

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	iv
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Generalidades de <i>Cocos nucifera L.</i>	3
2.2. Generalidades de fitoplasmas.....	6
2.3. Amarillamiento letal.....	7
2.3.1. Diagnóstico y detección.....	9
2.3.1.1. Métodos convencionales para el diagnóstico de AL.....	9
Sintomatología.....	9
Microscopía electrónica.....	10
Prueba de fluorescencia con 4'-6' diamidino-2-fenil indol.....	10
2.3.1.2. Técnicas moleculares.....	11
Sondas de ADN.....	11
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
2.3.2. Control del amarillamiento letal.....	14
Quimioterapia.....	14
Medidas sanitarias.....	14
Cuarentena.....	14
Uso de variedades resistentes.....	14
2.4. El uso de plantas parásitas como medio para la transmisión de fitoplasmas.....	15

	Página
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de tejido vegetal.....	17
2.5.1. Componentes nutricionales de medios para cultivos de tejidos.....	18
2.5.2. Cultivo <i>in vitro</i> de inflorescencias de <i>C. nucifera</i>	20
III. Objetivos.....	22
IV. Hipótesis.....	23
V. Diseño experimental.....	24
VI. Materiales y métodos.....	25
6.1. Cultivo <i>in vitro</i> de tejido vegetal.....	25
6.1.1. Localización de los sitios de colectas del material vegetal.....	25
6.1.2. Método de colecta.....	25
6.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> del tejido vegetal.....	26
6.2. Detección del fitoplasma del AL en segmentos de inflorescencia inmadura de <i>C. nucifera</i> cultivada <i>in vitro</i>	29
6.3. Técnica empleada para la detección del fitoplasma causante del AL por PCR.....	30
6.3.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	30
6.3.2. Detección del fitoplasma del AL.....	30
6.3.3. Análisis de los productos amplificados.....	31
6.4. Inducción del parasitismo de <i>C. filiformis</i> sobre inflorescencias inmaduras y plántulas de <i>C. nucifera</i> <i>in</i> <i>vitro</i>	31

6.4.1. Inducción al parasitismo de <i>C. filiformis</i> sobre inflorescencias inmaduras de <i>C. nucifera</i>	31
6.4.2. Inducción al parasitismo de <i>C. filiformis</i> sobre plántulas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>C. nucifera</i>	32
VII. Resultados y discusión.....	33
7.1. Cultivo <i>in vitro</i> de tejido enfermo de <i>Cocos nucifera</i>	33
7.2. Detección del fitoplasma del AL en segmentos de inflorescencia inmadura de <i>C. nucifera</i> cultivada <i>in vitro</i>	33
7.3. Propagación de <i>Cassytha filiformis</i> en sistema <i>in vitro</i>	38
7.3.1. Propagación <i>in vitro</i> de <i>C. filiformis</i> a partir de segmentos nodales.....	38
7.3.2. Propagación <i>in vitro</i> de <i>C. filiformis</i> a partir de semillas de frutos maduros y de frutos inmaduros.....	42
7.4. Inducción del parasitismo de <i>C. filiformis</i> sobre inflorescencias inmaduras y plántulas de <i>C. nucifera</i> <i>in vitro</i>	43
7.4.1. Inducción al parasitismo de <i>C. filiformis</i> sobre inflorescencias inmaduras de <i>C. nucifera</i>	43
7.4.2. Inducción al parasitismo de <i>C. filiformis</i> sobre plántulas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>C. nucifera</i>	46
VIII. Conclusiones.....	49
IX. Referencias bibliográficas.....	50
Apéndice.....	59

RESUMEN

El amarillamiento letal (AL) es una enfermedad devastadora que afecta a más de 30 especies de palmas en el mundo. Esta enfermedad ha causado pérdidas millonarias en la industria del cocotero (*Cocos nucifera L.*) en México y muchos países. El AL es causada por un microorganismo llamado fitoplasma, que hasta la fecha no se ha logrado cultivar *in vitro* y esto ha dificultado el control de la enfermedad ya que no se pueden realizar estudios de transmisión, resistencia, etc.

En el presente trabajo se propusieron bases para establecer un ensayo para la transmisión controlada de los fitoplasmas del AL *in vitro* mediante el uso de *Cassytha filiformis* (que es una planta parásita que se sabe es capaz de albergar a estos microorganismos y que se especula que los obtiene mientras se alimenta de su hospedero) para así poder realizar pruebas de resistencia en plantas de cocotero.

Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad del tejido de inflorescencia inmadura de *C. nucifera* para conservar al fitoplasma del AL mientras permanece en cultivo *in vitro* por PCR y nested-PCR, y se encontró que este tipo de tejido es capaz de mantener al fitoplasma al menos durante tres meses.

Se hicieron pruebas para obtener plántulas de *C. filiformis* mediante la morfogénesis *in vitro* usando como explantes segmentos de tallos con nudos cultivados en medio de cultivo Y3 con diferentes concentraciones de cinetina y se demostró que esta citocinina produce un efecto negativo en la generación de brotes de esta parásita.

Como no se logró conseguir plántulas suficientes para los ensayos de parasitismo con segmentos con entrenudos como explantes, se recurrió a la germinación de semillas de frutos maduros e inmaduros de *C. filiformis* con una metodología establecida en trabajos anteriores.

Las plántulas de *C. filiformis* obtenidas se pusieron en contacto con las inflorescencia y plántulas de *C. nucifera* en cultivo *in vitro*, para crear un sistema de parasitismo, y probándose diferentes condiciones de luz (luz rojo lejano, luz blanca y luz solar). Con estos sistemas no se logró el parasitismo, las inflorescencias inmaduras apenas sobrevivieron un mes después de haber sido puestas a parasitar. Sin embargo, se pudo observar que la luz rojo lejano favorecía el desarrollo de las plántulas de *C. filiformis* y un mayor acercamiento de la planta parásita sobre las plántulas de cocotero al cuarto mes intentando el parasitismo.