

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Papel del ácido abscísico en el comportamiento estomático de palmas de *Cocos nucifera* afectadas por el amarillamiento letal

**TESIS QUE PRESENTA**

SERGIO MARTINEZ AGUIRRE

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

2000



A mis padres, hermanos por toda su comprensión, apoyo y amor, en el desarrollo de esta tesis.

Así como a todos mis amigos y compañeros por la amistad brindada.



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la Dirección del Dr. Jorge M. Santamaría Fernández y el Dr. Carlos Oropeza Salin a quienes agradezco su amistad, confianza, sus excelentes sugerencias y la revisión crítica con la que enriquecieron el presente escrito.

Expreso mi gratitud a las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y hacer uso de sus instalaciones. De igual forma, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado (CONACYT 2220P-B) y por la beca crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (113762)

Agradezco a los revisores externos Dr. Brian Maust, Dr. Carlos Trejo y al Dr. Alejandro Castellanos por sus útiles comentarios.

Agradezco de manera especial la colaboración de la M.C. Margarita de L. Aguilar Espinosa por el entrenamiento técnico recibido en la metodología para la cuantificación del ácido abscísico, a Julián Coello en la cuantificación de los estomas y al M.C. Iván Córdova por su colaboración en la colecta del material biológico y el diagnóstico del amarillamiento letal en las muestras con la técnica de PCR.



## Contenido

	Resumen	1
	Abstract	3
	Introducción	5
	Bibliografía	7
<b>Capítulo 1</b>	Antecedentes	
	La palma cocotera	13
	El amarillamiento letal	15
	Modelo de patogenicidad del amarillamiento letal	24
	Acido abscísico y amarillamiento letal	26
	Fenoles, potasio, azúcares y factores fisicoquímicos	26
	Justificación	29
	Hipótesis	29
	Objetivo General	29
	Objetivos Específicos	29
	Bibliografía	30
<b>Capítulo 2.</b>	El papel del ácido abscísico (ABA) en el cierre anormal de los estomas en palmas de coco enfermas de amarillamiento letal (AL).	
	Introducción	35
	Materiales y Métodos	36
	Resultados	39
	Discusión	45
	Bibliografía	46
<b>Capítulo 3.</b>	Otros factores posiblemente involucrados en el cierre anormal de los estomas en palmas de coco enfermas de Amarillamiento letal (AL).	
	Introducción	49
	Materiales y métodos	51
	Resultados	53
	Discusión	56
	Bibliografía	57
<b>Capítulo 4.</b>	Conclusiones generales y perspectivas	59
	Conclusiones Generales	59
	Posibles alternativas	64
	Perspectivas	66
	Bibliografía	67



## Resumen

El Amarillamiento Letal (AL) es una enfermedad devastadora que afecta a cerca de 30 especies de palmas, entre las que se encuentra la palma cocotera, *Cocos nucifera* L. Uno de los primeros síntomas, y más característicos, es un cierre anormal de estomas que se presenta en forma permanente e irreversible, se pierden las fluctuaciones diarias de apertura y cierre, quedando cerrado en forma definitiva. Este cierre anormal de estomas permanente puede inducir, al menos teóricamente, el desarrollo de los síntomas posteriores del AL (caída de frutos, necrosamiento de las inflorescencias, amarillamiento de las hojas, etc.).

Se ha determinado que en plantas estresadas con factores abióticos (sequía, salinidad, inundación, etc.), el factor principal que regula el cierre de los estomas es el ácido abscísico (ABA). Por lo tanto se intentó determinar si ABA era uno de los factores que pudieran ser la causa de este cierre anormal de estomas en las palmas enfermas de AL.

Para ello se determinaron las concentraciones endógenas de ABA en hojas, savia de xilema y raíces (primarias y secundarias). A pesar de que se mostraron incrementos de este fitoregulador, particularmente en hojas y savia de xilema, estos aumentos en la concentración se presentaron en grados avanzados de la enfermedad, es decir, cuando los estomas ya se encuentran cerrados con mucho tiempo de anticipación. Esto nos indica en forma preliminar que ABA no está involucrado en el cierre anormal de estomas en las palmas afectadas de AL.

Se intentó verificar si los extractos acuosos de las hojas de las palmas enfermas de AL contenían el factor que provocaba el cierre de sus estomas. Se probó su efecto sobre las tasas de transpiración en pinnas de coco sanas y en la apertura estomática de epidermis de *Commelina communis*, no mostrándose diferencia alguna en cuanto al efecto de extracto procedente de hoja de palma sana o de palma enferma. Tanto los extractos de palma sana como de palma enferma tienen la capacidad de provocar el cierre de los estomas en los dos sistemas mencionados anteriormente.

En pruebas realizadas de forma exploratoria, tampoco se encontraron diferencias en cuanto al contenido de compuestos fenólicos solubles, potasio ( $K^+$ ), azúcares (reductores y no reductores), la determinación de la osmolalidad y la conductividad de los extractos de las hojas de palmas sanas y enfermas que pudieran explicar el cierre anormal de los estomas de las palmas enfermas de AL.

Quedan por determinar otros factores que pudieran estar involucrados en este cierre de estomas anormal de las palmas enfermas de AL, como son el estudio de las concentraciones de citocininas, la localización de alguna toxina producida por el patógeno causante de la enfermedad o la existencia de otras sustancias que puedan estar actuando como "antitranspirantes".



## Abstract

Lethal yellowing (LY) is a devastating disease that affects over 30 species of palms, including the coconut palm (*Cocos nucifera* L). One of the first and most characteristic symptoms is abnormal stomatal closure, in permanent and irreversible form. The diseased palms lose the daily fluctuations of stomatal opening and closing. This stomatal closure can induce, in theory, the development of the other symptoms (nutfall, inflorescence necrosis, leaf yellowing, etc.)

In plants stressed with abiotic factors (drought, salinity, flooding, etc.), the principal factor that induced stomatal closure was abscisic acid (ABA) accumulation. Thus, we investigated if ABA was the factor that induced the abnormal stomatal closure in LY-diseased palms.

We determined the endogenous concentrations of ABA in leaf, xylem sap and roots (primary and secondary). The concentration of ABA increased in leaves and xylem sap, but the increases were not exhibited until the late stages of the disease, when the stomata were already closed. This indicated that ABA was not involved in the abnormal closure of stomata in LY-affected palms.

We investigated if the aqueous extracts of the leaves of LY-diseased palms contained the factor that induced the stomatal closure. We assayed their effect on the transpiration rate in leaves of healthy coconuts and in stomatal opening in epidermis of *Commelina communis*, but there were no differences between the effects of the leaf extracts of healthy or diseased palms. Both extracts had the capacity to induce stomatal closure in the bioassay.

In studies realized in exploratory form, we did not find differences in the content of leaf soluble phenols, potassium, or sugars (reducing and nonreducing) nor in the osmolality or conductivity of leaf extracts from healthy or diseased palms.

It is necessary to study others factors that could be involved in the abnormal stomatal closure in LY-diseased palms. For example, the concentrations of cytokinins, the existence of a toxin produced by the pathogen causing the disease, or the localization of other substances that can act like "antitranspirants" could be involved.



## Introducción

La palma de coco, *Cocos nucifera* L., es una de las principales fuentes de trabajo y consumo para las comunidades costeras, debido principalmente a su importancia económica y diversidad de usos que se le atribuyen a esta planta. Esta oleaginosa se desarrolla en forma óptima en suelos arenosos y salinos de estas regiones costeras tropicales, requiriendo un mínimo de cuidados para el mantenimiento de su producción (González, 1990).

Sin embargo, este cultivo también es susceptible a múltiples plagas (insectos, ratones, aves, etc.) y enfermedades (anillo rojo, marchites sorpresiva, etc.). Entre las enfermedades más devastadoras está el Amarillamiento Letal (AL) (Corbett, 1959).

La enfermedad se asocia con un fitoplasma (antes denominado "organismo tipo micoplasma") por observaciones directas en el microscopio electrónico y también la respuesta diferencial de las palmas enfermas de AL a la oxitetraciclina y no a la penicilina (Plasvisic-Banjac *et al.*, 1972; McCoy, 1982; McCoy *et al.*, 1983). Se ha propuesto que el vector encargado de la dispersión de la enfermedad (transportador del fitoplasma) es el insecto *Myndus crudus* Van Duzee, denominado comúnmente "chicharrita". Este insecto pertenece al orden Homóptera, del cual provienen la mayoría de los insectos involucrados con enfermedades asociadas a fitoplasmas (Agríos, 1978).

Los síntomas visuales más característicos que presentan las palmas enfermas de AL son la caída de frutos (no importando el grado de desarrollo), la necrosis de las inflorescencias, el amarillamiento de las hojas y la pérdida de la fronda, quedando el tronco desnudo ("poste de teléfono"). La palma muere entre 3 y 6 meses después de adquirir el patógeno (McCoy, 1973).

El desarrollo de la sintomatología involucra una serie de alteraciones fisiológicas y bioquímicas en las palmas afectadas por AL (León *et al.*, 1996). El estudio de esos cambios puede contribuir al entendimiento del modo de acción de la enfermedad, y así eventualmente desarrollar métodos de control. Estudios previos reportan que las palmas afectadas por el AL muestran reducida apertura estomática (Eskafi *et al.*, 1986; León *et al.*, 1996), la cuál se presenta durante el desarrollo de los primeros síntomas visuales. En palmas sanas la conductancia estomática fluctúa diariamente, es decir, se incrementa durante el día y disminuye en la noche; pero en las palmas enfermas de AL, la conductancia disminuye de tal forma que esta fluctuación se pierde, los estomas cada vez abren menos en el día conforme avanza la enfermedad, quedando cerrados en forma generalizada e irreversible (León *et al.*, 1996).

En estudios que no involucran al AL en cocotero, Matteoni y Sinclair (1983) demostraron que la reducción en el cierre de estomas es un síntoma característico de enfermedades tipo AL producidas por fitoplasmas en diversas especies de plantas. Cuando el cierre de estomas fue total, la enfermedad era letal; sin embargo, cuando el cierre de estomas fue parcial, la enfermedad no resultó letal. Esto sugiere la posible relación entre la disminución de la apertura estomática con el modo de acción de los fitoplasmas, así como que el cierre temprano de los estomas puede ser determinante para el posterior desarrollo de la enfermedad.

El decremento en la apertura de los estomas de las palmas enfermas de AL puede jugar un papel importante en el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad, afectando otras funciones como transporte de agua y nutrientes (al verse disminuida la transpiración) y la fotosíntesis (al cerrarse los estomas se inhibe el intercambio gaseoso) (Oropeza *et al.*, 1995).

A pesar de que la mayoría de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas se llevan a cabo en las hojas, es muy raro encontrar fitoplasmas en hojas maduras. Las alteraciones en las palmas afectadas con AL pueden ser provocadas indirectamente, como con un desequilibrio hormonal, la síntesis de metabolitos que actúen como fitoreguladores o la liberación de sustancias que aceleren o retarden la producción de fitoreguladores (Agrios, 1978; Matteoni y Sinclair, 1983; Dickson y Isebrands, 1991; Kuske y Kirkpatrick, 1992). Individualmente o en forma conjunta, estos factores pueden inducir un comportamiento anormal en las hojas de palma enferma de AL, en comparación con las hojas de palmas sanas.

Aunque aparentemente no hay evidencias de alguna relación entre estrés biótico y el ácido abscísico (ABA), este es el fitoregulador más fuertemente relacionado con el cierre de estomas permanente que presentan las palmas enfermas de AL, principalmente por los reportes existentes acerca del control de la apertura estomática en plantas sometidas a estrés abióticos (Zhang *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1990). Por lo anterior, se esperaría que ABA sea el responsable del cierre de estomas permanente en palmas enfermas de AL, que las concentraciones de este fitoregulador en palmas enfermas justifiquen este cierre de estomas permanente.

Adicionalmente, otros factores pueden estar interaccionando, individualmente o en forma conjunta, en este cierre de estomas permanente. Estos factores pueden ser los compuestos fenólicos (asociados con la respuesta inmediata de las plantas al ataque de microorganismos) (Nicholson y Hammerschmidt, 1992), potasio (principal promotor de la apertura estomática) (Zhang y Davies, 1986), azúcares (mantenimiento del turgor de la célula guarda) (Amodeo *et al.*, 1996) o algunos factores fisicoquímicos (osmolaridad y conductividad).

El objetivo de la presente tesis fue determinar si las concentraciones de ABA presentes en las hojas, savia de xilema y raíces (primarias y secundarias) son las responsables de promover y mantener el cierre de estomas en palmas enfermas de AL. Simultáneamente se determinarán diferencias en el contenido de compuestos fenólicos, potasio, azúcares, osmolaridad, conductividad en extractos acuosos de hojas de palmas sanas y enfermas, con el fin de tratar de explicar las alteraciones del comportamiento estomático.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 1978.** Plant Pathology. Academic Press. Second Edition. New York.
- Amodeo, G.; L. Talbott; E. Zeiger. 1996.** Use of potassium and sucrose by onion guard cells during a daily cycle of osmoregulation. *Plant Cell Physiol.* 37: 575-579.
- Corbett, M.K. 1959.** Diseases of the Coconut Palm. *Principes.* 3: 9-12.
- Dickson, R.E.; J.G. Isebrands. 1991.** Leaves as regulators of stress response. In: Mooney, H.A.; W.E. Winner; E.J. Pell (Eds.) *Response of plants to multiple stress.* Academic Press. pp 22-25.
- Eskafi, F.M.; H.G. Basham; R.E. McCoy. 1986.** Decreased water transport in lethal yellowing-diseased coconut palms. *Trop Agric.* 63: 225-228.
- Gonzalez, M.A. 1990.** El cultivo del cocotero y la industria coprera en México. En: Robert, M.L. y Zizumbo, D. (Eds.) *La problemática del Amarillamiento Letal en México.* Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp 21-37.
- Kuske, C.R.; B.C. Kirkpatrick. 1992.** Distribution and multiplication of Western Aster Yellows mycoplasma-like organisms in *Catharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. *Phytopathol.* 82: 457-462.
- León, R.; J. Santamaría; L. Alpizar; J.A. Escamilla y C. Oropeza. 1996.** Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytol.* 134: 227-234.
- Matteoni, J.A. and W.A. Sinclair. 1983.** Stomatal closure in plants infected with mycoplasma-like organism. *Phytopathol.* 73: 398-402.
- McCoy, R.E. 1982.** Use of tetracycline antibiotics to control Yellows Diseases. *Plant Disease.* 66(7): 539-42.
- McCoy, R.E.; F.W. Howard; J.H. Tsai; H.M. Donselman; D.L. Thomas; H.G. Basham; R.A. Atilano; F.M. Eskafi; L. Britt; M.E. Collins. 1983.** Lethal yellowing of palms. Gainesville, Agricultural Experimental Station. 100 pp. Bulletin 834.
- McCoy, R.E. 1973.** Effect of various antibiotics on development of lethal yellowing in coconut palm. *Proc Florida State Hortic Soc.* 83: 503-506.
- Nicholson, R.; R. Hammerschmidt. 1992.** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol.* 30: 369-389.
- Oropeza, C.; J. Santamaría; G.R. Ashburner. 1995.** A model for the pathogenicity of lethal yellowing in coconut palms (*Cocos nucifera* L.). In: *Cocos nucifera* L.). In: Eden-Green S. and F. Ofori (eds.) (1997). *Proceedings of an international workshop on lethal yellowing-like diseases.* Elmina Ghana, November 1995. Chatam, UK; Natural Resources Institute. pp 109-118
- Plasvisic-Banjac, B., P. Hunt y K. Maramorosch. 1972.** Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathol.* 62: 298-299.
- Zhang, J. ; D.J. Gowing; W.J. Davies. 1990.** ABA as a root signal in root to shoot communication of soil drying. In: Davies W.J. and B. Jeffcoat (Eds.) *Importance of root to shoot communication in the responses to environmental stress.*

- Zhang, J.; W. Davies. 1986.** Chemical and hydraulic influences on the stomata of flooded plants. *J Exp Bot.* 37: 1479-1491.
- Zhang, J.; U. Schurr; W.J. Davies. 1987.** Control of stomatal behaviour by Abscisic Acid which apparently originates in roots. *J Exp Bot.* 38: 1174-1181.

## Contenido de cuadros y figuras

### LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.1. Etapas sintomatológicas del Amarillamiento letal (AL).
- Cuadro 1.2. Secuencia de eventos durante la adquisición y transmisión de fitoplasmas.
- Cuadro 1.3. Otras enfermedades tipo amarillamiento causadas por fitoplasmas.
- Cuadro 1.4. Comparación de porcentaje de estomas abiertos de palmas sanas y enfermas de Amarillamiento letal (AL).
- Cuadro 1.5. Conductancia estomática de palmas sanas y enfermas de cada grado de Amarillamiento letal (AL).
- Cuadro 1.6. Potencial osmótico, potencial hídrico y turgor de hojas de palmas sanas y enfermas de Amarillamiento letal (AL).
- Cuadro 1.7. Tasa de fotosíntesis, contenido de proteínas y porcentaje de contenido de clorofilas y carotenoides de palmas sanas y enfermas de AL.
- Cuadro 1.8. Modelo de patogenicidad del AL.
- Cuadro 1.9. Concentración de ABA presente en hojas de palmas sanas y enfermas de AL.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 Esquema representativo del dispositivo para la realización de los ensayos de transpiración.
- Figura 2.2. Concentración de ABA presente en: a) hojas, b) savia de xilema, c) raíces primarias, y d) raíces secundarias de palmas cocoteras en diferentes grados de desarrollo del AL.
- Figura 2.3. Cinética transpiracional de pinnas de palmas cocoteras sanas expuestas a: a) extractos totales de hojas de palma cocoteras en diferentes grados de enfermedad, y b) diferentes concentraciones de ABA o MES.
- Figura 2.4. Apertura estomática después de 3 h de incubación de epidermis de *Commelina communis* expuestas a: a) extractos totales de hojas de palma cocoteras en diferentes grados de enfermedad, y b) diferentes concentraciones de ABA o MES.
- Figura 2.5 Capacidad transpiracional relativa de pinnas de palmas cocoteras expuestas a: a) extractos totales de hojas de palma cocoteras en diferentes grados de enfermedad y diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) o Mes, a las 3 h de haber iniciado el ensayo. Apertura estomática relativa de epidermis de *Commelina communis* expuestas a: c) extractos totales de hojas de palma cocoteras en diferentes grados de enfermedad, y d) diferentes concentraciones de ABA o MES, a las 3 h de haber iniciado el ensayo.
- Figura 3.1 Determinación de: a) fenoles solubles, b) potasio, y c) azúcares en extractos de hoja de palmas cocotera en diferentes grados de desarrollo del AL.
- Figura 3.2 Determinación de: a) osmolalidad, y b) conductividad en extractos de hoja de palmas cocotera en diferentes grados de desarrollo del AL.
- Figura 4.1 Comparación entre las concentraciones de ABA endógeno presentes en diversas partes de la palmas de coco: a) hoja y raíces (primarias y secundarias) y b) savia de xilema, y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas como enfermas de AL.
- Figura 4.2 Comparación entre las concentraciones de fenoles solubles presentes en extracto soluble de hoja y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas como enfermas de AL.
- Figura 4.3. Comparación entre la concentración de potasio presentes en extracto soluble de hoja y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas como enfermas de AL.
- Figura 4.4 Comparación entre la concentración de azúcares solubles presentes en extracto soluble de hoja y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas como enfermas de AL.



# Capítulo 1

## ANTECEDENTES

### La Palma Cocotera

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es un árbol frutal que se cultiva y prospera en regiones tropicales y subtropicales de México, desde Sinaloa hasta Chiapas en el Pacífico, así como desde Veracruz hasta Yucatán en el Golfo. Debido a la gran cantidad de usos que se le da a esta especie, se le conoce mundialmente como "el árbol del cielo" o "el árbol de los 100 usos" (González, 1990).

