se agregó a cada reacción que luego se calentaron a 90°C por 3 minutos y de inmediato se colocó en hielo. Las reacciones se analizaron en un gel de acrilamida Long Ranger (Flowgen) al 8.0% en un secuenciador automático LiCor 4200. Se cargó un marcador molecular con

tamaños de banda de pares base (MWG Biotech) de 350, 325, 300, 255. 230, 204. 200. 175. 145. 120. 105. 100. 95 75 y 50 entre cada 10 líneas de muestra para permitir la calibración de cada gel en análisis subsiguientes.

Para analizar los datos de AFLP se usó el software GelComparII (Applied Maths). Con los datos de AFLP se construyó una tabla binaria indicando la presencia/ausencia para cada uno de las 341 bandas resultantes de las varias combinaciones de iniciadores. Luego, la tabla binaria se analizó en PAUP v4b.10 usando el método Neighbor-Joining con la opción BioNJ en efecto, un cálculo bootstrap con 1.000 muestras (también basado en Neighbor-Joining) y búsqueda heurística para análisis de parsimonia también con 1.000 ciclos de *bootstrapping*.

Resultados

El análisis AFLP usando tres combinaciones selectivas de iniciadores produjo un total de 341 bandas. Éstas se clasificaron en presentes/ausentes usando Gel Compar II para cada una de las 85 muestras analizadas y la tabla binaria resultante se trató con tres formas diferentes de análisis usando PAUP. Las tres técnicas produjeron árboles con topologías similares. La Figura 4 muestra el filograma de Neighbor-Joining, indicando dos árboles filogenéticos, una con los aislados de Papua Nueva Guinea y Costa Rica y la otra con las muestras de Ghana. Cada una de estos árboles filogenéticos puede ser subdividido. Dentro de las muestras de Ghana hay dos árboles filogenéticos. El primero contiene todos los aislados de los sitios B, D y G y dos muestras del sitio H y 1 del sitio E. El segundo contiene todos los aislados del sitio A. C y F y el resto de las muestras de los sitios E (4) y H(3).

Dentro del árbol filogenético de Papua Nueva Guinea hay una rama que contiene las muestras de Costa Rica y las de los sitios 4 y 8. El resto

de las muestras de Papua Nueva Guinea se agrupan en una rama separada dentro de la cual es posible distinguir otras ramas, una que

