

INDICE

INTRODUCCION	1
I ANTECEDENTES	5
1.1.- GENERALIDADES	5
1.2.- CLASIFICACION	5
1.2.1.- DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL COCOTERO	6
1.3.- CULTIVO DEL COCOTERO EN MEXICO	7
1.3.1.- PRODUCTOS DERIVADOS DEL COCO	8
1.4.- EL AMARILLAMIENTO LETAL (AL)	9
1.4.1.- ORIGEN Y DISTRIBUCION	9
1.4.2.- AGENTE CAUSAL	10
1.4.2.1.-MORFOLOGIA y REPRODUCCION	11
1.4.2.2.-LOCALIZACION Y DISTRIBUCION EN LOS TEJIDOS	12
1.4.2.3.-SINTOMAS PRODUCIDOS POR FITOPLASMAS	12
1.5.- VECTOR	12
1.6.- SINTOMAS	13
1.6.1.- SINTOMAS EN PALMAS DE COCO	13
1.6.2.- SINTOMAS DE AMARILLAMIENTO EN OTRAS PLANTAS	14
1.7.- PERIODO DE INCUBACION	15
1.8.- CULTIVO IN VITRO DE FITOPLASMAS	15
1.9.- DIAGNOSTICO Y DETECCION EN PLANTAS INFECTADAS CON FITOPLASMAS	17
1.9.1.- METODOS CONVENCIONALES	17
1.9.1.1.- SINTOMAS VISUALES	17
1.9.2.- MICROSCOPIA	18
1.9.3.- METODOS MOLECULARES	18
1.9.3.1.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP)	19
1.9.3.2.-ENZIMAS DE RESTRICCION	21
II.- OBJETIVOS E HIPOTESIS	23
III.-MATERIALES Y METODOS	24
3.1.-MATERIAL BIOLOGICO	25
3.2.- COLECTA	25
3.3.- CONSERVACION DE LAS MUESTRAS	26
3.4.- CULTIVO	26
3.4.1.- CONDICIONES DE LOS CULTIVOS	28
3.5.- EXTRACCION DE A.D.N.	29
3.6.- CUANTIFICACION DEL "ADN" DE LAS MUESTRAS	30
3.7.-AMPLIFICACION DE LAS MUESTRAS	30
3.7.1.-CONDICIONES DE LA MEZCLA DE REACCION	30

3.7.2.-CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR	32
3.8.-DETECCION DEL PRODUCTO AMPLIFICADO	33
3.9.-DIGESTION DEL PRODUCTO AMPLIFICADO CON ENZIMA	33
3.9.1.- CONDICIONES PARA LA DIGESTION CON ENZIMAS	33
IV.-RESULTADOS	34
4.1.-SOBREVIVENCIA DE LOS CULTIVOS IN VITRO	34
4.2.- DETECCION DEL PATOGENO POR " RCP".	39
4.2.1.-DETECCION DE FITOPLASMAS EN CULTIVOS IN VITRO.	42
V.-DISCUSION	46
VI.-CONCLUSIONES.	49
VII.- APENDICE	50
VII.- BIBLIOGRAFIA	56

RESUMEN

El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad devastadora que afecta a más de 30 especies de palmas, incluyendo a la palma de coco (*Cocos nucifera* L.). Desde que el AL apareció en México, en la Península de Yucatán hace casi 20 años ha matado a la gran mayoría de las palmas de cocotero. Actualmente la enfermedad se ha dispersado hasta el estado de Tabasco. Se conoce que el agente causal de esta enfermedad es un organismo tipo micoplasma conocido actualmente como **FITOPLASMA**. El cual es transmitido por un insecto vector *Myndus crudus*.

Una de las principales limitantes del estudio del AL es que hasta el momento el patógeno no se ha podido cultivar *in vitro*, lo que ha retrasado su caracterización y la posibilidad de desarrollar tratamientos efectivos para el control de la enfermedad. Por lo cual este trabajo tuvo como finalidad la obtención de cultivos *in vitro* de tejidos de plantas enfermas, que contengan al fitoplasma causante del AL, para de esta manera poder conocer más sobre él, como por ejemplo sus requerimientos nutricionales, respuesta a diferentes antibióticos y eventualmente obtener cultivos del fitoplasma libres de células vegetales. Con éste fin se cultivaron *in vitro* tejidos de palmas de *C. nucifera* afectadas por AL y tejidos de *Catharanthus roseus* con síntomas de enfermedades causadas por fitoplasmas. Los tejidos probados para cocotero fueron : inflorescencias, hoja joven, meristemo apical (cogollo), embrión y raíz. De los tejidos probados el embrión fue el que presentó mayor sobrevivencia seguido por la hoja joven. Para la detección de la presencia de fitoplasmas en los tejidos, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los análisis mostraron que el fitoplasma del AL, únicamente pudo ser detectado en un porcentaje bajo (3 %) de los explantes de cocotero cultivados *in vitro*. La detección se logró solo durante la primera semana de cultivo, no pudiéndose registrar ningún resultado positivo en incubaciones más prolongadas. En el caso de *C. roseus*, la sobrevivencia de los tejidos fue muy pobre y el porcentaje de detección de fitoplasmas fue más alto que en cocotero (11 %). Las detecciones también se registraron dentro de la primera semana de cultivo. En este caso, el análisis por RCP y enzimas de restricción del ADN de muestras de tejidos enfermos, mostró que los fitoplasmas presentes en *C. roseus* son distintos del fitoplasma que causa el AL.