El cocotero pertenece al grupo de las monocotiledóneas y a la familia Palmae, constituyendo una de las plantas oleaginosas más importantes de los climas tropicales. Su descripción taxonómica es la siguiente (Moore, 1987):

Reino: Vegetal
División: Traqueofita
Subdivisión: Pteropsidae
Clase: Angiospermeae
Sub-clase: Monocotiledoneae
Orden: Principes
Familia: Palmae
Sub-familia: Arecoideae
Tribu: Cocoeae
Sub-tribu: Bitiinae
Género: Cocos
Especie: nucifera

Los árboles de coco son en promedio altos, no presentan ramificaciones, su tronco es liso, gris, vertical y recto o ligeramente curvo, el cual aparece a la edad aproximada de 3 años; el tronco finaliza en la yema terminal (primordio foliar) lo que dará origen a la corona o penacho de hojas. Las hojas se pueden presentar pinnadas o bi-pinnadas, con un ordenamiento tipo heliofolio (esto es con el fin de que cada hoja

pueda exponerse a un máximo de radiación solar). Cada hoja consta de pecíolo, raquis y foliolo; un individuo adulto puede presentar entre 25 y 40 hojas, cada una de una longitud aproximada de entre 2 a 4 m (Jones y Luchsinger, 1979; Salunke y Desar, 1986).

Presenta inflorescencias monoicas (contiene en la misma estructura tanto a las flores masculinas como a las femeninas), las cuales se originan del primordio floral en las axilas de cada hoja.

El fruto se presenta como drupa, se encuentra en racimos y ubicados en el eje de la hoja o al final del tronco. Constan de una semilla con pericarpio liso y céreo, mesocarpio fibroso y endocarpio pétreo.

La raíces son fibrosas y adventicias, son continuamente producidas en la parte basal del tronco, la cual es usualmente bulbosa. Las raíces alcanzan su máximo diámetro casi inmediatamente después de emerger, generalmente funcionan por un corto período de tiempo y mueren, para ser sustituidas por raíces nuevas, sin embargo existen algunas que pueden durar varios años (Jones y Luchsinger, 1979; Salunke y Desar, 1986).

La palma de cocotero nunca presenta ramas, no posee cilindro de cambium, solo presentan zonas meristemáticas en las axilas de las hojas, ápice del tallo, ápice de cada raíz y en la base del tronco (Jones y Luchsinger, 1979; Salunke y Desar, 1986; León, 1990).

Bajo condiciones adecuadas de crecimiento, la palma de cocotero (variedades altas) empieza a florear a partir del sexto año de su plantación. Las variedades enanas e híbridas florecen más temprano. En promedio, las variedades altas producen 12 inflorescencias al año; donde es predominante la polinización cruzada, pero en enanas e híbridos es frecuente la autopolinización. La maduración del fruto lleva de 12 a 13 meses (Opeke, 1982).

El cocotero, para un óptimo desarrollo, requiere de un total de 1500 mm de agua anualmente repartidos en volúmenes superiores a los 130 mm mensuales; siempre y cuando no pase más de 3 meses en sequía ni más de 5 días permanentes de inundación. Se considera una temperatura óptima alrededor de 27°C, sin que se presenten frecuentemente temperaturas abajo de 21°C ni superiores a los 36°C. En cuanto a luz, requiere un mínimo de 2000 h sol/año distribuidas al menos en 120 h mensuales. Requiere una humedad relativa del 70 al 90 %, y que no sea menor del 60 %. Se adapta a un amplio rango de suelos, siempre y cuando su profundidad sea mayor de 1 m, estar libre de lecho rocoso o arcilloso, con buena capacidad de aereación y drenaje suficiente. El pH óptimo es de 7, sin embargo soporta pH de entre 5.5 hasta 7.5. Resiste salinidad de 6 mOhms/cm (González, 1990).

Debido a que puede desarrollarse en los suelos arenosos y salinos de las zonas costeras tropicales, es una de las plantas más útiles y con mayor importancia económica de esas regiones. Aproximadamente el 30 % del producto es transformado en copra, de donde se toma el 60% para la obtención de aceite (Grimwood, 1975).

También se le da uso como obtención de medicinas, fibras, etc. Debido a la diversidad de productos que se pueden obtener de esta planta, son muy amplias las fuentes de trabajo que sostienen su producción, como son los pequeños propietarios, ejidatarios, comuneros, transportista, jornaleros, obreros, etc.

### El Amarillamiento Letal

Como muchas de las especies vegetales cultivadas por el hombre, la palma de cocotero también es susceptible a plagas y enfermedades. Debido a que las enfermedades del cocotero son muy variadas, se clasifican como mayores o menores, de acuerdo en la importancia relativa de las mismas. Las consideradas de mayor importancia afectan drásticamente la producción y/o matan a las palmas. Las de menor importancia afectan solo áreas locales en las mismas. Dentro de las enfermedades mayores más devastadoras en América se encuentra el Amarillamiento Letal (AL) (Corbett, 1959).

Aunque el nombre de Amarillamiento Letal fue usado por primera vez en 1955, por Nutman y Roberts, los síntomas que corresponden al AL del cocotero fueron primeramente determinados en Jamaica en 1891 (Martyn y Midcap, 1975), aunque el reporte más antiguo de la enfermedad, por descripción de la sintomatología, data de 1834 en las Islas Caimán, posteriormente se registro en el resto de las islas caribeñas (Parthasarathy, 1973). Los primeros reportes de la enfermedad en EEUU (Florida) se remontan al año 1955 (Seymour *et al.*, 1972) y en México en 1977 (Borja, 1983).

La sintomatología del AL se ha clasificado en tres categorías: primaria, amarillamiento y etapa final; dichas categorías se subdividen a su vez en diferentes rangos que van desde el grado 0, cuando la palma se presenta asintomática, hasta el grado 9, cuando la palma pierde completamente su fronda (Cuadro 1.1)(McCoy, 1973).

Cuadro 1.1. Etapas sintomáticas del AL (Tomado de McCoy, 1973).

CATEGORIA	GRADO	SINTOMAS
Primaria (Temprana)	0	Sanas o incubando .
	1	Caída de frutos.
	2	Una inflorescencia necrótica.
	3	2 o más inflorescencias necróticas.
Amarillamiento (Intermedia)	4	Amarillamiento de hojas inferiores.
	5	Amarillamiento de hojas inferiores y medias.
	6	Todas las hojas amarillas, hoja espada sana.
Etapa Final (Tardía)	7	Hoja espada muerta, hojas verdes.
	8	Hoja espada muerta, hojas amarillas.
	9	Palma sin fronda ("poste de teléfono").

El primer síntoma visual del AL es la caída prematura de la mayoría o todos los frutos, no importando su estado de madurez. Estos frutos pueden presentar un área café oscura en la parte baja del cáliz. La caída de botones o pequeñas nueces, de

entre 3 y 4 cm de diámetro, es un evento normal y no debe ser considerado como un síntoma de AL.

El siguiente síntoma es el necrosamiento de inflorescencias nuevas. Esto puede ser observado si se rompe la espádice (estructura donde se encuentra encerrada). Este es un rasgo fácilmente distinguible debido a que las inflorescencias de las palmas sanas son de color crema o amarillo. La mayoría de las flores masculinas suelen estar muertas en las inflorescencias necróticas.

Posteriormente las hojas se vuelven amarillas, usualmente comenzando con las hojas más viejas o bajas, avanzando a regiones superiores de la fronda. Las hojas amarillas están notablemente turgentes, no están flácidas como en el caso de desecación. Con el tiempo se tornan color café, flácidas y caen.

La muerte del meristemo apical ocurre al final del desarrollo de los síntomas del AL, provocando que la hoja espada nueva se colapse. Finalmente la fronda cae del tronco de la palma, lo que se denomina "poste de teléfono" (McCoy, 1973).

La muerte de la palma ocurre entre los 4 y 6 meses después de aparecer los primeros síntomas (Grylls y Hunt, 1971).

#### **a) Fitoplasmas como causantes del AL**

La evidencia al microscopio electrónico y la respuesta diferencial de las palmas enfermas de AL a la oxitetraciclina permitió asegurar que un organismo clasificado como fitoplasma (antes denominado "organismo tipo micoplasma", OTM) es el agente etiológico del AL en coco (Plasvisic-Banjac *et al.*, 1972; McCoy, 1982; McCoy *et al.*, 1983).

Los fitoplasmas integran al tercer grupo de procariontes (organismos sin membrana nuclear), se localizan dentro de la clase Mollicutes, orden Mycoplasmatales y familia Mycoplasmataceae. (Nemeth, 1986).

La estructura de los fitoplasmas se resume en los siguientes puntos: 1) son cuerpos pleiomórficos de entre 0.1 y 1.0 mm de diámetro, 2) se encuentran cubiertos por una membrana unitaria de 3 capas de 10 nm de espesor, 3) contienen ribosomas de tipo bacterial, y 4) son sensibles a tetraciclinas e insensibles a penicilina. Estos organismos poseen solo el mínimo de organelos celulares para su crecimiento y replicación. Poseen una membrana externa que lo separa del medio ambiente, ribosomas para la formación de proteínas celulares y una o dos cadenas de ADN conteniendo toda la información necesaria para la síntesis de proteínas. En contraste con otros procariontes, no poseen pared celular. Se sugiere que su reproducción ocurre por fisión binaria (Nemeth, 1986).

Como lo indica la microscopía electrónica, la mayoría de los fitoplasmas se alojan en los tubos cribosos del floema en las plantas que parásita (zona donde se alimentan), aunque en algunas ocasiones también se les ubica en el parénquima del floema. En ocasiones también se les encuentra en tejido de xilema y células del

mesófilo o en las raíces. Su distribución no siempre influenciado por los factores ambientales (Nemeth, 1986)

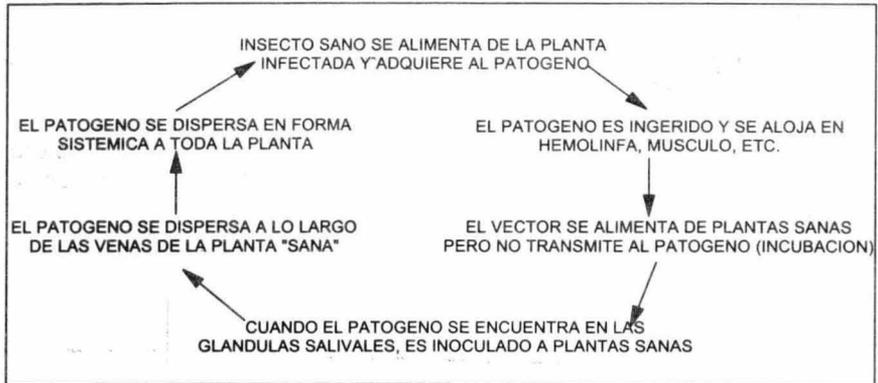
#### **b) *Myndus crudus* como vector del AL**

Los fitoplasmas patogénicos son transmitidos principalmente por insectos vectores. Acerca del posible vector involucrado como dispersor de la enfermedad, la evidencia se inclina por el insecto *Myndus crudus* Van Duzee, denominado comúnmente "chicharrita". Este insecto pertenece al orden Homóptera, del cual provienen la mayoría de los vectores involucrados con enfermedades asociadas a fitoplasmas. La descripción taxonómica del vector es la siguiente (Agrios, 1978):

<p><b>Clase: <i>Insecta</i>.</b></p> <p><b>Sub-clase: <i>Pterigota</i>.</b></p> <p><b>División: <i>Exopterigota</i></b></p> <p><b>Orden: <i>Homóptera</i>.</b></p> <p><b>Sub-orden: <i>Auchenirrinca</i></b></p> <p><b>Superfamilia: <i>Fulgoroidea</i>.</b></p> <p><b>Familia: <i>Cixiidae</i>.</b></p> <p><b>Género: <i>Myndus</i>.</b></p> <p><b>Especie: <i>crudus</i></b></p>
--

El mecanismo de transmisión de los fitoplasmas se supone es de la siguiente manera (Cuadro 1.2):

**Cuadro 1.2. Secuencia de eventos durante la adquisición y transmisión de fitoplasmas**  
(Modificado de Agrios, 1978).



En la mayoría de los Hemipteros y otros ordenes Exopterigotos, los estadios inmaduros de su desarrollo los pasan en la misma planta hospedera donde llegan a su madurez. Sin embargo, la familia Cixiidae, a la cual pertenece *M. crudus*, posee una forma de desarrollo inusual, ya que en estado inmaduro se desarrolla en plantas herbáceas y los individuos adultos se alojan en árboles, principalmente en palmas (Howard y Mead, 1980).

En un área del sur de Florida, se encontró *M. crudus* en las raíces del césped San Agustín (*Stenotaphrum secundatum* [Walt.] Kuntze) (Howard *et al.*, 1984). El césped San Agustín ha sido reconocido como habitat preferido de *M. crudus*, así como también que es el césped más común del sureste de Florida, siendo el principal sospechoso de la dispersión de la enfermedad en esta área (Howard, 1980). También se ha observado que el césped Guinea (*Panicum maximum*) es un buen hábitat para *M. crudus* y este es probablemente el césped más común en las plantaciones de Jamaica.

Observaciones en Florida sugieren que el AL puede dispersarse muy lento en zonas de escasa vegetación y relativamente rápido donde hay exceso de la misma; por lo tanto la velocidad de dispersión de la enfermedad puede disminuir si se eliminan las especies herbáceas existentes en la plantación, eliminando con ellas un medio favorable de desarrollo para el insecto (Howard, 1995).

También se ha obtenido evidencia de que *M. crudus* se puede alimentar del floema del cocotero (posible vía de entrada del fitoplasma) (Howard *et al.*, 1981; Howard *et al.*, 1982; Tsai y Mead, 1982). Además, en Florida, la distribución geográfica del AL coincidió con la dispersión de este insecto, observándose que el control químico de éste redujo la velocidad aparente de dispersión de la enfermedad (Howard, 1983).

La distribución de la enfermedad muestra algunas veces la modalidad de dispersión por saltos. Es decir, la propagación puede producirse en brincos desde pocos kilómetros hasta 100 km o más, con lo que se establecen nuevos focos de infección de la misma, lo que nos indica que el viento puede también estar involucrado en la dispersión de la enfermedad (Ohler, 1986).

### **c) Aspectos fisiológicos y bioquímicos del AL**

Anteriormente solo era posible detectar palmas enfermas de AL en forma tardía, es decir, mediante el desarrollo de la sintomatología, lo cual dejaba un margen muy pequeño para trabajar en los aspectos fisiológicos y bioquímicos en las primeras etapas de la enfermedad. Sin embargo, ahora ya es posible detectar la enfermedad en forma temprana, incluso antes de la aparición de los síntomas visuales (durante el periodo de incubación del fitoplasma en la palma, el cual dura entre 3 y 6 meses), mediante el uso de técnicas de biología molecular, como son la aplicación de sondas moleculares y el empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), específicos para el fitoplasma causante del AL (Escamilla *et al.*, 1995).

#### **1) Conductancia Estomática**

Un síntoma bien caracterizado en enfermedades causadas por fitoplasmas en diferentes especies es la reducción en la conductancia estomática (Matteoni y Sinclair, 1983) (Cuadro 1.3), el cual se puede presentar al mismo tiempo o antes de los posteriores síntomas visuales.

En estos casos, es de gran importancia hacer notar que cuando el cierre de estomas se presentó en forma total, la enfermedad resultó letal para la planta, es decir, no logró sobrevivir. Sin embargo, si el cierre de estomas solo fue parcial, la planta podía superar a la enfermedad y continuar con vida.

Estas condiciones de letalidad o no letalidad con cierre de estomas total o parcial, respectivamente, se presentaron no importando si la planta era monocotiledónea o dicotiledónea (cabe destacar que solo se experimento con una planta del grupo de las monocotiledóneas, maíz, no logrando una representación ideal), es decir, no se perturba el fenómeno si la planta presenta una o más zonas meristemáticas en la parte aérea, que pudieran desarrollarse, en caso de verse perturbada la zona meristemática apical.

Cuadro 1.3. Otras enfermedades tipo amarillamiento causadas por fitoplasmas (Modificado de Matteoni y Sinclair, 1983).

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	COTILEDONES	CIERRE ESTOMAS	AMARILLAMIENTO
<i>Catharanthus roseus</i>	Vicaria	Dos	Parcial	No letal
<i>Fraxinus americana</i>	Fresno	Dos	Parcial	No letal
<i>Ulmus americana</i>	Olmo	Dos	Total	Letal
<i>Ulmus rubra</i>	Olmo	Dos	Total	Letal
<i>Prunus virginiana</i>	Almendro	Dos	Total	Letal
<i>Zea mays</i>	Maíz	Uno	Total	Letal

El cierre anormal de estomas (baja conductancia) también ocurre en palmas afectadas por AL, llegando a ser total y permanente (Eskafi *et al.*, 1986; León *et al.*, 1996)

Cuadro 1.4. Comparación de porcentaje (%) de estomas abiertos de palmas sanas y palmas enfermas de AL (Modificado de Eskafi *et al.*, 1986).

ESTADIO DE LA PALMA	% DE APERTURA
Palma Sana	82 +/- 13
Etapa Temprana	56 +/- 06
Etapa Tardía	02 +/- 02

León *et al.* (1996) reportaron la conductancia estomática en palmas que presentaban diferentes grados de enfermedad, comparadas con palmas sanas; en palmas sanas (grado 0) se presentaron conductancias al mediodía de alrededor de  $0.45 \text{ cm s}^{-1}$ , conforme se desarrollaba la enfermedad, disminuyendo hasta encontrarse lecturas cercanas a  $0 \text{ cm s}^{-1}$  a partir del grado 4 de enfermedad. En palmas sanas, la conductancia estomática fluctuó diariamente, es decir, se incrementó durante el día y disminuyó durante la noche; sin embargo en las palmas enfermas, la conductancia estomática disminuyó de tal forma que esta fluctuación se perdió, los estomas cada vez abrieron menos en el día conforme se estudiaron palmas con grados crecientes de la enfermedad (Cuadro 1.5) (León *et al.*, 1996).

Cuadro 1.5. Conductancia estomática de palmas sanas y palmas enfermas en cada grado de AL (Modificado de León *et al.*, 1996).

GRADO DE LA ENFERMEDAD	CONDUCTANCIA ESTOMATICA (cm. s <sup>-1</sup> )
0	≈ 0.45
1	≈ 0.20
2	≈ 0.15
3	≈ 0.05
4	≈ 0.00
5	≈ 0.00
6	≈ 0.00

Esta disminución gradual en conductancia estomática se repitió en seguimientos efectuados en palmas sanas que mostraron todo el desarrollo de la enfermedad; decayendo rápidamente, ya que en 25 o 30 días se registraba solo el 10 % de su valor original (cuando aún no mostraba síntomas visuales) (León *et al.*, 1996).

Esta disminución la conductancia estomática se presenta una vez que empiezan a manifestarse los síntomas visuales, lo cual puede suponer que este cierre permanente de estomas puede ser uno de los factores que promuevan el posterior desarrollo de la sintomatología, al evitar o disminuir procesos como la transpiración y fotosíntesis (más específicamente en la nutrición mineral y la aportación de azúcares) (León *et al.*, 1996; Oropeza *et al.*, 1995).

## 2) Transporte

Se han encontrado fitoplasmas en los tubos cribosos del floema de las plantas enfermas de AL (Howard *et al.*, 1982; Howard *et al.*, 1984; Parthasarathy, 1974), con el consiguiente malfuncionamiento del mismo. Eden-Green y Waters (1982) encontraron que la tasa de exudación de floema disminuye en palmas enfermas de AL, encontrándose en las fases intermedias solo un 33% y en las tardías un 15% de las tasas de exudación, en comparación con la de palmas sanas. Esta disminución se cree pueda ser el resultado del incremento de la población de los fitoplasmas dentro de los tubos cribosos del floema, lo que resulta en su obstrucción. Esta obstrucción puede ser el efecto de necrosis de los conductos, deposición de callosa como resultado de lesiones en los mismos o el taponamiento que los mismos fitoplasmas puedan estar realizando físicamente.

En cuanto al xilema, no hay reportes de obstrucción física en las traqueidas más que en palmas severamente enfermas (Plasvisic-Banjac *et al.*, 1972). Pero Eskafi *et al.* (1986) reportaron una disminución en el transporte de xilema en palmas enfermas de AL en grados tempranos. Se encontró disminuido hasta un 75 % y 100 % cuando se probó en tronco y en peciolo, respectivamente. De acuerdo con los autores, esto pudiera ser efecto del cierre permanente de estomas que presentan las palmas enfermas. Sin embargo también se han reportado lesiones en raíces, lo que también

estaría afectando a este tipo de transporte (Eden-Green, 1976; Eden-Green y Waters, 1982; Islas-Flores *et al.*, 1998).