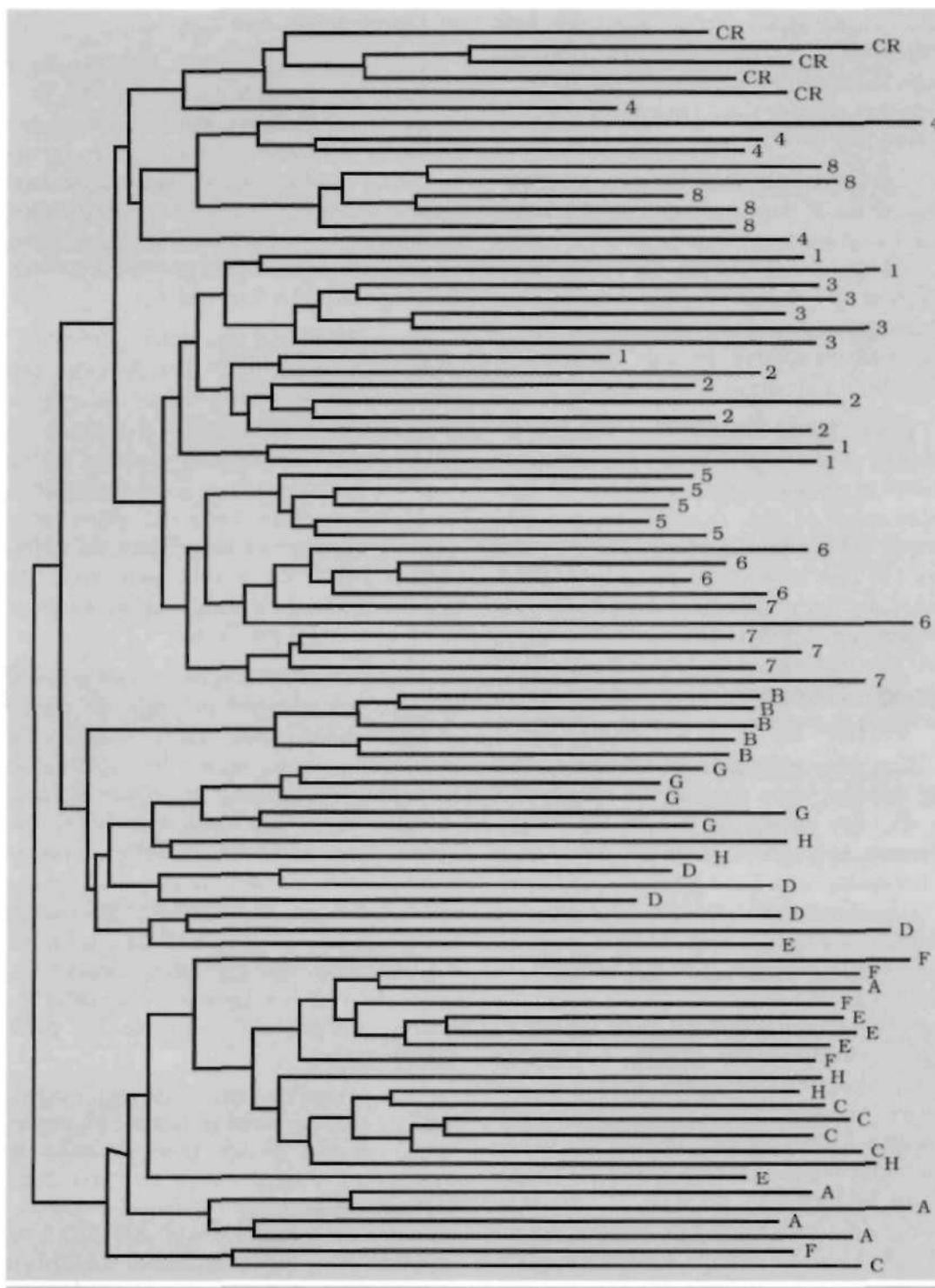


Figura 4 Filograma de Neighbor-Joining

contiene las de los sitios 1, 2 y 3; y 5, 6 y 7. Cuando se realiza un análisis *bootstrap* en estos datos usando *neighbor-joining*, el diagrama filogenético (Figura 5) presenta una topografía similar al árbol NJ (Figura 4). Las muestras de Ghana y Papua Nueva Guinea permanecen separadas y existen otras dos ramas para las muestras de Ghana.

Estas dos ramas en su mayoría contienen las mismas muestras del árbol NJ. El árbol *bootstrap* separa los sitios 4 y 8 de Costa Rica y Papua Nueva Guinea del resto de sitios de Papua Nueva Guinea pero en este árbol el resto de muestras no son fácilmente separadas en otras dos ramas.

El análisis heurístico de parsimonia junto con *bootstrapping* produce un cladograma (Figura 6) con exactamente los mismos grupos del árbol NJ en la Figura 4. En general los valores *bootstrap* para los nodos más profundamente enraizados no están bien soportados por los árboles en las figuras 4 y 5 pero como la topografía general de los tres árboles es similar, esto no es muy importante.

Los tres métodos de construcción de árboles dan resultados similares, o sea, las muestras de Papua Nueva Guinea son genéticamente diferentes a las de Ghana. Las muestras de Costa Rica se agrupan con los aislados de Papua Nueva Guinea, lo que sugiere que esta población es un subconjunto de las poblaciones introducidas originalmente a Papua Nueva Guinea y no un nuevo aislado de África. El fuerte soporte de las ramas separadas de las muestras de Papua Nueva Guinea y Ghana indica que la población anterior está evolucionando en forma separada de las de África. Sin embargo, las longitudes de las ramas en el árbol de *Neighbor-Joining* (Figura 4) no indican menor diversidad genética que en los aislados de Ghana. Esto puede ser debido a que la po-

blación fundadora fue suficientemente grande como para evitar la ocurrencia de un cuello de botella genético o, más probablemente a que no ha habido tiempo suficiente para que el efecto se manifieste.

