

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN-----	1
2.	JUSTIFICACIÓN-----	3
3.	HIPÓTESIS-----	4
4.	ANTECEDENTES-----	5
4.1.	Cocotero-----	5
4.2.	Variedades-----	6
4.3.	El Amarillamiento Letal-----	7
4.4.	Fitoplasmas-----	9
4.5.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)-----	13
4.6.	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real-----	16
4.6.1.	PCR en Tiempo Real-----	16
4.6.2.	Estudios Realizados Empleando PCR en Tiempo Real-----	18
4.6.2.1.	Bacterias y hongos-----	18
4.6.2.2.	Virus-----	19
4.6.2.3.	Fitoplasmas-----	19
5.	OBJETIVO GENERAL-----	20
5.1.	Objetivos Específicos-----	20
6.	MATERIALES Y MÉTODOS-----	21
6.1.	Colección de muestras-----	21
6.2.	Extracción de ADN-----	21
6.3.	Estandarización del Método de Cuantificación por Fluorometría-----	22
6.4.	Cuantificación de ADN de palmas sanas y enfermas-----	25
6.5.	Evaluación de cebadores-----	25
6.6.	Elaboración de la curva estándar-----	26
6.7.	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real-----	27
6.8.	Ánalisis de los productos amplificados por PCR en Tiempo Real-----	28
6.9.	Ánalisis estadístico-----	28
7.	RESULTADOS-----	29
7.1.	Detección del Fitoplasma del AL en palmas muestreadas-----	29
7.2.	Estandarización del protocolo de cuantificación de ADN-----	29
7.3.	Contenido de ADN en distintos tejidos de palma enferma-----	30

7.3.1. Contenido de ADN en palma sana-----	31
7.4. Curvas de disociación-----	32
7.5. Determinación de la curva de calibración para la cuantificación-----	34
7.6. Evaluación del gen de la Retinoblastoma-----	37
7.7. Cuantificación relativa del ADN del Fitoplasma del AL-----	38
8. DISCUSIÓN-----	40
9. CONCLUSIONES-----	45
10. APÉNDICE-----	46
11. BIBLIOGRAFÍA-----	50
12. ABREVIATURAS-----	56

RESUMEN

El Amarillamiento Letal (AL) es una enfermedad causada por fitoplasmas que afectan al cocotero entre muchas otras especies de palmas y especies no palmáceas. Actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su modalidad "anidado" es la opción más utilizada para su detección. La más reciente innovación en la detección de fitoplasmas es la PCR en tiempo real que permite incluso cuantificarlos. Un mejor entendimiento de la biología de los fitoplasmas que causan el AL es un prerequisito importante para poder desarrollar mejores medidas de control. El objetivo de este trabajo fue implementar una metodología de PCR en tiempo real para la cuantificación relativa del ADN de fitoplasmas del AL.

El primer paso fue determinar el contenido de ADN de las palmas por medio de fluorometría. Los tejidos que contuvieron mayor concentración de ADN total fueron las inflorescencias, las hojas, raíces y cogollo en un rango de 580 µg – 1200 µg/PF. Por el contrario los troncos presentaron una muy baja cantidad de ADN (0 - 16µg). Las palmas sanas mostraron un rango similar al de las palmas enfermas con un contenido de 70µg (troncos) a 853µg (demás tejidos). Se probaron diferentes cebadores específicos para el AL que dieran resultados positivos de detección en el extracto de DNA de una palma con síntomas, sin la necesidad de realizar PCR anidado. Los cebadores LY13/LY15 fueron los más adecuados al presentar una alta eficiencia en la reacción de PCR y una gran sensibilidad utilizando SYBR Green I como fluoróforo. Mediante una serie de diluciones del extracto ya cuantificado para su concentración de ADN, se determinó una relación lineal (diluciones de ADN contra ciclo umbral) de 0.99, lo cual indicó que estos cebadores eran adecuados para la cuantificación. La curva de dissociación del ADN no mostró amplificaciones espurias. Para normalizar la concentración de ADN en cada corrida de PCR tiempo real se utilizaron cebadores del gen de la Retinoblastoma, este se puso a prueba para evaluar los niveles relativos de ADN de fitoplasma en diferentes partes de dos palmas enfermas. El análisis mostró que los tejidos de las inflorescencias más desarrolladas (-1 y -2), el tronco y los meristemos de raíz presentaron hasta 1.5 veces mayores concentraciones de ADN de fitoplasmas en relación a los otros tejidos.