### 3) Relaciones Hídricas

Estudios de relaciones hídricas en hojas de palmas enfermas de AL no muestran cambios antes de la aparición de los síntomas de senescencia (en el grado 4 de la enfermedad) (León *et al.*, 1996). A partir del grado 5 el potencial osmótico, potencial hídrico y el turgor disminuyen (Cuadro 1.6).

Cuadro 1.6. Potencial osmótico, potencial hídrico y potencial de turgencia de hojas de palmas sanas y enfermas de AL. NR= no se registró (Modificado de León *et al.*, 1996).

ETAPA DE LA ENFERMEDAD.	P. OSMOTICO (MPa)	P. HIDRICO (MPa)	P.TURGENCIA (MPa)
Sana	≈ -1.50	≈ -1.00	≈ 0.50
Temprana	≈ -1.50	≈ -1.00	≈ 0.50
Intermedia	≈ -1.50 a -2.00	≈ -1.00 a -2.00	≈ 0.50 a 0.00
Tardía	NR	NR	NR

Con esto se descarta que el cierre de estomas observado anteriormente sea producto de algún tipo de déficit o alteración en el contenido de agua en las palmas enfermas.

### 4) Nutrientes

Se puede esperar la disminución en cuanto al contenido de algunos nutrientes en las palmas enfermas de AL si el transporte de xilema se encuentra disminuido, según los resultados obtenidos por Eskafi *et al.* (1986). En adición a este punto, Dabek y Hunt (1976) reportaron el efecto de la adición exógena de varios nutrientes (cobre, zinc y hierro) en segmentos de hojas (pinnas) de frondas de palmas afectadas por AL, mostrando el amarillamiento característico. En dichas aplicaciones se favorece el reverdecimiento y/o longevidad de las mismas, sugiriendo que las hojas de las palmas enfermas tienen deficiencias en algunos nutrientes minerales. Sin embargo, al analizar las concentraciones de estos nutrientes directamente en savia extraída del tronco, estas no mostraron diferencia alguna con las palmas sanas (Sánchez, 1991). Así entonces, hace falta evidencia más contundente en cuanto a una posible desnutrición mineral en las palmas afectadas.

Con respecto a los nutrientes orgánicos, Stemmer *et al.* (1982) no encontraron diferencia alguna en cuanto a la composición de aminoácidos entre palmas sanas y enfermas en exudado de floema en hojas. En contraste, Sánchez (1991) reportó que el contenido total de aminoácidos y arginina en hojas de palmas afectadas por AL fue de 3 a 5 veces más alto que en palmas asintomáticas; esto puede ser el resultado de la senescencia y degradación de proteínas que pueden estar sufriendo las palmas enfermas.

## 5) Senescencia

Los cambios comúnmente asociados con senescencia de la hoja son disminución en la capacidad fotosintética de la planta, contenido de pigmentos y contenido de proteínas. Estos parámetros se encuentran determinados por León *et al.* (1996) (Cuadro 1.7). La capacidad fotosintética y contenido de proteínas no tienen cambios significativos en los primeros estadios de la enfermedad, pero caen en los estadios posteriores, ocurriendo lo mismo con el contenido de carotenoides y clorofila (León *et al.*, 1996).

Cuadro 1.7. Tasa de fotosíntesis, contenido de proteínas y porcentaje del contenido de clorofilas y carotenoides de palmas sanas y enfermas de AL. NR= no se registró (Modificado de León *et al.*, 1996).

ETAPA DE LA ENFERMEDAD	FOTOSÍNTESIS ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	CLOROFILA (%)	CAROTENOIDEOS (%)	PROTEÍNAS ( $\text{mg g}^{-1}$ P.S.)
Sana	$\cong 10$	$\cong 100$	$\cong 100$	$\cong 3.5$
Temprana	$\cong 10$	$\cong 100$ a 75	$\cong 100$ a 75	$\cong 3.0$
Intermedia	$\cong 0$	$\cong 50$ a 0	$\cong 50$	$\cong 1.75$
Tardía	NR	NR	NR	NR

Se presentó una reducción en la tasa de fotosíntesis (tomada a mediodía), pero este sucede mucho después de que se presenta el cierre de estomas, lo cual nos dice que este fenómeno no limita la disponibilidad de bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Sin embargo la disminución en la tasa de fotosíntesis en las etapas intermedias de la enfermedad se puede pensar como la disminución en el contenido de los pigmentos necesarios para este proceso. Además la mayor parte de la proteína que se pierde parece ser Ribulosa Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (Rubisco), la cual representa 50 % o más de la proteína soluble presente en hoja de varias especies.

## 6) Reguladores de Crecimiento

A pesar de que la mayoría de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas se registran principalmente en las hojas maduras de las palmas enfermas, es muy raro encontrar fitoplasmas en estos tejidos; indicándonos que los síntomas podrían ser causados de manera indirecta y de diferentes maneras, tal como: 1) producción de algún desequilibrio en los niveles de algunos fitoreguladores; 2) síntesis de moléculas que actúen como fitoreguladores; o 3) liberación de sustancias que aceleren o retarden la producción de reguladores de crecimiento. Individualmente o en forma conjunta, estos factores provocarían en la planta un comportamiento anormal en la palma enferma en comparación con palmas sanas (Agrios, 1978; Matteoni y Sinclair, 1983; Dickson y Isebrands, 1991; Kuske y Kirkpatrick, 1992).

Matteoni y Sinclair (1983) sugieren la hipótesis de que un desequilibrio hormonal puede estar involucrado en el desarrollo de las patologías de las enfermedades causadas por fitoplasmas. Los síntomas del AL, como la caída de frutos, cierre estomático permanente y senescencia de la hojas, pueden ser explicados por dicho

"desequilibrio hormonal". La caída de frutos pudiera ser promovida por la acción de etileno (Henderson y Osborne, 1994). Estudios realizados por León *et al.* (1996) observaron que el tratar palmas asintomáticas con Ethrel (ácido 2-cloroetilfosfónico, compuesto que causa liberación de etileno), provocaron la caída de los mismos. También se ha probado que la enzima formadora de etileno (1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa) presenta gran actividad en los primeros grados de la enfermedad, incluso antes de la aparición de los mismos (palmas incubando) (León *et al.*, 1996).

Observaciones iniciales de Dabek y Hunt (1976) sugieren cambios en los niveles de reguladores de crecimiento en palmas afectadas por el AL. Encontraron que el tratamiento con ácido giberélico y zinetina causa el reverdecimiento de las pinnas de hojas amarillas. Por lo tanto se puede esperar que la causa del amarillamiento de las hojas en palmas enfermas de AL puede ser causado por bajos niveles en los fitoreguladores antes mencionados.

El cierre permanente de los estomas, en planta sometidas a estrés hídrico, se sabe que es debido a la acción que ejerce el ácido abscísico (ABA), provocando el cierre de los estomas para evitar mayor pérdida de agua (Zhang *et al.*, 1987). La senescencia de las hojas puede ser el resultado de la acción de etileno (Aharoni, 1989) o ABA (Davies y Zhang, 1991). En cuanto al cierre de estomas inducido por AL en cocotero, se determinaron las concentraciones de ABA presentes en hoja, determinando un incremento en su contenido, pero este se presentó en las etapas intermedias de la enfermedad, cuando el cierre de estomas ya se había efectuado (León *et al.*, 1996).

## **7) Cambios Bioquímicos en Raíces**

Hay evidencias que sugieren una correlación entre el amarillamiento foliar y la necrosis de las raíces de las palmas enfermas de AL (Eden-Green, 1976; Eden-Green y Waters, 1982). Eskafi *et al.* (1986) también encontraron necrosis extendidas en raíces de palmas enfermas. Islas-Flores *et al.* (1998) muestran anomalías bioquímicas en raíces (primarias y secundarias) de palmas enfermas de AL, como son la disminución de las tasas de respiración y bajas concentraciones de azúcares totales y reductores. Estos fenómenos iniciaron antes de la aparición de síntomas visuales. Así, como en las hojas, los fitoplasmas también han sido localizados en tejido de raíz, tanto en palmas con la enfermedad manifiesta como de palma que solo incuban al fitoplasma (Escamilla *et al.*, 1993).

## **Modelo de Patogenicidad del AL**

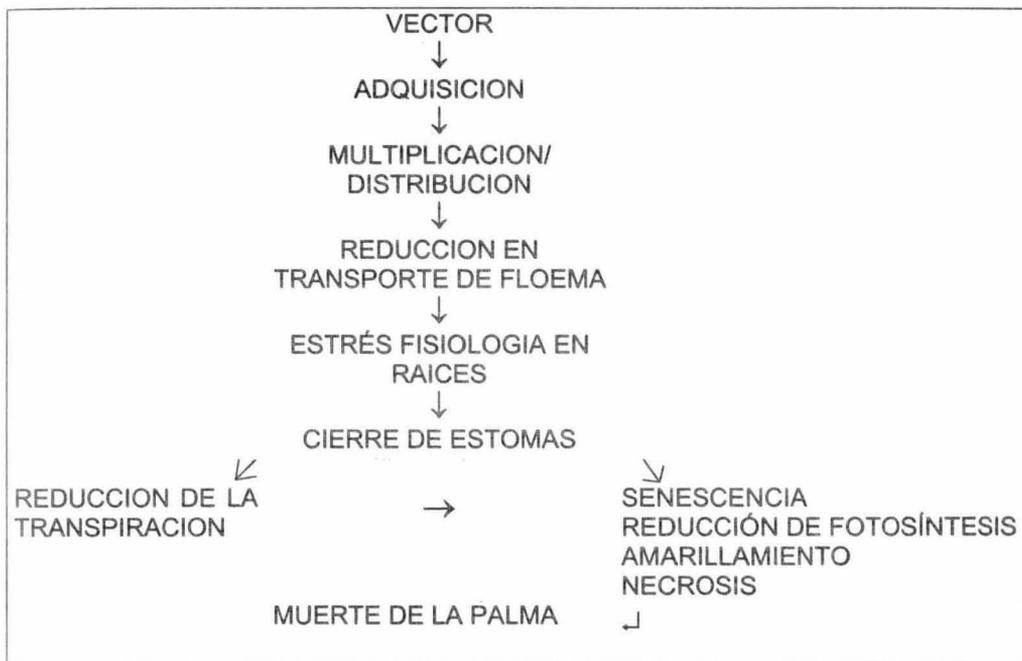
De acuerdo a las evidencias anteriores, las lesiones en la raíz y el cierre de estomas pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad, como lo demuestran los reportes existentes en cuanto a la relación que existe entre raíz y hoja (estoma) en diversas situaciones estresantes para la planta (Stuart, 1991; Jackson, 1997). Se sabe que el desarrollo de ambas depende de sus funciones complementarias, es decir, el carbón fijado en la hoja es indispensable para la raíz, así como nutrientes y "mensajes" (fitoreguladores) de la raíz regulan el funcionamiento de la hoja (Davies y Zhang, 1991). Se ha demostrado que ciertas

condiciones ambientales (como la inundación o sequía) pueden alterar, disminuyendo o aumentando, las concentraciones de algunos fitoreguladores originados en raíz (Jackson, 1990; Davies y Zhang, 1991).

Se ha propuesto que estos posibles cambios en los fitoreguladores pueden mediar los cambios presentes en las partes aéreas, principalmente en cuanto al cierre de estomas, todo esto en plantas sometidas a algún tipo de estrés abiótico (estrés hídrico) (Davies y Zhang, 1991). En las palmas enfermas de AL, como lo mencionamos anteriormente, es posible que las alteraciones presentes en la raíz (previas a la aparición de cualquier síntoma) causen un desequilibrio de fitoreguladores, en forma análoga a lo que ocurre en estrés hídrico, provocando un cierre de estomas anormal, desarrollando posteriormente la sintomatología del AL.

En base a lo anterior se propone el siguiente modelo para la patogenicidad del AL (Oropeza *et al.*, 1995) (Cuadro 1.8).

Cuadro 1.8. Modelo de patogenicidad del AL (Tomado de Oropeza *et al.*, 1995)



De acuerdo al modelo presentado anteriormente, para el cierre de estomas permanente se propone el desequilibrio de fitoreguladores, originándose este fenómeno desde la raíz (tal vez debido a las alteraciones bioquímicas mencionadas anteriormente) y reflejándose en las partes aéreas de la palma.

"desequilibrio hormonal". La caída de frutos pudiera ser promovida por la acción de etileno (Henderson y Osborne, 1994). Estudios realizados por León *et al.* (1996) observaron que el tratar palmas asintomáticas con Ethrel (ácido 2-cloroetilfosfónico, compuesto que causa liberación de etileno), provocaron la caída de los mismos. También se ha probado que la enzima formadora de etileno (1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa) presenta gran actividad en los primeros grados de la enfermedad, incluso antes de la aparición de los mismos (palmas incubando) (León *et al.*, 1996).

Observaciones iniciales de Dabek y Hunt (1976) sugieren cambios en los niveles de reguladores de crecimiento en palmas afectadas por el AL. Encontraron que el tratamiento con ácido giberélico y zinetina causa el reverdecimiento de las pinnas de hojas amarillas. Por lo tanto se puede esperar que la causa del amarillamiento de las hojas en palmas enfermas de AL puede ser causado por bajos niveles en los fitoreguladores antes mencionados.

El cierre permanente de los estomas, en planta sometidas a estrés hídrico, se sabe que es debido a la acción que ejerce el ácido abscísico (ABA), provocando el cierre de los estomas para evitar mayor pérdida de agua (Zhang *et al.*, 1987). La senescencia de las hojas puede ser el resultado de la acción de etileno (Aharoni, 1989) o ABA (Davies y Zhang, 1991). En cuanto al cierre de estomas inducido por AL en cocotero, se determinaron las concentraciones de ABA presentes en hoja, determinando un incremento en su contenido, pero este se presentó en las etapas intermedias de la enfermedad, cuando el cierre de estomas ya se había efectuado (León *et al.*, 1996).

## **7) Cambios Bioquímicos en Raíces**

Hay evidencias que sugieren una correlación entre el amarillamiento foliar y la necrosis de las raíces de las palmas enfermas de AL (Eden-Green, 1976; Eden-Green y Waters, 1982). Eskafi *et al.* (1986) también encontraron necrosis extendidas en raíces de palmas enfermas. Islas-Flores *et al.* (1998) muestran anomalías bioquímicas en raíces (primarias y secundarias) de palmas enfermas de AL, como son la disminución de las tasas de respiración y bajas concentraciones de azúcares totales y reductores. Estos fenómenos iniciaron antes de la aparición de síntomas visuales. Así, como en las hojas, los fitoplasmas también han sido localizados en tejido de raíz, tanto en palmas con la enfermedad manifiesta como de palma que solo incuban al fitoplasma (Escamilla *et al.*, 1993).

## **Modelo de Patogenicidad del AL**

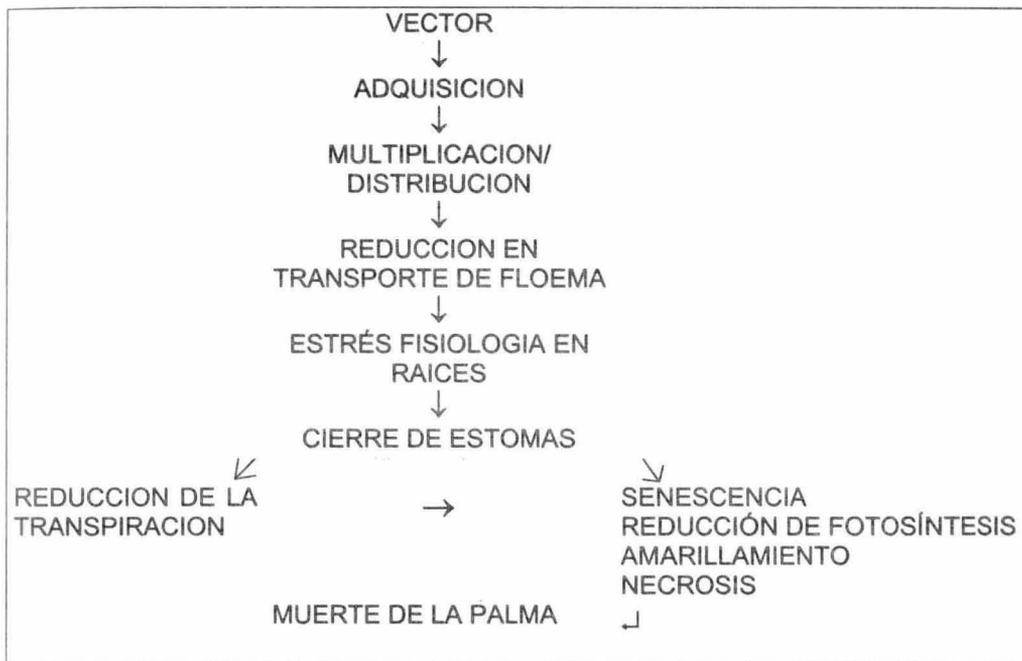
De acuerdo a las evidencias anteriores, las lesiones en la raíz y el cierre de estomas pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad, como lo demuestran los reportes existentes en cuanto a la relación que existe entre raíz y hoja (estoma) en diversas situaciones estresantes para la planta (Stuart, 1991; Jackson, 1997). Se sabe que el desarrollo de ambas depende de sus funciones complementarias, es decir, el carbón fijado en la hoja es indispensable para la raíz, así como nutrientes y "mensajes" (fitoreguladores) de la raíz regulan el funcionamiento de la hoja (Davies y Zhang, 1991). Se ha demostrado que ciertas

condiciones ambientales (como la inundación o sequía) pueden alterar, disminuyendo o aumentando, las concentraciones de algunos fitoreguladores originados en raíz (Jackson, 1990; Davies y Zhang, 1991).

Se ha propuesto que estos posibles cambios en los fitoreguladores pueden mediar los cambios presentes en las partes aéreas, principalmente en cuanto al cierre de estomas, todo esto en plantas sometidas a algún tipo de estrés abiótico (estrés hídrico) (Davies y Zhang, 1991). En las palmas enfermas de AL, como lo mencionamos anteriormente, es posible que las alteraciones presentes en la raíz (previas a la aparición de cualquier síntoma) causen un desequilibrio de fitoreguladores, en forma análoga a lo que ocurre en estrés hídrico, provocando un cierre de estomas anormal, desarrollando posteriormente la sintomatología del AL.

En base a lo anterior se propone el siguiente modelo para la patogenicidad del AL (Oropeza *et al.*, 1995) (Cuadro 1.8).

Cuadro 1.8. Modelo de patogenicidad del AL (Tomado de Oropeza *et al.*, 1995)



De acuerdo al modelo presentado anteriormente, para el cierre de estomas permanente se propone el desequilibrio de fitoreguladores, originándose este fenómeno desde la raíz (tal vez debido a las alteraciones bioquímicas mencionadas anteriormente) y reflejándose en las partes aéreas de la palma.

## Acido Abscísico (ABA) y AL

Entre los fitoreguladores más fuertemente relacionados con el cierre de estomas permanente que presentan las palmas enfermas de AL se encuentra ABA, principalmente por los reportes existentes acerca del control de la apertura estomática en plantas sometidas a estrés hídrico por parte de ABA (Davies y Zhang, 1991). Existen evidencias del aumento en la síntesis de este fitoregulador en raíces de palmas expuestas a estrés hídrico (Zhang *et al.*, 1987). Resultados obtenidos por Zhang *et al.* (1990) soportan el hecho que ABA es primordial en la comunicación raíz-hoja en los efectos del suelo expuesto a sequía, demostrando que la raíz puede censar efectivamente la sequía o cualquier tipo de estrés hídrico, producir cantidades sustanciales de ABA para provocar el cierre estomático y así evitar que se detecte o se resienta cualquier déficit hídrico en la hoja.

Por lo anterior, se realizó la determinación de las concentraciones de ABA contenido en hoja en palmas de coco sanas y con diferentes grados de enfermedad (León *et al.*, 1996) (Cuadro 1.9). Sin embargo, a pesar de que se reporta un incremento en las concentraciones de ABA, éste se presenta en los grados intermedios de la enfermedad, cuando se ha determinado que el cierre de estomas comienza a partir de los primeros grados de la misma. Por lo anterior, ABA no explicaba el cierre de estomas presente en palmas enfermas de AL (León *et al.*, 1996).