Por tanto, cualquier disminución en la eficacia de la población de gorgojos observada en algunas áreas del Sureste Asiático puede ser en gran parte causada por nematodos parásitos, aunque esta susceptibilidad podría, a su vez, ser causada por bajos niveles de diversidad genética dentro de la población fundadora.

Sería muy útil tener un método rápido para examinar la infección por nematodos en poblaciones de gorgojos. Esto se podría lograr clonando un fragmento de ADN específico de la especie del nematodo. Los iniciadores PCR se pueden diseñar para amplificar esta pieza específica de ADN, permitiendo la rápida selección de poblaciones de gorgojo para evaluar el impacto del parásito.

Desafortunadamente no es posible determinar el nivel de flujo de genes usando datos AFLP. Esto se debe a la forma en que los marcadores AFLP se heredan en forma dominante, haciendo imposible clasificar heterocigotos. Para obtener un reflejo verdadero de los niveles de flujo de genes entre los sitios en PNG sería necesario seleccionar las poblaciones usando un marcador que permita la clasificación de heterocigotos. Los marcadores microsatélites son ideales para este estudio.

La ventaja de construir una biblioteca de marcadores es doble. Primero, sería posible determinar el nivel de integración de cualquier introducción subsiguiente de nuevas poblaciones de gorgojos de África. Los marcadores microsatélite también permitirían la medición de la dispersión de aislados recién introducidos a partir de su fuente.

