



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

Parasitismo de *Cassytha filiformis* sobre
Cocos nucifera, *Catharanthus roseus* y
Veitchia merrillii; y su capacidad de
adquisición y transmisión de fitoplasmas

T E S I S

PRESENTADA POR:

ISIDRO OJEDA ALAYON

EN SU EXAMEN PROFESIONAL
EN OPCION AL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

BIBLIOTECA 

MERIDA, YUCATAN, MEXICO.

2 0 0 0

CONTENIDO

	Pags
Lista de cuadros y figuras.....	vi
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
 I. INTRODUCCIÓN.....	 1
II. HIPÓTESIS.	3
III. OBJETIVO GENERAL.....	3
IV. OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
V. MARCO TEÓRICO.....	4
1. Generalidades acerca de los fitoplasmas.	4
2. La problemática del amarillamiento letal del cocotero.....	7
3. Métodos de detección de fitoplasmas.	9
4. Plantas parásitas y su uso en la transmisión controlada de fitoplasmas.....	11
<i>Cassytha filiformis</i> como medio de transmisión de fitoplasmas.....	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
1. Localización de los sitios de colecta.....	16
2. Propagación de <i>Cassytha filiformis</i>	16
a) Colecta y selección de frutos.....	16
b) Tratamiento de las semillas	17
c) Aclimatación de las plántulas de <i>Cassytha filiformis</i>	17
3. Búsqueda y detección de plantas infectadas con fitoplasmas por medio de PCR y nested-PCR.....	17
a) Colecta de muestras.....	18
b) Extracción de ADN.....	18
c) Detección de fitoplasmas por medio de PCR y nested-PCR.....	19
4. Pruebas de parasitismo.	22
5. Pruebas de adquisición y transmisión de fitoplasmas.....	22
6. Análisis de restricción con enzimas endonucleasas (RFLP's).....	24
7. Análisis histológico de las plantas parasitadas.....	24

VII. RESULTADOS.	25
1. Propagación de <i>Cassytha filiformis</i> a partir de semillas.....	25
2. Búsqueda y detección de plantas infectadas por medio de PCR y nested-PCR.....	26
3. Pruebas de parasitismo.....	31
4. Ensayos de adquisición y transmisión de fitoplasmas.....	36
a) En plantas de <i>Catharanthus roseus</i>	36
b) Detección del fitoplasma del AL en plantas de <i>Cassytha filiformis</i> parasitando plantas de <i>Cocos nucifera</i>	39
5. Análisis con enzimas de restricción sobre los productos amplificados (RFLP's).....	42
6. Análisis histológico de las plantas parasitadas.....	45
VIII. DISCUSIÓN.	49
1. Propagación <i>in vitro</i> de semillas.....	49
2. Búsqueda y detección de fitoplasmas por medio de PCR y nested-PCR.....	50
a) Plántulas de <i>Cocos nucifera</i>	50
b) Plantas de <i>Catharanthu. roseus</i>	51
3. Parasitismo de <i>Cassytha filiformis</i>	53
a) Formación del haustorio.....	53
b) Establecimiento de la planta parásita y resistencia del hospedero.....	54
4. Ensayos de adquisición y transmisión de fitoplasmas.....	55
5. Análisis histológico de las plantas parasitadas.....	61
IX. CONCLUSIONES.....	62
X. REFERENCIAS.	64
XI. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	74
Apéndice I. Medio de Murashige-Skoog para la germinación de las semillas maduras e inmaduras de <i>C. filiformis</i>	74
Apéndice II. Metodología utilizada para la extracción de ADN en plantas infectadas por fitoplasmas.....	74
Apéndice III. Iniciadores utilizados en las pruebas de detección de fitoplasmas por medio de PCR..	77
Apéndice IV. Enzimas utilizadas en el análisis de restricción (RFLPs).....	80
Apéndice V. Protocolo para el análisis histológico de las plantas parasitadas.....	80

Resumen

Los fitoplasmas son un grupo de microorganismos parásitos del floema que afectan a más de 300 especies de plantas en todo el mundo. La incapacidad de cultivarlos *in vitro* y transmitirlos mecánicamente ha sido una limitante en su estudio. En la enfermedad del amarillamiento letal (AL) del cocotero (*Cocos nucifera* L.) se ha involucrado uno de estos patógenos, este fitoplasma tampoco ha sido transmitido mecánicamente ni cultivado en condiciones *in vitro*. Una alternativa en la transmisión de estos patógenos son las plantas parásitas, tales como *Cuscuta* y *Cassytha*. La capacidad de transmisión de fitoplasmas en *Cuscuta* ha sido ampliamente comprobada, sin embargo, estas especies no son capaces de establecerse en el cocotero. Existe evidencia de la capacidad de *Cassytha filiformis* de parasitar al cocotero, pero no de su capacidad de transmitir fitoplasma alguno.

El presente trabajo caracteriza el proceso de parasitismo de esta hemiparásita sobre *C. nucifera*, *Catharanthus roseus* y *Veitchia merrillii* en condiciones de invernadero y de duna costera. Los resultados indican que esta hemiparásita es capaz de parasitar las tres especies, pero su establecimiento sobre *C. nucifera* y *V. merrillii* solo fue posible en condiciones de campo (duna costera) en un periodo de 30-45 días y de 30-35 días, respectivamente. Mientras en *C. roseus* el establecimiento se dio en condiciones de invernadero. Los cortes histológicos muestran la penetración del endofito de *C. filiformis* hasta los conductos vasculares de *C. nucifera* y *C. roseus*.

Se reporta la detección por PCR y nested-PCR del fitoplasma del AL en palmas jóvenes (6-24 meses) de cocotero con síntomas en varias localidades y de dos grupos de fitoplasmas distintos del fitoplasma del AL involucrados en los síntomas de filodia, virescencia, amarillamiento y repollado en *C. roseus*.

Por medio de estas técnicas moleculares se comprueba la capacidad de *C. filiformis* de adquirir y transmitir los fitoplasmas que afectan a *C. roseus*. También se presenta evidencia de la adquisición del fitoplasma del AL por *C. filiformis* en palmas de cocotero en grado 0, parasitadas (sin inducción) por *C. filiformis* en una localidad denominada Roca Mar, en la costa norte de Yucatán.

Palabras clave: fitoplasma, *Cassytha filiformis*, *Cocos nucifera*, *Catharanthus roseus*, *Veitchia merrillii*, parasitismo, transmisión, haustorio, amarillamiento letal (AL), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), nested-PCR.