Cuadro 1.9. Concentración de ABA presente en hojas de palmas sanas y enfermas de AL. NR= no se registró (Modificado de León *et al.*, 1996).

ETAPA DE LA ENFERMEDAD.	ABA (mg g <sup>-1</sup> P.S.)
Sana	≈ 1.50
Temprana	≈ 1.00 a 2.00
Intermedia	≈ 2.00 a 3.50
Tardía	NR

No obstante, como se dijo anteriormente, se ha reportado que el incremento en la concentración de ABA presente en savia de xilema y en raíz de plantas sometidas a estrés hídrico puede ser detectado antes que la concentración de ABA presente en hoja comience a aumentar (Zhang y Davies, 1990). Esto nos sugiere que la concentración de ABA en savia de xilema o de raíz puede ser un indicador más preciso del efecto del suelo en sequía, que la concentración de ABA presente en hoja (Loveys, 1984; Davies y Zhang, 1991). En forma análoga, es necesario medir el contenido de ABA en savia de xilema y raíces en palmas enfermas antes de descartar que dicho cierre de estomas provocado por AL no esta asociado a ABA.

## Fenoles, Potasio, Azúcares y Factores Fisicoquímicos

Aparte de ABA, existen gran número de factores que pueden estar involucrados en el cierre de los estomas en palmas enfermas, aunque sea de manera indirecta. Uno

de estos factores puede ser la acción indirecta de compuestos fenólicos, ya que se ha determinado que en los tejidos de algunas plantas se pueden acumular o formar compuestos fenólicos en respuesta al ingreso de microorganismos a la planta, su aparición es considerada como parte de un sistema de defensa activo (Harborne, 1980). Se ha reconocido que la planta responde al ataque de los patógenos por una rápida y temprana acumulación de compuestos fenólicos en el sitio de infección y la limitación del desarrollo del patógeno sucede como una muerte celular rápida (respuesta hipersensitiva), es decir, la rápida acumulación de fenoles realiza un aislamiento efectivo del patógeno (o no patógeno) en el sitio de ingreso (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Sin embargo, a pesar de que estos compuestos son parte del sistema de defensa de las plantas, se ha determinado que algunos de estos compuestos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la apertura estomática en bioensayos de epidermis desprendida de *Commelina communis* (Plumbe y Willmer, 1986). Esto puede ser indicativo de que la entrada del fitoplasma, causante del AL, a la palma pueda inducir en ella la respuesta de producción de compuestos fenólicos como sistema de defensa, sin embargo, de manera indirecta la acumulación de estos productos pueden alterar la conducta de sus estomas, provocando de manera accidental su cierre.

Otro de los factores que pueden estar afectando a los estomas de las palmas enfermas puede ser una deficiencia en la concentración de potasio ( $K^+$ ). Se sabe que  $K^+$  es uno de los principales factores que promueven la apertura de los estomas (Zhang y Davies, 1986). Sin embargo, si las concentraciones de este mineral disminuyen, como resultado de la reducción en el transporte de xilema causado por las lesiones necróticas en raíces de palmas enfermas de AL (Eden-Green, 1976; Eden-Green y Waters, 1982; Eskafi et al., 1986) se puede llegar a limitar la apertura estomática debido a un deficiente suministro o absorción de este mineral en las palmas enfermas de AL.

Por otro lado, se han realizado estudios en las raíces de diversas especies de plantas sometidas a condiciones de baja disposición de oxígeno (como sucede en situaciones de inundación). Las raíces de dichas plantas presentan respiración anaeróbica, lo que produce bajas cantidades de ATP. Esto conduce a una despolarización de sus membranas, resultando en una disminución en la absorción, e incluso puede presentarse la expulsión, de este mineral. Dando por resultado una disminución en los niveles de  $K^+$ , con ello se limita la apertura estomática en plantas sometidas a dichas condiciones (Zhang y Davies, 1986). Como se estableció anteriormente, las raíces de palmas enfermas de AL presentan alteraciones bioquímicas, las cuales resultan en bajas tasas de respiración y concentración de azúcares (Islas-Flores et al., 1998), por lo tanto la toma de  $K$  por raíces de palmas enfermas se puede encontrar limitada, lo que nos llevaría a una deficiencia en sus niveles de  $K^+$ , y por lo siguiente, a una reducción en la apertura de los estomas en dichas palmas enfermas de AL.

La concentración de azúcares presentes en la hoja puede ser otro factor limitante en la apertura estomática. En estudios recientes, se ha encontrado que los azúcares (particularmente sacarosa) puedan tener alguna implicación en el control

estomático (Amodeo *et al.*, 1996). La apertura inicial de los estomas se relaciona con la acumulación de  $K^+$  en la células guarda, a pesar de que las cantidades de este mineral disminuyen en el transcurso del día, el estoma permanece abierto o aumenta su apertura; aquí se observa que los niveles de sacarosa aumentan (aprox. 60%) durante el período de declinación de contenido de  $K^+$ , sugiriendo que la sacarosa puede ser usada como osmolito cuyo fin es mantener la apertura estomática durante el resto del día. De acuerdo a lo anterior, se puede esperar que una deficiencia en las concentraciones de azúcares presentes en la hoja, sea un factor que pueda estar evitando la apertura normal de los estomas en las palmas enfermas de AL.

Algunos factores fisicoquímicos, tal como la osmolalidad, conductividad o el pH (Hartung *et al.*, 1988), pueden estar involucrados en un cierre de estomas en palmas de coco afectadas por AL. En cuanto a la osmolalidad, Bittisnich *et al.* (1987) demostró que los estomas de epidermis de *Vicia faba* podían cerrarse proporcionalmente con aplicación de presión osmótica externa generada por soluciones de sacarosa de concentración en aumento. También se determinó que en las plantas sometidas a estrés hídrico, aumenta el potencial osmótico de la hoja, pudiendo ser otro de los factores que contribuyen al cierre de los estomas en las plantas bajo esas condiciones (Premachandra *et al.*, 1992). En la palma enferma de AL, los factores que pudieran estar afectando la osmolalidad de los estomas serían los azúcares o iones (principales contribuyentes al potencial osmótico) o la acumulación de productos metabólicos de desecho no específicos sintetizados por el patógeno (por ejemplo, ácido láctico, alteraciones del pH, etc.) (Daniels, 1983).

Un desbalance en la cantidad de iones presentes en la hoja, es decir con alteraciones en su conductividad, puede llegar a afectar la apertura estomática en plantas sujetas a algún tipo de estrés (Gollan *et al.*, 1992). Se ha determinado que las deficiencias en el contenido de ciertos iones, principalmente nitrógeno (N) y fósforo (P), pueden alterar la sensibilidad de los estomas hacia ABA (Radin *et al.*, 1982; Radin, 1984) y los bajos niveles de  $K^+$  pueden inhibir la apertura de los estomas (Zhang y Davies, 1983). La deficiencia o aumento de algunos iones pueden estar afectando la conductancia de los estomas en palmas enfermas de AL.

Variaciones en el pH también pueden afectar el comportamiento de los estomas. Se ha determinado que las plantas sometidas a estrés hídrico presentan un aumento de pH en savia de xilema (5.8 a 7.1), lo cual podría representar un cambio en las características de la pared de las células guarda o flujo iónico, ya que a mayor déficit hídrico se presenta tanto un aumento de pH como disminución del cierre estomático (Gollan *et al.*, 1992). Además ya se ha determinado que un pH ácido tiene la capacidad de abrir estomas. Epidermis desprendida de *Vicia faba* se incubaron con amortiguadores distintos pH, dando por resultado que a mayor acidez del buffer, mayor apertura de los estomas (Bittisnich *et al.*, 1987). Lo que pudiera estar afectando la apertura estomática de las palmas enfermas de AL pudiera ser un simple cambio de pH de su entorno, debido posiblemente, como se dijo anteriormente, a la acumulación de algún producto metabólico no específico por el patógeno (por ejemplo, ácido láctico, alteraciones del pH, etc.) (Daniels, 1983).

## **Justificación**

Así, se espera que la causa del cierre estomático permanente presente en las palmas enfermas de AL se presente como una analogía a lo que sucede en las plantas sometidas a estrés hídrico; es decir, que la concentración de ABA en hojas no sea la causa aparente del fenómeno de cierre estomático, pero que las concentraciones de ABA presentes en raíz (sitio de síntesis bajo condiciones de estrés) y en savia (medio de transporte) expliquen el cierre de estomas de las palmas enfermas de AL.

De manera adicional, se buscará determinar, en forma preliminar, si algún otro factor pudiera estar influenciando ese cierre anormal de estomas en las palmas enfermas de AL, que pudiera estar relacionado con las alteraciones fisiológicas que conllevan a la enfermedad (p.e, alteraciones fisiológicas en las raíces). Se determinarán, preliminarmente, si hay diferencias entre los extractos de palmas sanas y enfermas en cuanto al contenido de fenoles, potasio, azúcares y algunos factores fisicoquímicos, como la conductividad y osmolalidad.

Diferencias en algunos de esos factores nos proporcionarían un camino a seguir en la elucidación del mecanismo que provoca el cierre de los estomas de las palmas enfermas de AL.

## **HIPÓTESIS**

El cierre de estomas presente en palmas de coco enfermas de Amarillamiento Letal se relaciona en forma más directa con el ABA presente en savia de xilema y en raíces, que con el ABA contenido en hoja.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si ABA presente en savia y raíces tiene alguna ingerencia en el cierre de estomas permanente en las palmas de coco enfermas de Amarillamiento Letal.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1) Cuantificar la concentración endógena de ABA presente en hojas, savia y raíces (primarias y secundarias) de palmas de coco sanas y enfermas de Amarillamiento Letal en todos los grados de la enfermedad.

2) Definir si los extractos de hoja de palmas enfermas, en diferentes grados, causan cierre de estomas a pinnas de palmas sanas.

3) Determinar de manera preliminar si hay diferencias entre los extractos de hoja de palmas de coco sanas y enfermas, en cuanto a su concentración de fenoles solubles, potasio, azúcares solubles, conductividad y osmolalidad.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 1978.** Plant Pathology. Academic Press. Second Edition. New York.
- Aharoni, N. 1989.** Interrelationship between ethylene and growth regulators in senescence of lettuce leaf discs. *J Plant Growth Regul.* 8: 307-309.
- Amodeo, G.; L. Talbott; E. Zeiger. 1996.** Use of potassium and sucrose by onion guard cells during a daily cycle of osmoregulation. *Plant Cell Physiol.* 37: 575-579.
- Bittisnich, D.; L. Entwisle; T. Neales. 1987.** Acid-induced opening in *Vicia faba* L. and the role of guard cell elasticity. *Plant Physiol.* 85: 554-557.
- Borja, L.M. 1983.** Importancia socioeconómica del Amarillamiento Letal y su control práctico cuarentenario. Memoria del X. Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Xalapa, Ver. 1983.
- Corbett, M.K. 1959.** Diseases of the Coconut Palm. *Principes.* 3: 9-12.
- Dabek, A.J.; P. Hunt. 1976.** Biochemistry of leaf senescence in coconut lethal yellowing, a disease associated with micoplasma-like organism. *Trop Agric.* 53: 115-123.
- Daniels, M. 1983.** Mechanisms of spiroplasma pathogenicity. *Ann Rev Phytopathol.* 21: 29-43.
- Davies, W.J.; J. Zhang. 1991.** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol.* 42: 55-76.
- Dickson, R.E.; J.G. Isebrands. 1991.** Leaves as regulators of stress response. In: Mooney, H.A.; W.E. Winner; E.J. Pell (Eds.) *Response of plants to multiple stress.* Academic Press. pp 22-25.
- Eden-Green, S.J. 1976.** Progress in research on lethal yellowing disease. 16th report on the Research Department, Coconut Industry Board, Jamaica.
- Eden-Green, S.J.; H. Watters. 1982.** Collection and properties of phloem sap from healthy and lethal yellowing-diseased coconut palms in Jamaica. *Phytopathology.* 72: 667- 672.
- Escamilla, J.A.; N.A. Harrison; L. Alpizar; C. Oropeza. 1993.** Detection of lethal yellowing mycoplasma-like organisms by DNA probes in palms of Yucatan, Mexico. In: Nair, M.K.; Khan, H.H.; P. Gopalasundaram; E.V.V. Bhaskara Rao (eds.). *Advances in coconut research and development.* New Delhi; Oxford and IBH Publishing Co.
- Escamilla, J.A; N.A. Harrison; H. Nuñez; L. Alpizar; I. Cordova; I. Islas-Flores; C. Oropeza. 1995.** Practical use de DNA probes for the detection of lethal yellowing of *Cocos nucifera* L. in Mexico. In: C. Oropeza, F.W. Howard and G.R. Ashburner (Eds.) *Lethal Yellowing Research and Practical Aspects.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 93-100.
- Eskafi, F.M.; H.G. Basham; R.E. McCoy. 1986.** Decreased water transport in lethal yellowing-diseased coconut palms. *Trop Agric.* 63: 225-228.
- Gollan, T; U. Schurr; E.D. Schulze. 1992.** Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. 1. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylem sap. *Plant, Cell and Environ.* 15: 551-559.

- González, M.A. 1990.** El cultivo del cocotero y la industria coprera en México. En: Robert, M.L. y Zizumbo, D. (Eds.) La problemática del Amarillamiento Letal en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp 21-37.
- Grimwood, B. 1975.** Coconut palms products. Their processing in developing countries. FAO. pp. 261.
- Grylls, N.E. and P. Hunt. 1971.** A review of the study of the aetiology of coconut lethal yellowing disease. *Oléagineux*. 26: 311-315.
- Harborne, J.B. 1980.** Plant phenolics. In: Bell E.A. and B.V. Chalwood (eds.) Secondary plant products. Encyclopedia of Plant Physiology, New series V. 8. Springer-Verlag, Berlin. pp 329-402.
- Hartung, W.; J. Radin; D. Hendrix. 1988.** Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. Role of the apoplastic pH. *Plant Physiol*. 86: 908-913.
- Henderson, J. and D.J. Osborne. 1994.** Inter-tissue signalling during the abscission phase in oil palm fruit. *J Exp Bot*. 45: 943-951.
- Howard, F.W. 1980.** Population densities of *Myndus crudus* Van Duzze (Hemiptera:Cixiidae) in relation to coconut lethal yellowing distribution in Florida. *Principes*. 24: 174-178.
- Howard, F.W. 1983.** World distribution and possible geographic origin of palm lethal yellowing disease and its vectors. *FAO. Plant. Prot. Bull.* 31(3): 101-113.
- Howard, F.W. 1995.** Lethal yellowing vector studies. II. Status of *Myndus crudus* host plant studies. In: Oropeza, C.; F.W. Howard and G.R. Ashburner (Eds.) Lethal yellowing: Research and Practical Aspects. Kluwer Academic Publishers. pp. 59-63.
- Howard, F.W. and Mead, F.M. 1980.** A survey of Auchenorrhyncha (Insecta: Hemiptera) associated with palms in southern Florida. *Trop Agric*. 57: 145- 153).
- Howard, F.W.; J.R. Tilman; D.G. Burch; D. Hall. 1984.** A field study to determine potential host plants of lethal yellowing agent. Report University of Florida.
- Howard, F.W.; R.C. Norris; D.L. Thomas. 1982.** Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Trop Agric*. 60: 168-171.
- Howard, F.W.; J.P. Kramer; M.F. Peralta. 1981.** Homópteros Auchenorrhyncha asociados a palmeras en un área de la República Dominicana afectada por el Amarillamiento Letal del cocotero. *Folia Entomológica Mexicana*. (47): 37-50.
- Islas-Flores, I.; J.M. Santamaría; I. Cordova; C. Oropeza. 1998.** Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera* L.) affected by lethal yellowing. *J Plant Physiol*. In press.
- Jackson, B.M. 1990.** Communication between the roots and shoots of flooded plants. In: Davies W.J. and B. Jeffcoat (Eds.) Importance of root to shoot communication in the responses to environmental stress. British Society for Plant Growth Regulation. pp 115-133.
- Jackson, M. 1997.** Hormones from roots as signal for the shoots of stressed plants. *Trends in Plant Science*. 2: 22-28.
- Jones, S.B.; A.E. Luchsinger. 1979.** Plant Systematics. Ed. McGraw-Hill, 1a. edition, EUA. pp 315-317.

- Kuske, C.R.; B.C. Kirkpatrick. 1992.** Distribution and multiplication of Western Aster Yellows mycoplasma-like organisms in *Catharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. *Phytopathol.* 82: 457- 462.
- León, R.; J. Santamaría; L. Alpizar; J.A. Escamilla y C. Oropeza. 1996.** Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytol.* 134: 227-234.
- León, I.R. 1990.** Aspectos fisiológicos y relaciones hídricas de *Cocos nucifera* L. afectadas por el Amarillamiento Letal. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
- Loveys, B.R. 1984.** Diurnal changes in water relations and Abscisic Acid in field-growth *Vitis vinifera* Cultivars. III. Influence of Xylem-Derived Abscisic Acid on Leaf Gas Exchange. *New Phytol.* 98:563-573.
- Martyn, R.D. y J.T. Midcap. 1975.** History, spread, and other palms host of Lethal Yellowing of coconut palms. Circular 405. Florida Coop. Ext. Ser. Inst. of Food and Agric. Sciences Univ. of Florida, Gainesville.
- Matteoni, J.A. and W.A. Sinclair. 1983.** Stomatal closure in plants infected with mycoplasma-like organism. *Phytopathol.* 73: 398-402.
- McCoy, R.E.; F.W. Howard; J.H. Tsai; H.M. Donselman; D.L. Thomas; H.G. Basham; R.A. Atilano; F.M. Eskafi; L. Britt; M.E. Collins. 1983.** Lethal yellowing of palms. Gainesville, Agricultural Experimental Station. 100 pp. Bulletin 834.
- McCoy, R.E. 1982.** Use of tetracycline antibiotics to control Yellows Diseases. *Plant Disease.* 66(7): 539-42.
- McCoy, R.E. 1973.** Effect of various antibiotics on development of lethal yellowing in coconut palm. *Proc Florida State Hortic Soc.* 83: 503-506.
- McDonough, J. and M.H. Zimmermann. 1979.** Effect of lethal yellowing on xylem pressure in coconut palms. *Principes.* 23: 132-137.
- Moore, H. 1987.** *Genera Palmarum. A classification of palms.* The H.L. Barley Hatorium and the International Palm Society. Allen Press. Lawrence, Kansas.
- Nemeth, M. 1986.** *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees.* Kluwer Academic Publishers Group. First Edition. Hungry.
- Nicholson, R.; R. Hammerschmidt. 1992.** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol.* 30: 369-389.
- Nutman, F.J. and F.M. Roberts. 1955.** Lethal yellowing: the "unknown disease" of coconut palms in Jamaica. *Emp J Exp Agric.* 23: 257-267.
- Ohler, J.G. 1986.** El cocotero árbol de la vida. Estudio FAO. Producción y Protección vegetal. Documento 57. Edición en Español. FAO Roma p. 230-235.
- Opeke, L.K. 1982.** *Tropical trees crops.* Ed. John Wiley and sons. First Edition. EEUU.
- Oropeza, C.; L. Alpizar; I. Islas-Flores; A. Escamilla; J. Santamaría. 1995.** Physiology and biochemistry of lethal yellowing-affected in *Cocos nucifera* L. palms. In: C. Oropeza, F.W. Howard and G.R. Ashburner (Eds.) *Lethal Yellowing Research and Practical Aspects.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 65-76.
- Oropeza, C.; J. Santamaría; G.R. Ashburner. 1995.** A model for the pathogenicity of lethal yellowing in coconut palms (*Cocos nucifera* L.). In: Eden-Green S. and F. Ofori (eds.) (1997). *Proceedings of an international workshop on lethal yellowing-*

- like diseases. Elmina Ghana, November 1995. Chatam, UK; Natural Resources Institute. pp 109-118.
- Parthasarathy, M.V. 1973.** Mycoplasma-like organism in the phloem of palms in Florida affected by Lethal Yellowing. *Plant Dis. Repr.* 57(10): 861-862..
- Parthasarathy, M.V. 1974.** Mycoplasma-like organism associated with lethal-yellowing disease of palms. *Phytopathol.* 64: 667- 674.
- Plasvisic-Banjac, B., P. Hunt y K. Maramorosch. 1972.** Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathology.* 62: 298-299.
- Plumbe, A.; C. Willmer. 1986.** Phytoalexins, water-stress and stomata. II. The effects of phytoalexins on stomatal responses in epidermal strips and on guard cell protoplasts. *New Phytol.* 102: 375-384.
- Premachandra, G.; H. Saneoka; K. Fujita; S. Ogata. 1992.** Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *J Exp Bot.* 43: 1569-1576.
- Radin, J.; L. Parker; G. Guinn. 1982.** Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. *Plant Physiol.* 70: 1066-1070.
- Radin, J. 1984.** Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiol.* 76: 392.394.
- Salunke, D.K.; B.B. Desar. 1986.** Post Harvest Biotechnology of Fruits. Vol II. CKC Press. pp 69-7
- Sánchez, M. 1991.** Analisis de arginina libre en palmas afectadas por amarillamiento letal. Tesis UADY, Mérida, México.
- Seymour, C.P., J.W. Miller y D.A. Roberts. 1972.** An outbreak of lethal yellowing of coconut palms in Miami, Florida. *Phytopathol.* 62(7): 617-620.
- Stemmner, W.; B. Archer; J. Daniels; C. Davies and S. Eden-Green. 1982.** Effect of lethal yellowing on the composition of the phloem sap from coconut palms in Jamaica. *Phytopathol.* 72: 672-675.
- Stuart, F. 1991.** Integrated responses of plants to stress. *Bioscience.* 41: 29-36.
- Tsai, J.H. y F.W. Mead. 1982.** Rotary net survey of Homopterans in palm planting in South Florida. *J. Econ. Entomol.* 75(5): 809-812.
- Zhang, J.; W.J. Davies.1990.** Changes in the concentration of ABA in xylem as a function of changing soil water status will account for changes in leaf conductance. *Plant Cell Environ.* 13:277-285.
- Zhang, J.; W. Davies. 1986.** Chemical and hydraulic influences on the stomata of flooded plants. *J Exp Bot.* 37: 1479-1491.
- Zhang, J. ; D.J. Gowing; W.J. Davies. 1990.** ABA as a root signal in root to shoot communication of soil drying. In: Davies W.J. and B. Jeffcoat (Eds.) Importance of root to shoot communication in the responses to environmental stress.
- Zhang, J.; U. Schurr; W.J. Davies. 1987.** Control of stomatal behaviour by Abscisic Acid which apparently originates in roots. *J Exp Bot.* 38: 1174-1181.



