

# CONTENIDO

## RESUMEN

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCION  | 1  |
| 2. ANTECEDENTES  | 3  |
| 2.1    Amarillamiento letal del cocotero   | 3  |
| 2.2    Control del amarillamiento letal  | 3  |
| 2.3    Riesgo de transmisión del amarillamiento letal por semilla                  | 4  |
| 2.3.1    Estudio sobre transmisión de virus por semilla                            | 4  |
| 2.3.2    Estudios de transmisión de OTMs por semilla                               | 5  |
| 2.4    Métodos convencionales de detección de OTMs                                 | 5  |
| 2.4.1.    Microscopía.   | 5  |
| 2.4.1.1 Microscopía electrónica  | 5  |
| 2.4.1.2 Microscopía de fluorescencia   | 6  |
| 2.4.2.    Antibióticos   | 6  |
| 2.5    Métodos moleculares de detección  | 7  |
| 2.5.1    Sondas moleculares de ADN   | 7  |
| 2.5.2    Reacción en cadena de la polimerasa                                       | 8  |
| Tabla donde se resume los métodos utilizados para la detección y diagnóstico de AL | 9  |
| 3.MATERIALES Y METODOS.  | 10 |
| 3.1    Sitios de muestreo  | 10 |
| 3.2    Colecta del material biológico  | 11 |
| 3.3    Conservación de muestras.   | 11 |
| 3.4    Extracción de ADN total.  | 12 |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.1     | Extracción de ADN de los Embriones.  | 12        |
| 3.4.2     | Extracción de ADN de los tejidos de las palmas.                                  | 12        |
| 3.4.3     | Cuantificación y visualización del ADN de las muestras.                          | 13        |
| 3.5       | Análisis de las muestras por medio de sonda molecular LYI43                      | 13        |
| 3.5.1     | Prehibridación e hibridación.  | 13        |
| 3.5.2     | Revelado de la membrana  | 14        |
| 3.6       | Evaluación de la germinabilidad de semillas de palmas enfermas.                  | 15        |
| 3.7       | Detección de OTMs en plántulas de semillas de palmas enfermas.                   | 15        |
| 3.8       | Análisis por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).              | 15        |
| 3.8.1     | Mezcla de reacción para la RCP   | 15        |
| 3.8.2     | Condiciones del termociclador  | 16        |
| 3.8.3     | Evaluación del producto amplificado.   | 16        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS</b>  | <b>17</b> |
| 4.1       | Validación de la metodología para la detección del AL con sondas moleculares.    | 17        |
| 4.2       | Detección del OTM del AL en embriones de cocotero.                               | 18        |
| 4.2.1     | Estudios de embriones de palmas de Yucatán.                                      | 19        |
| 4.2.1.1   | Evaluación de palmas madres de Yucatán.  | 19        |
| 4.2.1.2   | Evaluación de la presencia del OTM en embriones de palmas infectadas de Yucatán. | 19        |
| 4.2.2     | Estudios de embriones de palmas de Jamaica.                                      | 20        |
| 4.2.2.1   | Evaluación de palmas madres de Jamaica.  | 20        |
| 4.2.2.2   | Evaluación de la presencia del OTM en embriones de palmas infectadas de Jamaica  | 21        |
| 4.2.3     | Estudios de embriones de palmas de Belice.                                       | 22        |
| 4.2.3.1   | Evaluación de palmas madres de Belice.   | 22        |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.2.3.2 | Evaluación de la presencia del OTM en embriones de palmas infectadas de Belice.               | 22 |
| 4.2.3.3 | Evaluación de la germinabilidad de semillas de palmas enfermas de AL.                         | 22 |
| 4.4     | Evaluación de la presencia del OTM del AL en plántulas.                                       | 23 |
|         | Tabla de resultados de plántulas de semillas de palmas enfermas analizadas con la sonda LYI43 | 23 |
| 5.      | DISCUSION.  | 24 |
| 5.1     | Validación de la metodología de Sondas Moleculares.   | 24 |
| 5.2     | Detección del agente causal del AL por medio de RCP.  | 24 |
| 5.3     | Evaluación de la presencia del OTM en palmas madres.  | 25 |
| 5.4     | Evaluación de la presencia del OTM en semillas de palmas enfermas del AL.                     | 26 |
| 5.5     | Evaluación de la germinabilidad de semillas de palmas enferma de AL.                          | 26 |
| 5.6     | Evaluación de la presencia del OTM en plántulas de semillas de palmas enfermas.               | 27 |
| 5.7     | Riesgo de transmisión del AL a través de semillas.  | 27 |
| 5.8     | Relaciones genéticas del OTM del AL.  | 28 |
| 6.      | CONCLUSIONES.   | 29 |
| 7.      | PERSPECTIVAS.   | 30 |
| 8.      | LITERATURA CITADA   | 31 |

---

---

## RESUMEN

---

El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad devastadora del cocotero y otras especies de palmas que no ha podido ser controlada mediante métodos químicos ni biológicos. Es causada por un organismo tipo micoplasma (OTM) y es transmitida por el insecto vector *Myndus crudus*. La única alternativa disponible actualmente para enfrentar a la enfermedad del AL es mediante la utilización de variedades resistentes. La importación temporal de semillas de genotipos resistentes de otros países apoyaría adicionalmente a un programa nacional de producción de variedades resistente. Se ha especulado sobre la posible transmisión del AL por medio de la semilla. Hasta la fecha no hay evidencias de que esto suceda. Sin embargo, debido a las repercusiones fitosanitarias y económicas, en el presente trabajo se evaluó por métodos moleculares la presencia del OTM del AL en extractos de ADN de tejidos de diferentes partes, incluyendo embriones de palmas de cocotero de México, Belice y Jamaica. Se evaluó la viabilidad de semillas de palmas enfermas y la presencia del patógeno en plántulas germinadas de estas semillas. Se extrajo el ADN de tejidos de inflorescencia, hoja, meristemo apical, raíz y del embrión. Para detectar la presencia del OTM del AL, el ADN de los tejidos fue analizado por Sondas Moleculares y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Se detectó la presencia del OTM en los tejidos de las palmas de los países antes mencionados. Por primera vez se presenta evidencia de la presencia del OTM en semillas de palmas afectadas por el AL. Se encontró que semillas de palmas infectadas son viables, aunque se reduce el porcentaje de germinación. En las plántulas de estas semillas no se detectó el OTM. Los resultados obtenidos son insuficientes hasta el momento para decir si hay o no riesgo de transmisión del OTM causante del AL por medio de las semillas. Será necesario hacer estudios más extensos como la detección del OTM en plántulas germinadas a partir de estas semillas y el desarrollo del AL en las plántulas que contienen al patógeno y de esta manera tener una respuesta definitiva.