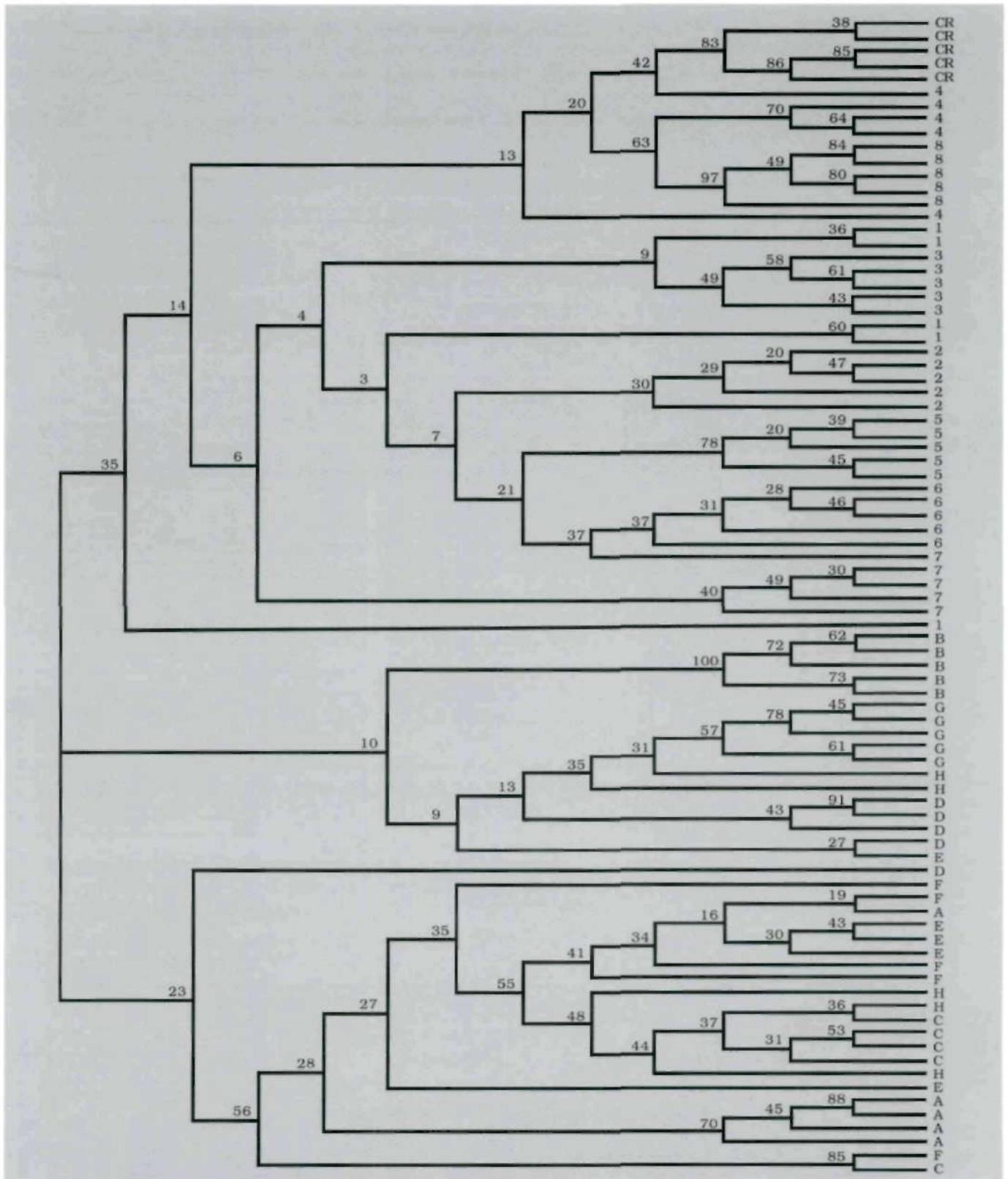


Figura 5 Neighbor-Joining Bootstrap cladograma. Los números en los nodos son valores Bootstrap