## Capítulo 2

### **Papel del Ácido Abscísico (ABA) en el cierre de estomas en palmas de coco enfermas de Amarillamiento Letal (AL).**

#### INTRODUCCIÓN

El Amarillamiento Letal (AL) es una de las enfermedades más devastadoras de las palmas a nivel mundial, debido a su rápida dispersión, la velocidad a que las palmas infectadas mueren, la falta de un tratamiento efectivo y la gran variedad de especies que son afectadas por esta enfermedad. La enfermedad causa múltiples alteraciones fisiológicas en la palma cocotera (*Cocos nucifera* L.) destacando principalmente el cierre prematuro de los estomas durante los primeros estadios de la enfermedad, el cuál se presenta en forma generalizada, ya que se muestra desde las hojas más viejas hasta la hoja bandera (León *et al.*, 1996). También se presenta en forma permanente, ya que gradualmente va perdiendo su capacidad de fluctuación diaria (abrir en el día y cerrar en la noche) para quedar cerrados en forma permanente.

Se ha sugerido que este cierre estomático puede ser uno de los factores que promuevan la posterior muerte de la palma, ya que de manera integral afecta procesos fundamentales para el desarrollo y supervivencia de la misma, como son la fotosíntesis, al evitar el intercambio gaseoso (asimilación de CO<sub>2</sub>), y el transporte de agua y nutrientes, ya que se esta abatiendo la transpiración (y por lo tanto se limita la fuerza hidráulica que promueve este transporte) (Oropeza *et al.*, 1995).

Debido a lo anterior, es de primordial importancia poder determinar cual es la causa de este cierre prematura de estomas, y así además de establecer algunos de los patrones fisiológicos de la enfermedad, se evaluará si éste fenómeno es el causante de los síntomas posteriores de la enfermedad, ya que hay evidencias que indican que algunos de los síntomas presentes en el AL, como la caída de frutos, necrosis de las inflorescencias y amarillamiento de las hojas se han asociado como resultado de condiciones de inanición (suministro disminuido de nutrientes minerales y fotosintatos) (Zimmermann, 1979).

Se ha demostrado en diversas especies que bajo condiciones de estrés abiótico (sequía, inundación, salinidad, etc.), un cierre de estomas puede ocurrir como resultado de un aumento en los niveles de ABA (Zhang *et al.*, 1987). En coco, León *et al.* (1996) demostraron que las cantidades de ABA presente en hoja no explican el cierre anormal de los estomas como resultado del AL. A pesar de que se presenta un incremento en la concentración de ABA, este se presenta en los grados tardíos de la enfermedad, mucho tiempo después de que los estomas se empiezan a cerrar en forma permanente.

A pesar de que el ABA presente en hojas no puede explicar este cierre anormal de estomas, no puede ser descartado totalmente. Las evidencias sugieren que en plantas sometidas a estrés hídrico, el cierre de estomas inducido se relaciona en forma más directa con incrementos de este fitoregulador en raíces (un sitio de síntesis) y en savia de xilema (vía de transporte) que con las concentraciones de ABA presentes en hoja (Davies y Zhang, 1991; Schurr *et al.*, 1992).

Así, se piensa que el caso del cierre de estomas inducido por AL se trate de una analogía a lo que ocurre en plantas sometidas a estrés hídrico. Por lo que en la presente tesis se va a tratar de determinar si las concentraciones de ABA presentes en raíces (primarias y secundarias) y savia de xilema pueden justificar el cierre de estomas presente en esta enfermedad, así como corroborar las cantidades de este fitoregulador presente en hoja.

Se buscará comprobar si los extractos acuosos de las hojas de las palmas enfermas de AL en diferentes grados, es capaz de provocar y repetir el cierre de estomas característico de la enfermedad en hojas de palmas sanas de coco mediante un bioensayo de tasas de transpiración (Weyers y Meidner, 1990). Para descartar que el efecto de los extractos sobre los estomas, en el bioensayo de tasas de transpiración con las pinnas de coco, se pueda ser disfrazado o alterado por el mesófilo presente, se comprobarán los resultados obtenidos con la aplicación de los extractos directamente sobre los estomas de epidermis desprendida en *Commelina communis* L. (Ogunkanmi *et al.*, 1972; Weyers y Travis, 1981).

Al mismo tiempo, se determinará la respuesta de las pinnas de coco de palmas sanas y las epidermis desprendidas de *C. communis* hacia diferentes concentraciones de ABA exógeno, mediante los ensayos correspondientes. Esto se realizará con el fin de verificar si las pinnas de hoja de palmas de coco son sensibles a ABA, ya que ha sido extensamente comprobado en las epidermis desprendidas de *C. communis* (Weyers y Meidner, 1990; Trejo *et al.*, 1993), así como la efectividad de los sistemas. Así, al verificar la posible sensibilidad de pinnas de coco hacia ABA, se obtendrá evidencia adicional sobre la posible participación de ABA en el cierre de los estomas de las palmas enfermas de AL.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico y diagnóstico de la enfermedad

El presente estudio se llevó a cabo en palmas *Cocos nucifera* L. (ecotipo: Alto del Atlántico), las cuales tenían una edad entre 20 y 30 años. La plantación del muestreo se localiza en el municipio de Sabancuy, Campeche. Para verificar si las palmas que no mostraban síntomas se encontraban sanas se les realizó pruebas de biología molecular, como la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicos para el fitoplasma del AL (Escamilla *et al.*, 1995).

Los análisis se llevaron a cabo tanto en palmas sanas como enfermas, en todos los grados de enfermedad. La determinación de los grados de enfermedad se realizaron según los síntomas visuales definidos por McCoy (1973).

### **Análisis de ácido abscísico**

Para la obtención de extractos de hoja y raíz, primero se congelaron los tejidos en nitrógeno líquido y se liofilizan por un periodo aproximado de 48 h. Los tejidos ya liofilizados se maceraron hasta obtener un polvo fino. Con este polvo se realizó la extracción, en una dilución de 1:30 (peso de tejido seco: volumen de agua) con agua destilada y desgasificada, en agitación constante, a una temperatura de 2 °C , durante 12 h. Al finalizar este lapso, se centrifugó a 8800 g por 1 min y se recuperó el sobrenadante.

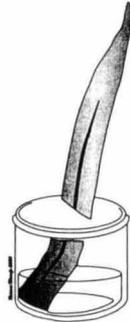
La extracción de savia se realizó con el uso de la cámara de presión PMS (PMS Ins. Co. Oregon, USA.), aplicando nitrógeno gaseoso para generar la presión. La savia comenzó a fluir al aplicar una presión aproximada de 15 a 20 bars (-1.5 a 2.0 MPa).

La obtención de extractos de palmas enfermas, para probar su efecto de los extractos en pinnas de palmas sanas, se realizó de la misma manera y a la misma dilución que para las determinaciones de ABA.

Las concentraciones de ABA fueron determinadas usando una prueba de radioinmunoanálisis (RIA). El anticuerpo monoclonal usado es específico para (+)-ABA (AFR MAC 62, obtenido en el laboratorio del Dr. Steve Quarrie). El protocolo del RIA para la cuantificación de las concentraciones de ABA fue el descrito por Quarrie *et al.* (1988).

La evaluación de la sensibilidad estomática ante extractos de hoja de palmas enfermas de AL se llevó a cabo primero con un bioensayo de transpiración (Weyers y Meidner, 1990). El bioensayo consiste en trabajar con segmentos de pinnas sanas las cuales son cortadas del resto de hoja bajo agua destilada y colocadas en vasos de precipitado (60 ml) con 20 ml de la sustancia cuyo efecto se desea evaluar, ya sea solución de amortiguador MES (n-morflino etanosulfonato) (testigo) o amortiguadores más extracto de hoja. Una porción de la pinna queda sumergida en el líquido, los frascos se cubrieron con papel aluminio permitiendo que el otro extremo de la pinna quedará fuera del frasco, al mismo tiempo que se evitó la evaporación. Esta porción de la pinna que quedó fuera del frasco es la superficie transpirable de la misma (fig. 2.1). Posteriormente los dispositivos se colocan en completa oscuridad por 12 h, al término de este periodo se encendió la luz y se registró cada hora su peso para determinar la tasa de transpiración. Las mediciones se realizaron durante 5 h, entonces el área de lhoja expuesta al aire libre (área transpirable) se determinó y la tasa de transpiración se expresó por unidad de área de la pinna.

El fundamento de este bioensayo radica en que la porción de la pinna que queda en contacto con la sustancia lo asimile y lo pierda a manera de transpiración a través de los estomas (las pérdidas de agua por transpiración es expresada como tasas de transpiración [ $\text{mg H}_2\text{O cm}^{-2}\text{min}^{-1}$ ], la pérdida del líquido se calcula por diferencias de pesos). En teoría, cualquier sustancia al ser colocada en la solución vehículo, en el cuál se encuentra sumergida la pinna, será tomada por ésta, siempre y cuando existan las condiciones favorables para la transpiración, y su efecto se verá reflejado ya sea en un incremento, descenso o nulo efecto en la transpiración.



**Figura 2.1. Esquema representativo del dispositivo para la realización de los ensayos de transpiración**

Al inicio de cada experimento se pesaron las muestras durante la última hora oscuridad, seguido por un periodo de luz de 5 h. Los valores obtenidos durante el periodo de oscuridad se restaron a los valores obtenidos durante el periodo de luz, con el fin de eliminar las pérdidas de evaporación del sistema al suponer que en oscuridad los estomas se encuentran cerrados y que únicamente se pierde agua por evaporación y no por transpiración.

Para el bioensayo se utilizaron porciones de pinnas de palma cocotera transportadas al laboratorio en un frasco con agua destilada, al llegar al laboratorio fueron cortadas bajo el agua al tamaño adecuado para el bioensayo (aprox. 15 cm). Se incubaron en solución de amortiguador MES (n-morfolin etanosulfonato) (testigo) o sol. amortiguador MES más extracto de hoja de palma (experimental) en oscuridad para estabilizar el turgor de las células y tratar de provocar el cierre de todos los estomas antes de iniciar el experimentos. Los ensayos de transpiración se realizan en un cuarto con luz, temperatura y humedad relativa controladas (flujo de fotones fotosintéticamente activos  $210 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 45%). Para establecer los valores que sirvieron para el cálculo de las tasas de transpiración, el sistema fue pesado cada hora durante un periodo de entre 3 y 5 h (una vez estabilizado el sistema).

Las tasas se calculan de la siguiente manera:

$$(P1 - P2) / (T.A)$$

Donde

P1= Peso inicial del sistema (descontando evaporación).

P2= Peso final del sistema al tiempo T (descontando evaporación).

T= Tiempo que transcurre entre una pesada y la siguiente.

A= Área foliar transpirable.

El área de las superficies transpirables se mide con un medidor de área foliar

### **Comportamiento estomático en epidermis desprendida de *Commelina communis***

Las semillas de *C. communis* fueron germinadas en papel absorbente húmedo en condiciones de oscuridad total y temperatura aprox. de 30 °C. Una vez germinadas se transplantaron a un sustrato inerte (Agrolita) en una cámara de crecimiento con temperatura de 20 °C, intensidad lumínica de 240  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y luz/oscuridad de 14 h. Las plantas fueron regadas diariamente con agua y cada tercer día con solución nutritiva de Hoagland al 50 % (Hoagland y Arnon, 1950). Cuando las plantas tuvieron entre 5 y 6 semanas de edad, las hojas más jóvenes completamente expandidas se usaron como fuente de material experimental.

Las epidermis fueron desprendidas cuidadosamente de la superficie abaxial de las hojas de *C. communis*, las cuales fueron cortadas en porciones de 5x10 mm. Antes de la incubación, las porciones de epidermis fueron colocadas en una caja de Petri de 85 mm de diámetro conteniendo solución amortiguador de MES a 10 mM, KCl a 50 mM y con un pH de 6.15 ajustado con KOH. Las cajas Petri fueron colocadas en completa oscuridad por 30 min. La mayoría de los estomas se encuentran cerrados al final de esta etapa. Posteriormente las epidermis se incubaron en un baño de agua por 3 h a 25 +/- 1 oC bajo una intensidad de luz de 280  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en cajas de Petri de 50 mm de diámetro conteniendo 15 ml de solución amortiguadora MES a 10 mM (testigo) o solución amortiguadora MES a 10 mM más extracto de palma, todos complementados con KCl a 50 mM y a pH de 6.15, ajustado con KOH.

Se introdujo en cada sistema un flujo de 8.8 ml min<sup>-1</sup> mediante agujas inmersas en el medio aire libre de CO<sub>2</sub> (el cual se obtiene pasando el aire a través de una columna de Soda Lime). Después de 3 h de incubación, los segmentos de epidermis se analizaron en el microscopio digitalizador de imágenes y las aperturas de los estomas analizados fueron medidas individualmente.

## **RESULTADOS**

En los siguientes se muestra el valor de las concentraciones de ABA presentes en extracto de hoja (Fig. 2.2a), en savia de xilema (Fig. 2.2b) y en

extracto de raíces primarias (Fig. 2.2c) y secundarias (Fig. 2.2d). Todo esto realizado en palmas sanas (grado 0) y palmas enfermas en diferentes grados de enfermedad (grados del 1 al 6).

Las concentraciones de ABA presente en hojas (Fig. 2.2a) en palmas enfermas de AL permanecen sin alteración, durante los primeros grados de enfermedad, en comparación con las pinnas de palmas sanas, donde los niveles de ABA quedan dentro del rango de 1 a 2 mg g<sup>-1</sup> P.S. No obstante que se presenta un incremento en los niveles de ABA, este llega hasta el grado 6 de enfermedad, que presenta niveles de 3.03 mg g<sup>-1</sup> P.S. Los resultados comprueban los datos obtenidos por León *et al.* (1996) para las cantidades de ABA presentes en hoja.

El ABA presente en savia de xilema (Fig. 2.2b) presenta la misma tendencia que el ABA de hoja, los niveles de palmas sanas y los primeros grados de enfermedad no muestran diferencias, 0.229 a 0.022 ng µl<sup>-1</sup> savia, pero se muestra un incremento en los grados 5 y 6, 0.841 y 0.924 ng µl<sup>-1</sup> savia, respectivamente.

Las concentraciones de ABA no cambiaron en raíces secundarias (Fig. 2.2d) de grado 0 a grado 4. En grados 5 y 6 no se encontraron raíces secundarias. Pero, por el contrario, disminuyeron sensiblemente en las raíces primarias de palmas enfermas en comparación con palmas sanas, (Fig. 2.2c), de 1.38 a 0.24 mg g<sup>-1</sup> P.S., en grado 0 a grado 1, respectivamente. Los grados posteriores quedaron aproximadamente al mismo nivel.

Una vez estabilizado el sistema de la cinética de transpiración de las pinnas de coco, entre las 3 y 5 h, prácticamente no hubo diferencias en la aplicación de extracto de pinna sana o de enferma (Fig. 2.3a). Tanto la aplicación de extracto de pinna sana o enferma redujo la transpiración, en comparación con el tratamiento testigo (solución amortiguadora) en la tercera hora después de haber iniciado el ensayo, aproximadamente un 50% en extracto de palmas sanas y enfermas en etapas tempranas y un 20% en los grados tardíos de la enfermedad (Fig. 2.5a); lo que nos indica que de manera natural los extractos de hoja de coco poseen algún inhibidor de la transpiración, el cuál se localiza en forma más diluida en los estados avanzados de la enfermedad. No obstante, las pinnas de coco demostraron ser proporcionalmente sensibles a la aplicación de un gradiente de concentración de ABA exógeno, es decir, a mayores concentraciones de ABA se presentan menores tasas de transpiración desde el inicio del bioensayo (Fig. 2.3b). A las 3h de haber comenzado la prueba se había reducido la transpiración en un 30% con la concentración de 1x10<sup>-8</sup> M de ABA exógeno, 60% con 1x10<sup>-6</sup> M de ABA y 95% con 1x10<sup>-4</sup> M de ABA (Fig. 2.5b).

Tampoco se encontraron diferencias en la aplicación de los mismos extractos ahora en el sistema de epidermis de *C. communis* desprendida (Fig. 2.4a), ya que a pesar de que el extracto procediera de palma sana o enferma, de todos modos se observó el cierre de los estomas y también en forma no diferencial. La apertura de los estomas mostró una reducción en comparación con

el tratamiento testigo del 60%, tanto con extracto de palmas sanas o enfermas (Fig. 2.5c). El ensayo de las epidermis de *C. communis* repitieron los reportes existentes en cuanto a su sensibilidad hacia ABA, ya que a las 3h de incubarse en concentraciones crecientes de dicho fitorregulador, se mostró en las epidermis una mayor inhibición de sus aperturas estomáticas (Fig. 2.4b). A una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M de ABA exógeno se había reducido la apertura estomática en un 20%, 60% con  $1 \times 10^{-6}$  M de ABA y 95% con  $1 \times 10^{-4}$  M de ABA (Fig. 2.5d).

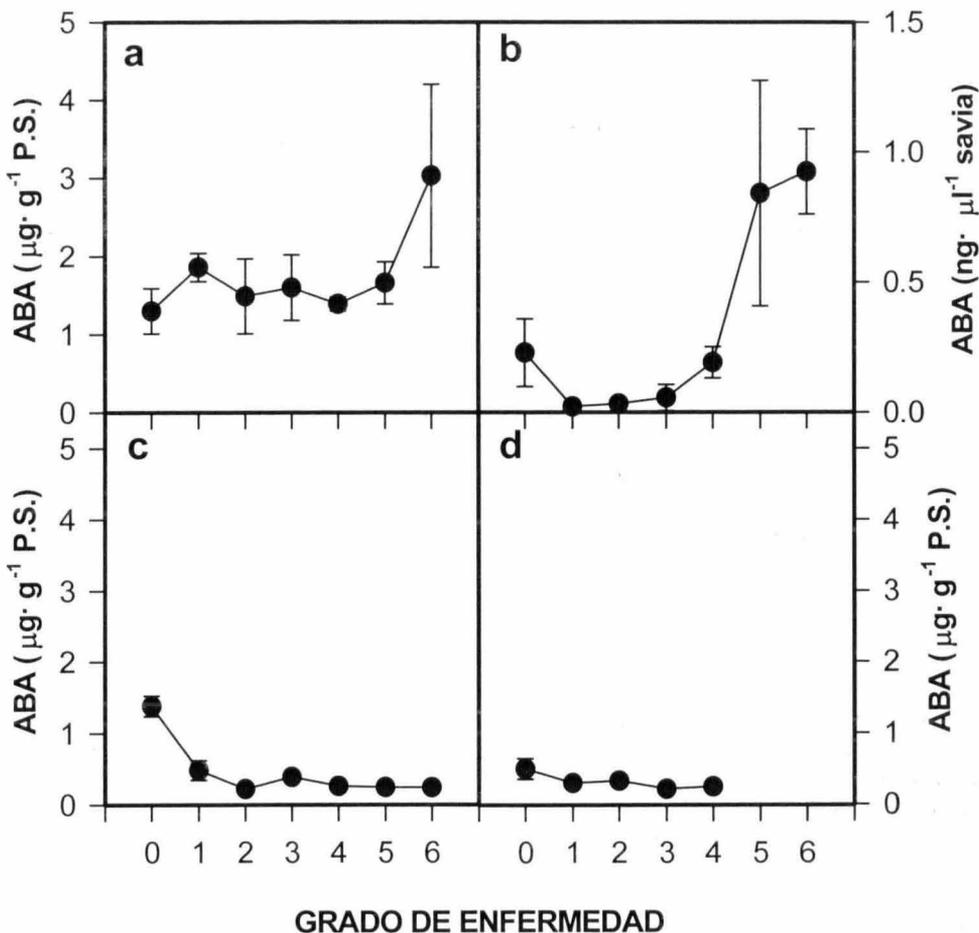
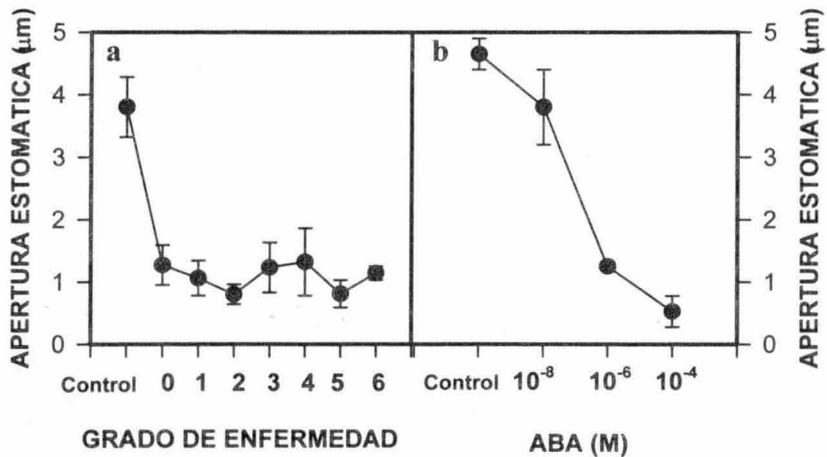


Figura 2.2. Concentración de ABA en: a)hojas, b) savia de xilema, c) raíces primarias, y d) raíces secundarias de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL. En grado 0 y 6 no se encontraron raíces secundarias. El estadio 0 corresponde a palmas asintomáticas (testigo). Cada punto representa el promedio de tres palmas con tres repeticiones y las barras la desviación estándar.



**Figura 2.3.** Cinética de transpiración de pinnas de palmas cocoteras sanas, expuestas a: a) extractos totales de hojas de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL y, b) diferentes concentraciones de ABA o solución de MES (testigo). El estadio 0 corresponde a palmas asintomáticas. Cada punto representa el promedio de tres pinnas con tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

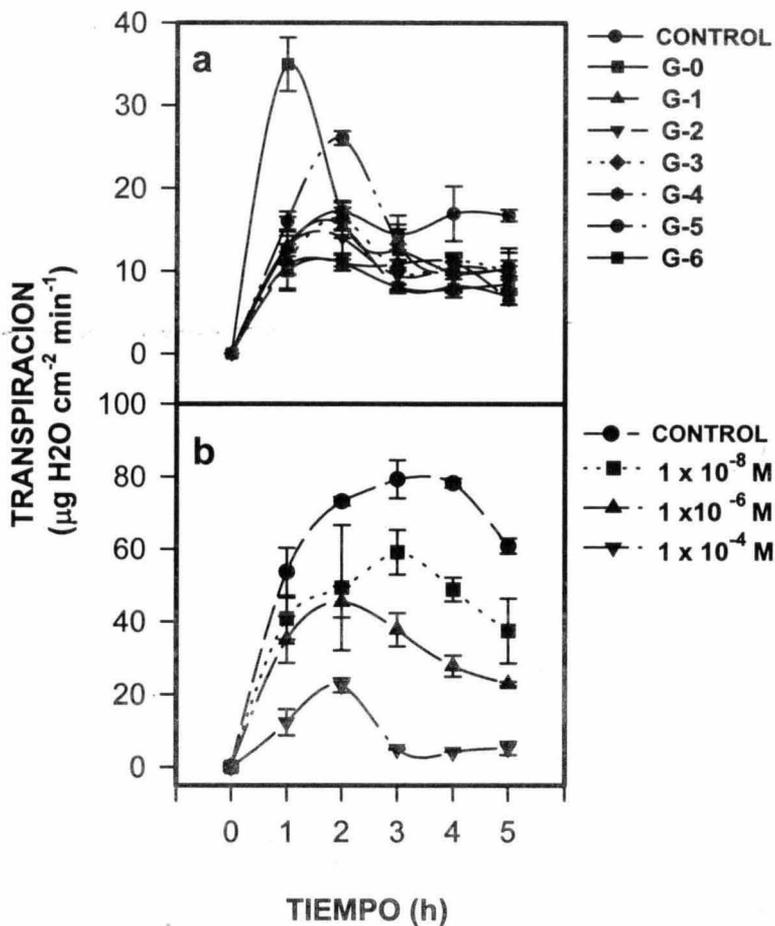


Figura 2.4. Apertura estomática después de 3 h de incubación de epidermis desprendida de *C. communis* expuestas a: a) extractos totales de hojas de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL y b) diferentes concentraciones de ABA o solución de MES (testigo. Cada punto representa el promedio de 60 estomas con tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

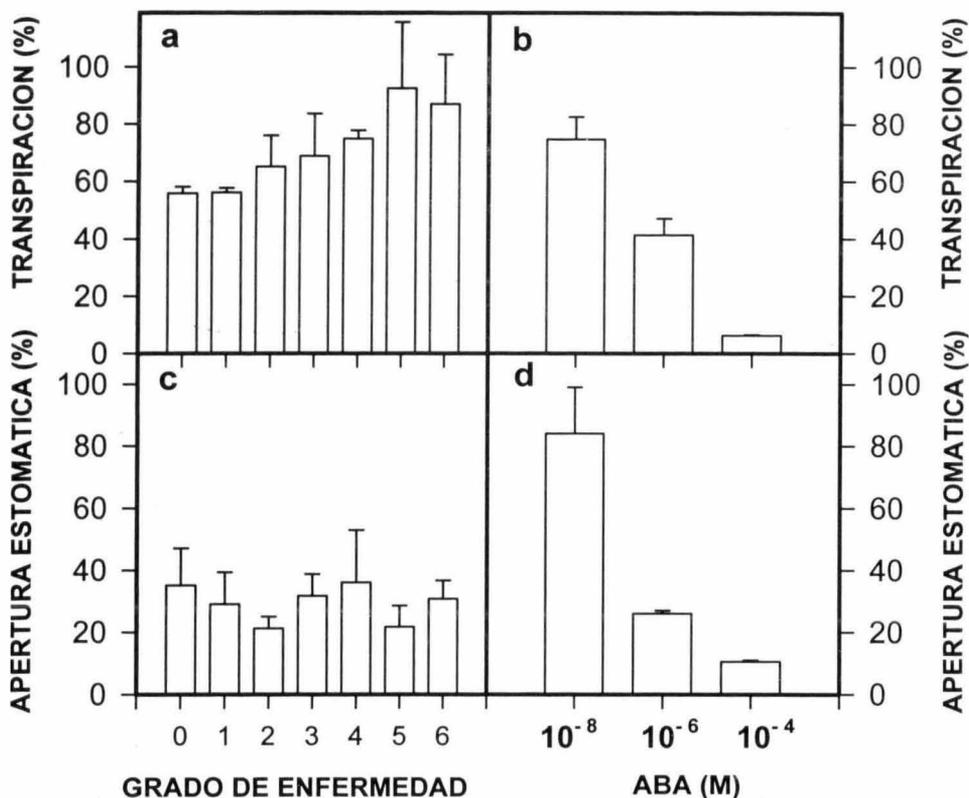


Figura 2.5. Capacidad de transpiración relativa de pinnas de palmas cocoteras sanas, expuestas a: a) extractos totales de hojas de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL y b) diferentes concentraciones de ABA o solución de MES (testigo=100%), después de 3 h de haber iniciado el ensayo. Apertura estomática de epidermis desprendida de *C. communis* expuestas a: c) extractos totales de hojas de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL y d) diferentes concentraciones de ABA o solución de MES (testigo= 100%), después de 3 h de haber iniciado el ensayo. El estadio 0 corresponde a palmas asintomáticas. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones con tres réplicas y las barras la desviación estándar.

## DISCUSIÓN

Debido a las evidencias que confirman que ABA es el principal regulador de la apertura estomática en diversas clases de estrés abióticos (Zhang *et al.*, 1989; Davies y Zhang, 1991; Schurr *et al.*, 1992), se especuló que este fitoregulador podría ser el causante del cierre anormal de estomas en palmas de coco enfermas de AL.

A pesar de que se encontró un incremento en los niveles de ABA tanto en hoja como en savia, éste se presentó en los grados avanzados de la enfermedad, no justificando el cierre temprano de los estomas ya que este se presenta a partir del grado 1 de enfermedad, corroborando los datos obtenidos por León *et al.* (1996). El incremento que se presentó en la savia podría ser resultado del aumento en la concentración de ABA en la hoja debido principalmente a que es en esos grados de enfermedad es cuando el potencial hídrico de la hoja comienza a verse afectado (a partir del grado 5 de la enfermedad) (León *et al.*, 1996).

Por lo tanto es de esperarse que este incremento de ABA en savia se deba principalmente a la hoja y no a la raíz, ya que en raíces a parte de no verse afectadas (raíces secundarias) inclusive llegan a disminuir sus concentraciones de ABA en raíces primarias. El motivo de este comportamiento se explicaría por las lesiones y cambios bioquímicos y fisiológicos (disminución en la tasa de respiración y en el contenido de azúcares) reportadas en raíces antes de la aparición de cualquier síntoma visual de la enfermedad (Islas-Flores *et al.*, 1998). Este fenómeno podría afectar el metabolismo de las raíces, al grado de alterar la síntesis, e incluso provocar la degradación, de ABA.

Adicionalmente, se puede inferir que los extractos de hoja de coco pueden contener algunos factores que de manera natural tienen la capacidad de cerrar los estomas, tanto en hojas de coco, como con otras especies (Munns y King, 1988).

Los resultados de este capítulo nos indican que el contenido de ABA no se encuentra directamente involucrado en el cierre de estomas en palmas de coco enfermas de AL. Esto nos lleva a considerar otras posibilidades, como la acción de otro fitoregulador (Dabek y Hunt, 1976; León *et al.*, 1996), desbalance iónico producido por deficiencia en la absorción (lesiones en raíces) o su transporte (disminución de flujo en xilema) de nutrientes (Dabek y Hunt, 1976), la acción de alguna toxina producida por el patógeno (Douglas, 1976; Kirkpatrick, 1986), la acumulación de algún compuesto metabólico de desecho de toxicidad no específica producido por el patógeno (Daniels, 1983), o la existencia de algún otro compuesto con capacidad antitranspirante (Munns y King, 1988; Trejo y Davies, 1991).

En el siguiente capítulo se realizaron pruebas preliminares para determinar si algunos de los factores anteriormente propuestos pueden estar involucrados en el cierre de estomas en las palmas enfermas de AL. Factores como las concentraciones de fenoles, potasio, azúcares (reductores y no reductores), y

algunos factores fisicoquímicos (osmolalidad y conductividad) en los extractos acuosos de las hojas de palmas sanas y enfermas de AL.

## BIBLIOGRAFIA

- Dabek, A.J.; P. Hunt. 1976.** Biochemistry of leaf senescence in Coconut Lethal Yellowing, a disease associated with Micoplasma-Like Organism. Trop Agric. 53: 115-123.
- Daniels, M. 1983.** Mechanisms of spiroplasma pathogenicity. Ann Rev Phytopathol. 21: 29-43.
- Davies, W.J.; J. Zhang. 1991.** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. Annu Rev Plant Physiol Mol Biol. 42: 55-76.
- Douglas, S.M. 1986.** Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokeberry with X-disease by fluorescence microscopy. Phytopathol. 76: 784-787.
- Escamilla, J.A; N.A. Harrison; H. Nuñez; L. Alpizar; I. Cordova; I. Islas-Flores; C. Oropeza. 1995.** Practical use de DNA probes for the detection of lethal yellowing of *Cocos nucifera* L. in Mexico. In: C. Oropeza, F.W. Howard and G.R. Ashburner (Eds.) Lethal Yellowing Research and Practical Aspects. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 93-100.
- Hoagland, D.R.; D.I. Arnon. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. Current 347, Calif Agr Expt Sta.
- Islas-Flores, I.; J.M. Santamaría; I. Cordova; C. Oropeza. 1998.** Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera* L.) affected by lethal yellowing. J Plant Physiol. In press.
- Kirkpatrick, B.C. 1986.** Characteristics of western X-disease mycoplasma-like organisms. PhD thesis. University of California, Berkeley.
- León, R.; J. Santamaría; L. Alpizar; J.A. Escamilla y C. Oropeza. 1996.** Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. New Phytol. 134: 227-234.
- McCoy, R.E. 1973.** Effect of Various Antibiotics on Development of Lethal Yellowing in Coconut Palm. Proc Florida State Hort Soc. 83: 503-506.
- Munns, R.; R. King. 1988.** Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. Plant Physiol. 88: 703-708.
- Ogunkanmi, A.; D.J. Tucker; T. Mansfield. 1973.** An improved bio-assay for abscisic acid and other antitranspirants. New Phytol. 72: 477-482.
- Oropeza, C.; J. Santamaría; G.R. Ashburner. 1995.** A Model for the Pathogenicity of Lethal Yellowing in Coconut Palms (*Cocos nucifera* L.). In: Eden-Green S. and F. Ofori (eds.) (1997). Proceedings of an international workshop on lethal yellowing-like diseases. Elmina Ghana, November 1995. Chatam, UK; Natural Resources Institute. pp 109-118.
- Quarrie, S.A.; P.N. Whitford; N.E.J. Appleford; T.L. Wan; S.H. Cook; I.E. Henson; B.R. Loveys. 1988.** A monoclonal antibody to (s)-Abscisic Acid: Its characteristics and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereals and lupin leaves. Planta. 173: 330-339.

- Schurr, U.; T. Gollan; E.D. Schulze. 1992.** Stomatal response to drying soil in relations to changes in xylem sap composition of *Helianthus annuus* L. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15: 561-567.
- Trejo, C.; W. Davies; L. Ruíz. 1993.** Sensitivity of stomata to abscisic acid. *Plant Physiol.* 102: 497-502.
- Trejo, C. and W. Davies. 1991.** Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. *J Exp Bot.* 42: 1507-1515.
- Weyers, J. and H. Meidner. 1990.** Methods in stomatal research. Harlow: Longman. Scientific and Technical, London.
- Weyers, J.; A. Travis. 1981.** Selection and preparation of leaf epidermis for experiments on stomatal physiology. *J Exp Bot.* 32: 837-850.
- Zhang, J.; U. Schurr; W.J. Davies. 1987.** Control of stomatal behaviour by Abscisic Acid which apparently originates in roots. *J Exp Bot.* 38: 1174-1181.
- Zimmermann, M.H. 1979.** Mycoplasma diseases and long distance transport in plants. NSC. Symposium series, pp 37-42.



## Capítulo 3

### Otros factores posiblemente involucrados en el cierre de los estomas en las palmas de coco enfermas de AL.

#### INTRODUCCIÓN

Existen un gran número de factores que pueden estar involucrados en el cierre anormal de los estomas en palmas enfermas de AL, aunque sea de manera indirecta. Uno de estos factores puede ser la acción indirecta de compuestos fenólicos, ya que se sabe que en los tejidos de algunas plantas se pueden acumular en respuesta al ataque de microorganismos a la planta, su aparición es considerada como parte de un sistema de defensa activo (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Se ha reconocido que la planta responde al ataque de los patógenos por una rápida y temprana acumulación de compuestos fenólicos en el sitio de infección y la limitación del desarrollo del patógeno sucede como una rápida muerte celular (respuesta hipersensitiva), es decir, la rápida acumulación de fenoles realiza un aislamiento efectivo del patógeno (o no patógeno) en el sitio de ingreso (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Sin embargo, a pesar de que estos compuestos son parte del sistema de defensa de las plantas, se ha determinado que algunos de estos compuestos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la apertura estomática en bioensayos de epidermis desprendida de *Commelina communis* (Plumbe y Willmer, 1986). Esto puede ser indicativo de que la entrada del fitoplasma, causante del AL, a la palma pueda inducir en ella la producción de compuestos fenólicos como sistema de defensa, sin embargo, de manera indirecta la acumulación de estos productos pueden alterar la conducta de sus estomas, provocando su cierre.

Otro factor que puede estar afectando a los estomas de las palmas enfermas puede ser una deficiencia en la concentración de potasio ( $K^+$ ). Se sabe que  $K^+$  es uno de los principales factores que promueven la apertura de los estomas (Zhang y Davies, 1986); sin embargo, si las concentraciones de este ión disminuyen, como resultado de las lesiones necróticas en raíces de palmas enfermas ampliamente reportadas (Eden-Green, 1976; Eden-Green y Waters, 1982; Eskafi *et al.*, 1986) se puede llegar a limitar la apertura estomática debido a un suministro deficiente o absorción de este ión en las palmas enfermas de AL.

Por otro lado, se han realizado estudios en las raíces de diversas especies de plantas sometidas a condiciones de baja disposición de oxígeno (como sucede en situaciones de inundación). Las raíces de dichas plantas presentan respiración anaeróbica, lo que produce bajas cantidades de ATP. Esto provoca una despolarización de sus membranas, resultando en una disminución en la absorción, e incluso puede presentarse la expulsión de este ión. Dando por resultado una disminución en los niveles de  $K^+$ , con ello se limita la apertura estomática en plantas sometidas a dichas condiciones (Zhang y Davies, 1986).

Como se mencionó anteriormente, las raíces de palmas enfermas de AL presentan alteraciones bioquímicas, las cuales resultan en bajas tasas de respiración y concentración de azúcares (Islas-Flores *et al.*, 1998), por lo tanto la toma de  $K^+$  por raíces de palmas enfermas se puede ver limitada, lo que nos llevaría una deficiencia en sus niveles de  $K^+$ , y por lo consiguiente, a una reducción en la apertura de los estomas en dichas palmas enfermas de AL.

La concentración de azúcares presentes en la hoja puede ser otro factor limitante en la apertura estomática. En estudios recientes, se ha encontrado que los azúcares (particularmente sacarosa) puedan tener alguna implicación en el control estomático (Amodeo *et al.*, 1996). La apertura inicial de los estomas se relaciona con la acumulación de  $K^+$  en la células guarda, a pesar de que las cantidades de este ión disminuyen en el transcurso del día, el estoma permanece abierto o aumenta su apertura; aquí se observa que los niveles de sacarosa aumentan (aprox. 60%) durante el período de declinación de contenido de  $K^+$ , sugiriendo que la sacarosa puede ser usada como osmolito cuyo fin es mantener la apertura estomática durante el resto del día. De acuerdo a lo anterior, se puede esperar que una deficiencia en las concentraciones de azúcares presentes en la hoja, sea un factor que pueda estar evitando la apertura normal de los estomas en las palmas enfermas de AL.