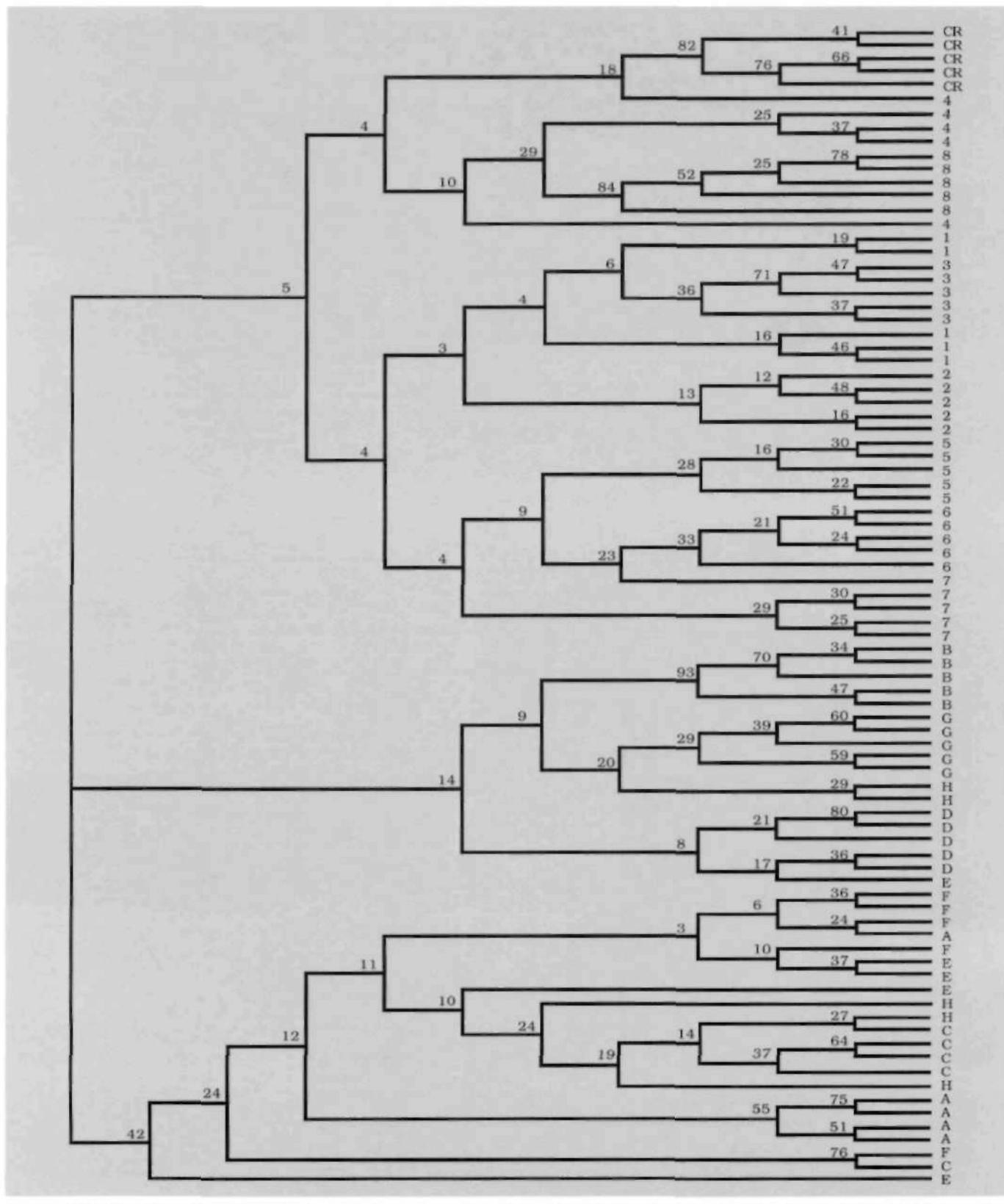


Figura 6 Cladograma de análisis bootstrap y parsimonia. Los números en los nodos son valores bootstrap

Potencial para nuevo material genético

Durante el proyecto se encontró un gran número de insectos en inflorescencias masculinas y femeninas de palma de aceite en Ghana. Estos insectos se encontraban en la inflorescencia masculina durante la antesis y en flores femeninas durante los primeros días de receptividad. De los insectos presentes en inflorescencias masculinas. *Elaeidobious spp.* y *Atheta spp.* fueron los más abundantes. Éstos incluyen *E. kamerunicus*, *E. plagiarus* y *E. subvittatus*. De los insectos presentes en gran número en inflorescencias masculinas sólo *E. subvittatus* y *Atheta sp.* se encontraron en inflorescencias femeninas, y en muy poca cantidad. Sin embargo, como lo reportó Syed (1979), observaciones continuas de inflorescencias femeninas a lo largo del período de receptividad revelaron que un gran número de insectos las visitaron durante el día y que estos insectos tienden a llegar en bandadas intermitentes.

También se pudo establecer que *E. kamerunicus*, *E. plagiarus* y *E. subvittatus* visitan las inflorescencias femeninas normalmente cargados con granos de polen. Se detectó que especies de *Elaeidobious* llevan el mayor número de granos de polen. Sin embargo, durante el trabajo de campo se halló que la taxonomía del género *Elaeidobious* es algo complicada, y que por lo menos dos especies no descritas previamente se encuentran dentro del género. Se han descubierto dos especies nuevas de *Elaeidobious* y están en proceso de estudio. Además, el género *Elaeidobious* también se ha revisado. El Museo de Historia de Londres está elaborando una guía taxonómica que es absolutamente esencial para nuevas operaciones de campo.