Algunos factores fisicoquímicos, tal como la osmolalidad, conductividad o el pH (Hartung *et al.*, 1988), pueden estar involucrados en un cierre de estomas en palmas de coco afectadas por AL. En cuanto a la osmolaridad, Bittisnich *et al.* (1987) demostró que los estomas de epidermis de *Vicia faba* podían cerrarse proporcionalmente con aplicación de presión osmótica externa generada por soluciones de sacarosa de concentración en aumento. También se determinó que en las plantas sometidas a estrés hídrico, aumenta el potencial osmótico de la hoja, pudiendo ser otro de los factores que contribuyen al cierre de los estomas en las plantas bajo esas condiciones (Premachandra *et al.*, 1992). En la palma enferma de AL, los factores que pudieran estar afectando la osmolalidad de los estomas serían los azúcares o iones (principales contribuyentes al potencial osmótico) o la acumulación de productos metabólicos de desecho no específicos sintetizados por el patógeno (por ejemplo, ácido láctico, alteraciones del pH, etc.) (Daniels, 1983).

Un desbalance en la cantidad de iones presentes en la hoja, es decir con alteraciones en su conductividad, puede llegar a afectar la apertura estomática en plantas sujetas a algún tipo de estrés (Gollan *et al.*, 1992). Se ha determinado que las deficiencias en el contenido de ciertos iones, principalmente nitrógeno (N) y fósforo (P), pueden alterar la sensibilidad de los estomas hacia ABA (Radin *et al.*, 1982; Radin, 1984) y los bajos niveles de  $K^+$  pueden inhibir la apertura de los estomas (Zhang y Davies, 1986). La deficiencia o aumento de algunos iones pueden estar afectando la conductancia de los estomas en palmas enfermas de AL. Variaciones en el pH también pueden afectar el comportamiento de los estomas. Se ha determinado que las plantas sometidas a estrés hídrico presentan un aumento de pH en savia de xilema (5.8 a 7.1), lo cuál podría representar un

cambio en las características de la pared de las células guarda o flujo iónico, ya que a mayor déficit hídrico se presenta tanto un aumento de pH como disminución del cierre estomático (Gollan *et al.*, 1992). Además se ha documentado que un pH ácido tiene la capacidad de abrir estomas. Epidermis desprendidas de *Vicia faba* se incubaron con amortiguadores a distintos pH, dando por resultado que a mayor acidez del amortiguador, mayor apertura de los estomas (Bittisnich *et al.*, 1987). Lo que pudiera estar afectando la apertura estomática de las palmas enfermas de AL pudiera ser un simple cambio de pH de su entorno, debido posiblemente, como se menciono anteriormente, a la acumulación de algún producto metabólico no específico por el patógeno (por ejemplo, ácido láctico, alteraciones del pH, etc.) (Daniels, 1983).

Para el presente capítulo se determinaran de manera preliminar las posibles diferencias entre los extractos acuosos de hoja de palmas sanas y enfermas de AL en cuanto al contenido de compuestos fenólicos, potasio, azúcares, conductividad y osmolalidad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico y diagnóstico de la enfermedad**

El presente estudio se llevó a cabo en palmas *Cocos nucifera* L. (ecotipo: Alto del Atlántico), las cuales tenían una edad entre 20 y 30 años. La plantación del muestreo se localiza en el municipio de Sabancuy, Campeche. Para verificar si las palmas que no mostraban síntomas se encontraban sanas se les realizaron pruebas de biología molecular, como la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicos para el fitoplasma del AL (Escamilla *et al.*, 1995).

Los análisis se llevaron a cabo tanto en palmas sanas como enfermas, en todos los grados de enfermedad. La determinación de los grados de enfermedad se realizaron según los síntomas visuales definidos por McCoy (1973).

Para la obtención de extractos de hoja de palmas de coco sanas y enfermas de AL, primero se congelaron los tejidos en nitrógeno líquido y se liofilizan por un periodo aproximado de 48 h. Los tejidos ya liofilizados se maceraron hasta obtener un polvo fino. Con este polvo se realizó la extracción, en una dilución de 1:30 (peso de tejido seco: volumen de agua) con agua destilada y desgasificada, en agitación constante, a una temperatura de 2 °C , durante 12 h. Al finalizar este lapso, se centrifugó a 10000 r.p.m. por 1 min. Se recupera el sobrenadante, que es el material donde se llevaron a cabo las siguientes determinaciones.

## **Contenido de Fenoles Solubles**

El contenido de compuestos fenólicos solubles en los extractos de hoja de palmas sanas y enfermas se determinaron de acuerdo a la técnica reportada por Swain y Hillis (1959). La técnica consiste en tomar 0.1 ml del extracto a analizar, añadiéndole 0.1 ml de reactivo Folin-Ciocalter, con el fin de provocar una reacción coloreada; se diluyó con 1.8 ml de agua y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente determinó su absorbancia a una longitud de onda de 725 nm. La curva patrón se hizo con ácido caféico.

## **Determinación de Potasio (K)**

La concentración de K en extractos de la hoja se determinó por espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3100). El aparato rocía el extracto sobre la flama ionizante (convierte en ión todo el K presente en el extracto), sobre la cual se enfoca una fuente de luz, con la longitud de onda específica para K (766 nm), así por medio de la absorbancia se determina la cantidad de K presente en la muestra.

## **Cuantificación de Azúcares Totales, Reductores y No Reductores**

La cuantificación de azúcares totales presentes en los extractos de hoja se determinaron según Buysse y Merckx (1993), y para los reductores, según Bernfeld (1955). Mediante la diferencia de estos 2 valores se obtiene la concentración de los azúcares no reductores. Los azúcares totales se determinan tomando una alícuota de 0.1 ml del extracto y se aforó a 2.0 ml con agua destilada; se le agregó 1 ml de fenol al 5 %; se agitó y se le agregó 5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado; se dejó reposar por 10 min, se agitó se dejó reposar 15 min. Posteriormente se leyó a 490 nm; la curva patrón se hizo con glucosa.

Los azúcares reductores se determinaron tomando 0.1 ml de muestra, se llevó a un volumen de 1.5 ml con agua destilada. Se le añadieron 3 ml de ácido dinitro-salicílico (DNS), se hirvió por 5 min, se enfrió y se le añadió 15.5 ml de agua destilada. Se agitó y se leyó a 550 nm.

Los azúcares no reductores se determinaron restando a la concentración de totales la concentración de reductores.

## **Factores Físicoquímicos**

La conductividad y osmolalidad de los extractos se determinaron mediante el uso de un conductímetro (4070, Cole-Parmer) y un osmómetro (3W2, Advanced Instruments, Inc.), respectivamente.

## RESULTADOS

En la Fig. 3.1a, se muestra la concentración de compuestos fenólicos solubles en los extractos acuosos de hojas de coco de palmas sanas y enfermas de AL. Las concentraciones de fenoles no muestran diferencia alguna entre palmas sanas o enfermas, y aún entre los extractos de las palmas enfermas, ya que a pesar de presentar pequeñas oscilaciones, las cantidades se encuentran dentro del rango de 20 a 30 mg g<sup>-1</sup> P.S. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar, de manera preliminar, que los compuestos fenólicos no tiene participación alguna en el cierre prematuro de los estomas de palmas afectadas por AL.

Las concentraciones de K<sup>+</sup> en extractos acuosos de hoja (Fig. 3.1b) muestran variaciones entre palmas sanas y enfermas. Las cantidades de K<sup>+</sup> en palmas sanas presentan valores de 5 mg g<sup>-1</sup> P.S., pero a pesar de que se muestra una disminución de estas cantidades en el grado 1 (3 mg g<sup>-1</sup> P.S.) y en los grados intermedios de la enfermedad (entre 2 y 3 mg g<sup>-1</sup> P.S.), durante el grado 3 de enfermedad se presenta un pico en las concentraciones de K<sup>+</sup> (8 mg g<sup>-1</sup> P.S.).

Las concentraciones de azúcares (Fig. 3.1c) no muestran cambio alguno en cuanto a las concentraciones de azúcares reductores (alrededor de 4 mg g<sup>-1</sup> P.S.). Sin embargo, a pesar de que las concentraciones de azúcares no reductores no muestran grandes diferencias (entre 1 y 4 mg g<sup>-1</sup> P.S.), estos presentan un comportamiento aún más irregular durante el transcurso de la enfermedad.

La osmolaridad (Fig. 3.2a) y la conductividad (Fig. 3.2b) no muestran cambios que expliquen el cierre de estomas en palmas enfermas de AL. Se muestran valores constantes en osmolaridad (40 a 45 mOsm kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O), así como para la conductividad (4 mS), ya sea para extractos de palmas sanas o enfermas de AL.

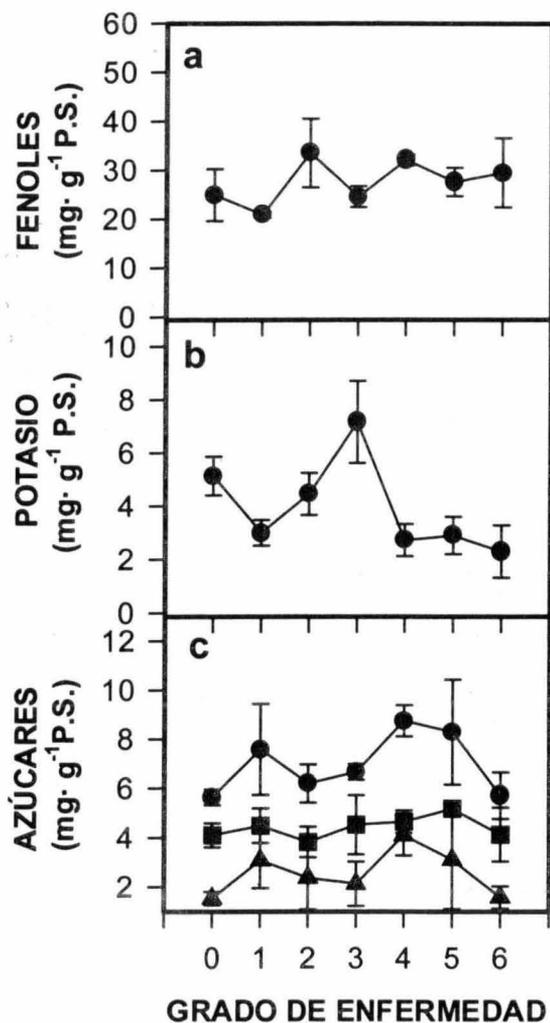


Figura 3.1. Concentración de a) fenoles solubles, b) potasio y c) azúcares ( ▲ = totales, ● = reductores, ■ = no reductores) en extractos acuosos de hoja de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL. El estadio 0 corresponde a palmas asintomáticas (testigo). Las determinaciones se realizaron en hojas de la parte media de la fronda. Cada punto representa el promedio de tres palmas con tres réplicas y las barras la desviación estándar.

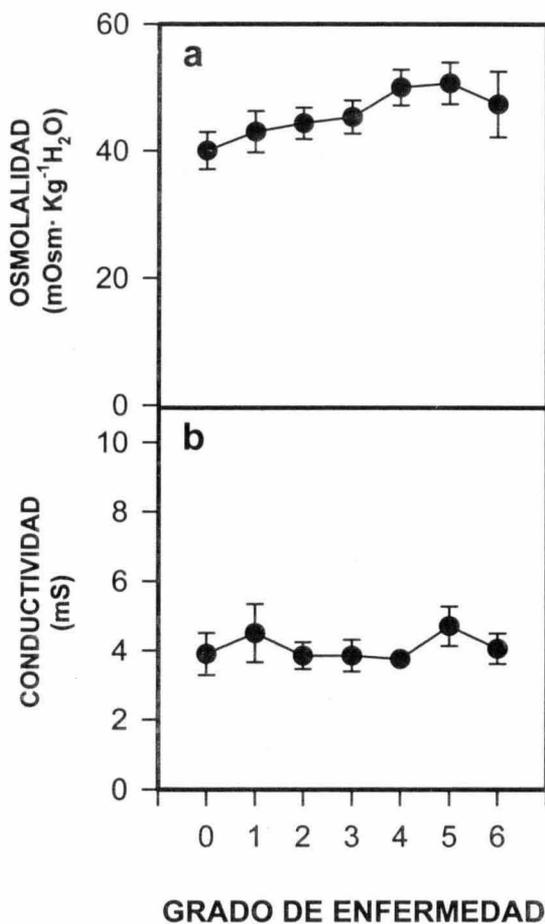


Figura 3.2. Osmolalidad (a) y conductividad (b) de los extractos acuosos de hoja de palmas cocoteras en diferentes grados del desarrollo del AL. El estadio 0 corresponde a palmas asintomáticas (testigo). Las determinaciones se realizaron en hojas de la parte media de la fronda. Cada punto representa el promedio de tres palmas con tres réplicas y las barras la desviación estándar.

## DISCUSION

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las palmas afectadas con AL no muestran acumulación de compuestos fenólicos comparadas con palmas sanas. Sin embargo, con estas pruebas preliminares no es posible descartar que estos compuestos estén involucrados en la defensa de la palma al AL, ni que de manera indirecta afecten la conductancia estomática de estas palmas enfermas. Se ha reportado que un mecanismo de defensa en las plantas contra el ataque microbiano es la acumulación de compuestos fenólicos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Halloin, 1994). Además, se ha descrito que varios compuestos fenólicos son capaces de provocar el cierre de estomas (Plumbe y Willmer, 1986). Para verificar estos resultados es necesario realizar pruebas más concluyentes en la determinación de estos compuestos, como son técnicas histoquímicas o el seguimiento durante la enfermedad de algunos fenoles en particular, por ejemplo, la betagarina o la betavulgarina, relacionados como fenoles de defensa contra hongos en *Beta vulgaris* L. (Halloin, 1994) o ácidos benzoicos y fenilpropanoides (Kurosaki *et al.*, 1986; Neemann *et al.*, 1991). Desafortunadamente, la identidad de los fenoles que se acumulan en la respuesta inicial a la infección se ignora de manera frecuente, simplemente se asume su presencia en forma inespecífica por pruebas de histoquímica o microscopía de fluorescencia (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

Potasio ( $K^+$ ) es uno de los factores principales en el mecanismo de apertura de los estomas (Zhang y Davies, 1986), por lo tanto cualquier disminución en las concentraciones de este ión pudieran desembocar en alteraciones en el funcionamiento de los estomas. Sin embargo, a pesar de que se encontraron niveles más bajos de  $K^+$  en extractos de palmas enfermas en comparación con extractos de palmas sanas, en las primeras se observó en grado 3 un pico en las concentraciones de este ión, incluso rebasa los niveles de palmas sanas. La disminución en la concentración de  $K^+$  en las palmas enfermas se podría deber a las lesiones y alteraciones presentadas en la raíz de las palmas enfermas de AL (Islas-Flores *et al.*, 1998). Las altas concentraciones de  $K^+$  presentes en el grado 3 de la enfermedad no se justifican con los argumentos anteriores. Por ello es necesario realizar estudios más elaborados para determinar el comportamiento de este ión durante el desarrollo de la enfermedad, esto es medir el comportamiento de este ión directamente en la célula guarda.

Estudios recientes indican que los azúcares (principalmente sacarosa), pueden jugar un papel en el control estomático, específicamente en el mantenimiento del turgor de la célula guarda durante el transcurso del día, para mantener al estoma abierto (Amodeo *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados del presente capítulo, en cuanto a la concentración de azúcares en los extractos explican el cierre de los estomas en las palmas afectadas por AL. Otros autores han reportado un aumento en las concentraciones de azúcares reductores y sacarosa, así como una disminución en el contenido de almidón en palmas enfermas de AL en comparación con palmas sanas, concluyendo que esta fenómeno sea el resultado de un desequilibrio en el metabolismo de los

carbohidratos (Chen, 1966). Lo único notable de los presentes resultados es que las concentraciones de azúcares se muestran de manera más constante en palmas sanas, ya que cuando la palma se enferma se observan irregularidades en cuanto a su contenido. También estos resultados requieren pruebas más específicas para la detección de ciertos azúcares en particular, así como su localización dentro de la célula.

La conductividad y osmolalidad de los extractos acuosos de palmas sanas y enfermas nos podrían indicar, de manera preliminar, un posible desbalance fisicoquímico en la hoja; esto es la presencia de compuestos y sustancias que pudieran afectar el potencial osmótico de la hoja o algún desequilibrio iónico que, en ambos casos, pudieran estar afectando la apertura estomática de las palmas enfermas de AL. Pero los resultados obtenidos tampoco muestran explicación alguna al cierre de estomas en las palmas enfermas.

Se requieren pruebas específicas para la detección y cuantificación de sustancias tóxicas o no que pudieran estar afectando la osmolaridad de la hoja (Daniels, 1983; Bittisnich *et al.*, 1987). Todo esto junto con el seguimiento de ciertos minerales, como nitrógeno (N) y fósforo (P), que cuando se presentan deficiencias de los mismos, tienen la capacidad de disminuir la conductancia estomática de las plantas afectadas (Radin *et al.*, 1982; Radin, 1984).

## BIBLIOGRAFIA

- Amodeo, G.; L. Talbott; E. Zeiger. 1996.** Use of potassium and sucrose by onion guard cells during a daily cycle of osmoregulation. *Plant Cell Physiol.* 37: 575-579.
- Bernfeld, P. 1955.** *Methods Enzymol.* 1: 149-158.
- Bittisnich, D.; L. Entwisle; T. Neales. 1987.** Acid-induced opening in *Vicia faba* L. and the role of guard cell elasticity. *Plant Physiol.* 85: 554-557.
- Buyse, J.; R. Merckx. 1993.** An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J Exp Bot.* 44: 1627-1629.
- Chen, R.A. 1966.** Nutritional aspects of lethal yellowing in coconuts. *Trop Agric, Trin.* 43: 211-218.
- Daniels, M. 1983.** Mechanisms of spiroplasma pathogenicity. *Ann Rev Phytopathol.* 21: 29-43.
- Eden-Green, S. 1976.** Root symptoms in coconut palms affected by lethal yellowing disease in Jamaica. *FAO PI Prot Bull.* 24: 119-122.
- Eden-Green, S.J.; H. Watters. 1982.** Collection and properties of phloem sap from healthy and lethal yellowing-diseased coconut palms in Jamaica. *Phytopathol.* 72: 667- 672.
- Eskafi, F.; H. Basham; R. McCoy. 1986.** Decreased water transport in lethal yellowing-diseased coconut palms. *Trop Agric.* 63: 225-228.
- Gollan, T; U. Schurr; E.D. Schulze. 1992.** Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. 1.

The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylem sap. *Plant, Cell and Environ.* 15: 551-559.

- Halloin, J. 1994.** Localization of phenolic compounds in crowns and roots of healthy and *Rhizoctonia solani*-infected sugar beets. *Plant Sci.* 99: 223-228.
- Hartung, W.; J. Radin; D. Hendrix. 1988.** Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. Role of the apoplastic pH. *Plant Physiol.* 86: 908-913.
- Kurosaki, F.; N. Tashiro; A. Nishi. 1986.** Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Plant Cell Physiol.* 27: 1587-1591.
- Nicholson, R.; R. Hammerschmidt. 1992.** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol.* 30: 369-389.
- Neemann, G.; A. van der Kerk; M. Niessen; K. Versluis. 1991.** Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. *Physiol Mol Plant Pathol.* 38: 417-432.
- Islas-Flores, I.; J.M. Santamaría; I. Córdova; C. Oropeza. 1988.** Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera* L.) affected by Lethal Yellowing. Submitted to *Journal of Plant Physiology*.
- Plumbe, A.; C. Willmer. 1986.** Phytoalexins, water-stress and stomata. II. The effects of phytoalexins on stomatal responses in epidermal strips and on guard cell protoplasts. *New Phytol.* 102: 375-384.
- Premachandra, G.; H. Saneoka; K. Fujita; S. Ogata. 1992.** Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *J Exp Bot.* 43: 1569-1576.
- Radin, J. 1984.** Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiol.* 76: 392-394.
- Radin, J.; L. Parker; G. Guinn. 1982.** Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. *Plant Physiol.* 70: 1066-1070.
- Swain, T.; W. Hillis. 1959.** The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric.* 10: 63-68.
- Zhang, J.; W. Davies. 1986.** Chemical and hydraulic influences on the stomata of flooded plants. *J Exp Bot.* 37: 1479-1491.