En Costa Rica, donde se encuentran presentes *M. costaricensis*, *E.*

subvittatus y *E. kamerunicus*, se precisó que *E. kamerunicus* supera a las otras dos especies. *E. kamerunicus* es el polinizador dominante la mayor parte del año, y es en especial, útil ya que es numeroso y activo tanto en clima moderadamente seco como en clima húmedo. También se encontró que llevan más granos de polen que las otras dos especies y responde mejor al aroma de la inflorescencia femenina (Chinchilla y Richardson, 1991). El *E. kamerunicus* también tiene la ventaja de tener la palma de aceite como huésped específico, mientras que el *M. costaricensis* se alimenta de muchas otras palmas incluyendo la de coco. Se halló que la lluvia por lo general tiene un efecto muy depresivo tanto en *M. costaricensis* como en *E. subvittatus*. De hecho, esto fue lo que generó el interés para introducir el *E. kamerunicus* africano.

De igual modo ha sido muy difícil identificar insectos que puedan competir con *E. kamerunicus* para mejorar la polinización de la palma de aceite en PNG. Por tanto, se recomienda la introducción de lotes nuevos de *E. kamerunicus* en PNG de África. Sin embargo, esto no se puede hacer antes de resolver la incertidumbre alrededor de la taxonomía del género *Elaeidobious*, en particular, con relación al estatus de las dos especies no descritas previamente dentro del género, y qué impacto puedan tener en la polinización. Otros problemas incluyen la ocurrencia generalizada de parasitismo por nematodos en las poblaciones de gorgojos polinizadores en PNG, y la falta de información biológica con relación a estos parásitos. en especial, sobre el efecto que puedan tener en el huésped. El hecho de que el origen de los nematodos es todavía incierto tiene implicaciones en los requisitos de cuarentena de nuevas introducciones.

Discusión general

Se ha progresado de manera considerable para encarar cada uno de los tres objetivos originales del proyecto. Sin embargo, se requiere de más trabajo para entender completamente los asuntos científicos que han surgido durante el proceso. Después de resolver estos asuntos, la meta para introducir nuevo material genético puede seguir adelante.

Para futuros trabajos:

1. Se requieren más estudios sobre la ecología, biología y distribución de nematodos entomopatógenos para cuantificar el impacto real y potencial del parásito en su huésped y el efecto en la polinización y por tanto en la producción de la palma de aceite. El hecho de que el origen de los nematodos es todavía incierto tiene implicaciones en los requisitos de cuarentena de nuevas introducciones. Además, la ocurrencia generalizada del parásito ha hecho que la extracción de ADN sea difícil y dispendiosa.
2. Se necesitan asimismo estudios adicionales en África Occidental para establecer si el entomopatógeno está presente en otras áreas y si es así, a qué nivel. Es esencial el examen de especies relacionadas de *Elaeidobious* (incluyendo especies presentes en Ghana, ahora conocidas a raíz de este proyecto, pero no descritas todavía) si se va a considerar la introducción de un

nuevo polinizador en áreas donde la palma de aceite no es nativa.

3. Se debe llevar a cabo un análisis molecular de nuevas especies de *Elaeidobious* para determinar la variabilidad genética entre las diferentes especies. Esto se puede lograr con el análisis de datos generados de la región espaciadora interna transcrita del cistrón ribosomal de ADN. La generación de estos datos conduciría a un mejor entendimiento de las relaciones dentro del género.
4. Se recomienda desarrollar una técnica rápida, preferiblemente cuantificable y suficientemente robusta para usar en campo, para detectar nematodos entomopatógenos en poblaciones de gorgojos, obviando la dispendiosa tarea de diseccionar numerosos insectos. Un ensayo de este tipo también sería útil para objetos de cuarentena.
5. Se debe también hacer un ensayo basado en microsatélites para permitir la medida real de flujo de genes entre diferentes poblaciones de gorgojo tanto en África como en PNG.
6. Se debe resolver la incertidumbre alrededor de la taxonomía del género *Elaeidobious*, en particular, el estatus de las dos especies dentro del género no descritas con anterioridad. También se debe investigar el papel que desempeñan estas dos especies en la polinización de la palma de aceite.

Referencias

- Basri, MW. 1984. Developments of the oil palm polinator *Elaeidobious kamerunicus* in Malaysia. *Palm Oil Developments*. 2. 1-3.
- Bulgarelli, J.; Chinchilla, C; Rodríguez, R. 2002. Male inflorescences, population of *Elaeidobious kamerunicus* and pollination in a young commercial oil palm plantation in dry area of Costa Rica. *ASD Oil Palm Papers* (Costa Rica) 24: 32-37.
- Chinchilla, C; Richardson, DL. 1991. Pollinating insects and the pollination of oil palm in Central America. *ASD Oil Palm Papers* (Costa Rica) 2 (Special number).
- Hardon, JJ., Corley. R.IV. 1976. Pollination. In: *Developments in Crop Science 1*. Corley. R.H.V. Hardon. JJ and Wood. B.J. (Eds.). Elsevier. Amsterdam. pp.532.
- Hardon. JJ. and Turner, PD. 1967. Observations on natural pollination in commercial plantings of oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ma-

laya. *Experimental Agriculture*, 3:105-116.

Kang, SM.; Zama, AK. 1982. Quarantine aspects of the introduction into Malaysia of an oil palm insect pollinator. In: Proceedings of International Plant Protection in the Tropics. Malaysian Plant Protection Society. Kuala Lumpur.

Mariau, D.; Genty, P. 1988. IRHO contribution to the study of oil palm insect pollinators in Africa, South America and Indonesia. *Oleagineux* 43 (6): 233-240.

Ming, KS. 1999. The *Elaeidobious kamerunicus* story. *The Planter*, 75 (876), 143-150.

Poinar, GO. Jr.; Jackson, TA, Bell, NL; Wahid, MB. 2002. *Elaeolenchus parthenonema* n.g., n.sp. (Nematoda: Sphaerularioidea. Anandranematidae, fam.) parasitic in the palm-pollinating weevil *Elaeidobious kamerunicus* Faust, with a phylogenetic synopsis of the Sphaerularioidea Lubbock, 1861. *Systematic Parasitology* 52: 219-225.

Rao, V.; Law, IH. 1998. The problem of poor fruitset in parts of East Malaysia. *The Planter* (Malaysia) 74 (870), 463-483.

Syed, RA. 1979. Studies on oil palm pollination by insects. *Bulletin of Entomological Research*, 69: 213-224.

Syed, RA. 1986. Report on supply of *Elaeidobious kamerunicus* from low and high rainfall localities of Cameroon to Costa Rica for United Fruit Co., *Oil Palm Operations*. Harrisons Fleming Advisory Services Ltd. 10p.

Turner, PD.; Gilbanks, RA. 1974. Oil palm cultivation and management. *Incorporated Society of Planters*. Kuala Lumpur, pp.672.

Vos, P.; Hogers, R.; Blecker, M.; Reijans, M.; Lee, Th. van der, Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuisper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.

The image shows the cover of a CD-ROM. The background is orange with a large, faint circular graphic. The text is in white and yellow. At the top left, it says 'CD-ROM' in yellow. The main title is 'El cultivo de la Palma de Aceite y su beneficio' in large white letters. Below that, it says 'Guía general para el nuevo palmicultor' in smaller white letters. The cover itself is green and features several images: a landscape with palm trees, a close-up of palm fruit, and a person working in a field. The text on the cover includes 'Multimedia Interactivo' and 'El cultivo de LA PALMA DE ACEITE y su beneficio'. At the bottom, it says 'Guía general para el nuevo palmicultor' and includes logos for 'cenipalma' and 'fedepalma'. At the very bottom of the CD-ROM cover, it says 'Obtégalo llamando a Fedepalma al 3138600 extensión 170 o a través de la página web www.fedepalma.org'.

CD-ROM

El cultivo de la Palma de Aceite y su beneficio

Guía general para el nuevo palmicultor

Multimedia Interactivo

El cultivo de LA PALMA DE ACEITE y su beneficio

Guía general para el nuevo palmicultor

cenipalma fedepalma

Obtégalo llamando a Fedepalma al 3138600 extensión 170 o a través de la página web www.fedepalma.org