## Capítulo 4

### Conclusiones generales y perspectivas

#### CONCLUSIONES GENERALES

##### ABA en AL

Debido a las evidencias que confirman al ABA como el principal regulador de la apertura estomática en diversas clases de estrés abióticos (Zhang *et al.*, 1987; Davies y Zhang, 1991; Schurr *et al.*, 1992), se pensó inicialmente que este fitoregulador podría ser el causante del cierre anormal de estomas en palmas de coco enfermas de AL.

A pesar de que se muestra un incremento en los niveles de ABA tanto en hoja como en savia, este se presenta en los grados avanzados de la enfermedad, no justifica el cierre temprano de los estomas ya que este se presenta a partir del grado 1 de enfermedad, corroborando los datos obtenidos por León *et al.* (1996) (Fig. 4.1). El incremento que se presenta en savia podría ser resultado de el aumento en la concentración de ABA en la hoja debido principalmente a que es en esos grados de enfermedad cuando el potencial hídrico de la hoja comienza a verse afectado (a partir del grado 5 de la enfermedad) (León *et al.*, 1996).

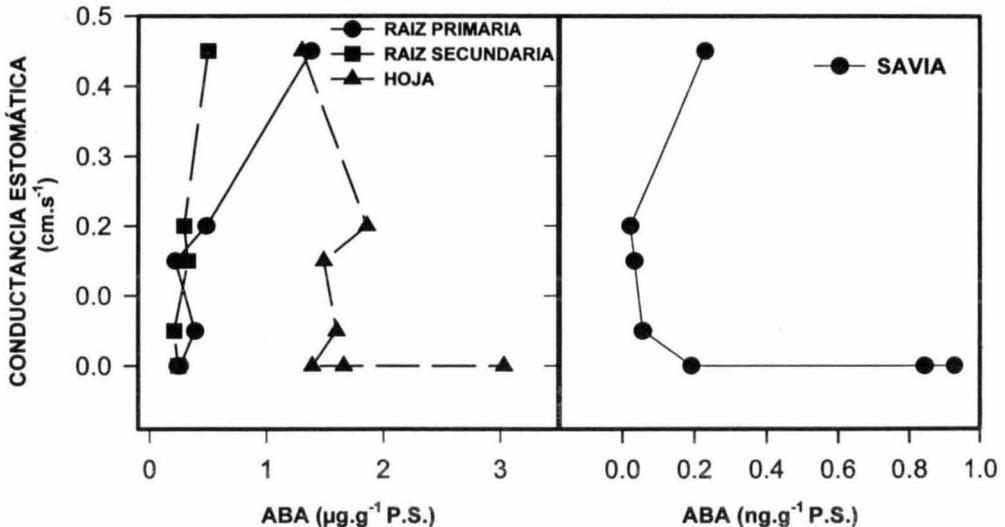


Figura 4.1. Comparación entre las concentraciones de ABA endógeno presentes en diversas partes de la palma de coco: a) raíces (primarias y secundarias) y hojas; y b) savia de xilema, y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas (grado 0, 0.45 cm.s<sup>-1</sup>) como enfermas de amarillamiento letal (AL) (grado 1, 0.2 cm.s<sup>-1</sup>; grado 2, 0.15 cm.s<sup>-1</sup>; grado 3, 0.05 cm.s<sup>-1</sup>; grado 4, 5 y 6 aprox. 0 cm.s<sup>-1</sup>) (Modificado de León *et al.*, 1996).

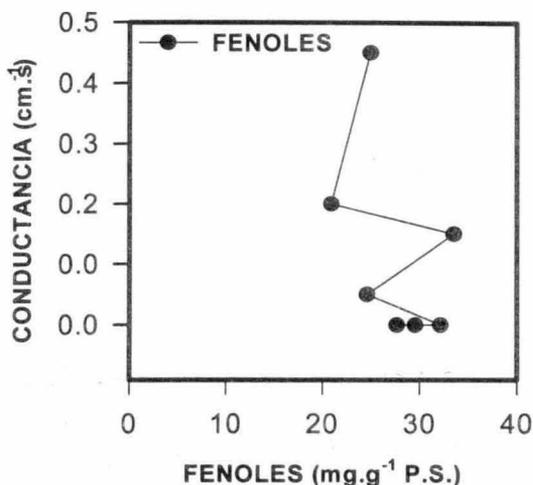
Por lo tanto, es de esperarse que este incremento de ABA en savia se deba principalmente a la hoja y no a la raíz, ya que en raíces a parte de no verse afectadas (raíces secundarias) inclusive llegan a disminuir sus concentraciones de ABA en raíces primarias. Este comportamiento se explicaría por las lesiones y cambios bioquímicos y fisiológicos (disminución en la tasa de respiración y en el contenido de azúcares) reportadas en raíces antes de la aparición de cualquier síntoma visual de la enfermedad (Islas-Flores *et al.*, 1998). Este fenómeno podría afectar el metabolismo de las raíces, al grado de alterar la síntesis, e incluso provocar la degradación, de ABA.

Adicionalmente, es posible que los extractos de hoja de coco pueden contener algunos factores que de manera natural tienen la capacidad de cerrar los estomas, tanto en hojas de coco, como en otras especies.

Los resultados de esta tesis nos indican que el contenido de ABA no se encuentra directamente involucrado en el cierre anormal de estomas en palmas de coco con AL. Esto nos lleva a considerar otras posibilidades, como la acción de otro fitorregulador. Anteriormente, Dabek y Hunt (1976) y León *et al.* (1996), llevaron a cabo experimentos para determinar la posible participación de un desequilibrio hormonal en el desarrollo de la sintomatología del AL. Dabek y Hunt (1976) demostraron que las pinnas de coco enfermas de AL expuestas a ácido giberélico aumentaban su longevidad, así como mantenían el color verde en las hojas tratadas hasta lograr un ligero reverdecimiento en las pinnas amarillas. También trataron a las pinnas enfermas de AL con cinetina, logrando un reverdecimiento localizado en zonas cercanas a la nervadura principal, pero al aplicarlo en forma conjunta con ácido indol acético, el reverdecimiento se extendió a lo largo de toda la pinna tratada. Se discute que estos resultados podrían ser evidencia de que algún desequilibrio hormonal está ocurriendo en las palmas enfermas de AL, provocando el desarrollo de su sintomatología característica, sin embargo los niveles endógenos de estos fitoreguladores en palmas sanas como en palmas enfermas deben ser determinados antes de poder sugerir que el cierre anormal de estomas en AL se debe a un desequilibrio hormonal.

### **Compuestos fenólicos en AL**

Se ha reportado que un mecanismo de defensa en las plantas contra el ataque microbiano es la acumulación de compuestos fenólicos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Halloin, 1994). A pesar de que las palmas afectadas con AL no muestran acumulación de dichos compuestos fenólicos comparadas con palmas sanas, con estas pruebas preliminares no es posible descartar que estas sustancias se involucren en la defensa de la palma, y por lo tanto afecten la conductancia estomática de estas palmas enfermas (Plumbe y Willmer, 1986) (Fig.4.2).



**Figura 4.2.** Comparación entre la concentración de fenoles solubles presentes en extracto de hoja de palmas de coco y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas (grado 0, 0.45 cm.s<sup>-1</sup>) como enfermas de amarillamiento letal (AL) (grado 1, 0.2 cm.s<sup>-1</sup>; grado 2, 0.15 cm.s<sup>-1</sup>; grado 3, 0.05 cm.s<sup>-1</sup>; grado 4, 5 y 6 aprox. 0 cm.s<sup>-1</sup>) (Modificado de León *et al.*, 1996).

Para verificar estos resultados es necesario realizar pruebas más contundentes en la determinación de estos compuestos, como son técnicas histoquímicas o el seguimiento durante la enfermedad de algunos fenoles en particular, por ejemplo, la betagarina o la betavulgarina, relacionados como fenoles de defensa contra hongos en *Beta vulgaris L.* (Halloin, 1994) o ácidos benzoicos y fenilpropanoides (Kurosaki *et al.*, 1986; Neemann *et al.*, 1991). Desafortunadamente, la identidad de los fenoles que se acumulan en la respuesta inicial a la infección se ignora de manera frecuente, simplemente se asume su presencia en forma inespecífica por pruebas de histoquímica o microscopía de fluorescencia (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

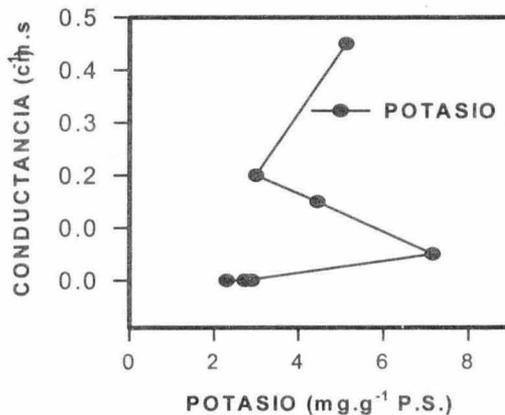
### Condiciones nutricionales en AL

Un desbalance iónico producido por deficiencia en la absorción (lesiones en raíces) o su transporte (disminución de flujo en xilema) de nutrientes (Dabek y Hunt, 1976), puede también ser uno de los factores que estén afectando la conductancia estomática de las palmas enfermas de AL. Realizando un estudio nutricional, Chen (1966), ha determinado que las palmas afectadas por esa enfermedad presentan niveles bajos en las concentraciones de boro, sugiriendo que esto pueda ser la causa de las alteraciones fisiológicas que ocurren en las flores, ya que se ha propuesto que el boro juega un papel primordial en el

metabolismo y translocación de los carbohidratos dentro de las plantas. Se ha sugerido (Gauch y Dugger, 1953) que el complejo azúcar-ácido bórico esta más disponible para translocar la membrana celular que las formas no ionizadas. Sin embargo, McIlrath y Palser (1956) proponen que el efecto del boro es secundario, los desajustes en la translocación de los azúcares son causados por la necrosis del floema en plantas deficientes en boro. Gradualmente, de manera especulativa, sería de gran importancia el estudio más complejo y secuenciado de las condiciones nutricionales de las palmas enfermas de AL durante el transcurso de su sintomatología, así como de las posibles inferencias de esas alteraciones en el desarrollo de los síntomas.

Adicionalmente, se realizaron pruebas para determinar si las pinnas de palmas enfermas de AL presentaban algún tipo de respuesta al incubarlas en presencia de cobre, cinc y hierro, resultando en un incremento en longevidad y reverdecimiento de las pinnas amarillas (Dabek y Hunt, 1976). Lo anterior sugiere que las pinnas de palmas enfermas de AL sufren de una deficiencia en los niveles de dichos nutrientes, lo cual no concuerda con los datos obtenidos por Chen (1966), donde no se encontró diferencias alguna en cuanto al contenido de esos nutrientes en palmas enfermas de AL en comparación con palmas sanas.

Por otra parte se ha determinado que potasio ( $K^+$ ) es uno de los factores primordiales en la apertura de los estomas (Zhang y Davies, 1986), por lo tanto cualquier diferencia en las concentraciones, debido a una inadecuada absorción o transporte de este ión en palmas enfermas de AL, puede desembocar en alteraciones en el funcionamiento de sus estomas. Las concentraciones de  $K^+$  en extractos acuosos de hoja tampoco explican el cierre de estomas anormal de las palmas enfermas de AL (Fig. 4.3).



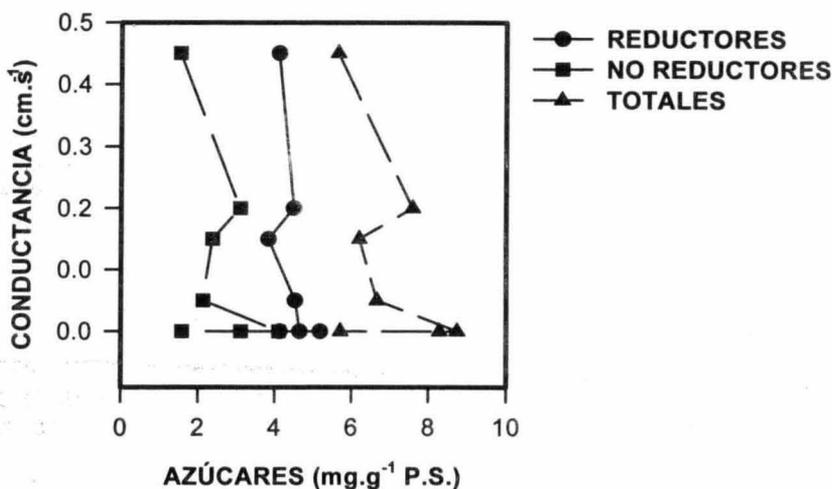
**Figura 4.3.** Comparación entre la concentración de potasio presente en extracto de hoja de palmas de coco y la conductancia estomática, tanto en plantas sanas (grado 0, 0.45 cm.s<sup>-1</sup>) como enfermas de amarillamiento letal (AL) (grado 1, 0.2 cm.s<sup>-1</sup>; grado 2, cm.s<sup>-1</sup>; grado 3, 0.05 cm.s<sup>-1</sup>; grado 4, 5 y 6 aprox. 0 cm.s<sup>-1</sup>) (Modificado de León *et al.*, 1996).

No obstante de que se muestran niveles más bajos de  $K^+$  en extractos de las palmas enfermas en comparación con extractos de las palmas sanas, en las primeras se muestra en grado 3 un pico en las concentraciones de este mineral, incluso rebasa los niveles de palmas sanas. La disminución en la concentración de  $K^+$  en las palmas enfermas se explica de acuerdo a la disminución en el transporte de xilema (Eskafi *et al.*, 1986) o por las lesiones y alteraciones presentadas en la raíz de las palmas enfermas de AL (Islas-Flores *et al.*, 1998); sin embargo, las altas concentraciones de  $K^+$  presentes en el grado 3 de la enfermedad no se justifican con los argumentos anteriores. Por ello es necesario realizar estudios más elaborados para determinar el comportamiento de este ión durante el desarrollo de la enfermedad, esto es medir cualquier cambio de este ión directamente en la célula guarda.

La conductividad los extractos acuosos de palmas sanas y enfermas nos podrían indicar, de manera preliminar, un posible desbalance fisicoquímico en la hoja; esto es algún desequilibrio iónico que pudiera estar afectando la apertura estomática de las palmas enfermas de AL. Pero los resultados obtenidos tampoco muestran explicación alguna al cierre de estomas en las palmas enfermas. De manera alternativa, se puede proponer el seguimiento de iones específicos que pudieran estar afectando la conductancia estomática de las palmas enfermas de AL. Por ejemplo, la determinación de ciertos minerales, como nitrógeno (N) y fósforo (P), que cuando se presentan deficiencias de los mismos, tienen la capacidad de disminuir la conductancia estomática de las plantas afectadas (Radin *et al.*, 1982; Radin, 1984).

### **Azúcares en AL**

Estudios recientes indican que los azúcares (principalmente sacarosa), pueden jugar un papel en el control estomático, específicamente en el mantenimiento del turgor de la célula guarda durante el transcurso del día, para mantener al estoma abierto (Amodeo *et al.*, 1996). Sin embargo, tampoco los datos preliminares obtenidos en cuanto a la concentración de azúcares en los extractos explican el cierre de los estomas en las palmas afectadas por AL (Fig. 4.4).



**Figura 4.4.** Comparación entre la concentración de azúcares solubles presentes en extracto de hoja de palmas de coco y la conductancia estomálica, tanto en plantas sanas (grado 0, 0.45 cm.s<sup>-1</sup>) como enfermas de amarillamiento letal (AL) (grado 1, 0.2 cm.s<sup>-1</sup>; grado 2, 0.15 cm.s<sup>-1</sup>; grado 3, 0.05 cm.s<sup>-1</sup>; grado 4, 5 y 6 aprox. 0 cm.s<sup>-1</sup>) (Modificado de León *et al.*, 1996).

Otros autores han reportado un aumento en las concentraciones de azúcares reductores y sacarosa, así como una disminución en el contenido de almidón en palmas enfermas de AL en comparación con palmas de sanas, concluyendo que esta fenómeno sea el resultado de un desequilibrio en el metabolismo y translocación de los carbohidratos, lo cual es atribuido a una deficiencia en los niveles de boro presentes en la fronda (Chen, 1966). Lo único notable de los presentes resultados es que las concentraciones de azúcares se muestran de manera más constante en palmas sanas, ya que cuando la palma se enferma se observan irregularidades en cuanto a su contenido. También estos resultados requieren pruebas más específicas para la detección de ciertos azúcares en particular, así como su localización dentro de la célula guarda.

## POSIBLES ALTERNATIVAS

### Toxinas y compuestos no específicos en AL

De manera indicativa, no puede ignorarse la existencia y la acción de alguna toxina producida por el patógeno (Douglas, 1976; Kirkpatrick, 1986), la cual pudiera estar afectando la conductancia estomálica de las palmas enfermas. Se ha determinado que el síntoma más característico de plantas infectadas por

fitoplasmas (AL en cocotero, declinación de la pera, necrosis del floema en olmo, etc.) es una clorosis severa en la hoja, avanzando de las hojas más viejas hacia las hojas más nuevas, siendo muy raro encontrar fitoplasmas en esas regiones. Lo anterior sugiere que la clorosis puede ser causada por algún factor tóxico difusible producido por resultado de la infección de los fitoplasmas (Schneider, 1973). Al mismo tiempo, la observación de que las regiones necróticas en tubos cribosos del floema pueda contener o no fitoplasmas, apoyan la hipótesis de que metabolitos tóxicos puedan ser factores importantes en el desarrollo de la enfermedad (Douglas, 1976; Kirkpatrick, 1986).

A pesar de que no se han obtenido toxinas de plantas infectadas por fitoplasmas, se han aislado sustancias tóxicas de bajo peso molecular de filtrados de cultivo de *Spiroplasma citri* (agente causal de la enfermedad de endurecimiento de los cítricos, calificada como enfermedad "tipo amarillamiento") (Daniels, 1983).

A pesar de que esos resultados sugieren que algunos mollicutes patógenos pueden producir sustancias tóxicas, algunos de los cambios fisiológicos observados en las plantas infectadas pueden ser resultado de la acumulación de compuestos metabólicos de desecho no específicos producidos por el patógeno (Daniels, 1983).

Por ejemplo, algunas especies de spiroplasmas producen cantidades significantes de ácido láctico. Sin embargo, la osmolalidad de los extractos acuosos de palmas sanas y enfermas no nos indican, de manera preliminar, un posible desbalance fisicoquímico en la hoja, la presencia de compuestos y sustancias que afectarían el potencial osmótico de la hoja pudieran estar alterando la apertura estomática de las palmas enfermas de AL. Se requieren pruebas específicas para la detección y cuantificación de sustancias tóxicas o no que pudieran estar afectando la osmolalidad de la hoja (Daniels, 1983; Bittisnich *et al.*, 1987).

De igual manera, la gran cantidad de fitoplasmas observados en algunas regiones del floema sugieren que se pueden estar desechando productos que pudieran alterar el pH de las células infectadas (Daniels, 1983). Eso se verificó en palmas afectadas por el AL, donde se determinó el pH de los extractos acuosos de fronda (Chen, 1966), encontrándose una ligera disminución en el pH del extracto de hoja de las palmas enfermas (pH=5.21) en comparación con hojas de palmas sanas (pH=5.26).

### **Otros antitranspirantes en AL**

Existen evidencias que destacan la posible existencia de otros compuestos con la capacidad de inhibir la transpiración (Munns y King, 1988; Trejo y Davies, 1991). Munns y King (1988), trabajando con *Triticum aestivum* L., reportan que savia colectada de plantas sometidas a estrés hídrico son capaces de reprimir la transpiración en un 60 %, con una concentración de ABA de  $5 \times 10^{-8}$  M. Sin embargo, para emular dichos efectos, se necesitó  $5 \times 10^{-6}$  M de ABA sintético,

además, una vez que se eliminó el ABA de la savia de las plantas en estrés hídrico (pasando a la savia a través de una columna de inmunoafinidad contra ABA), está siguió conservado su capacidad de inhibir la transpiración. Ellos sugieren que existe otro elemento con la función "antitranspirante".

Trejo y Davies (1991) indican que en cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., el suelo sometido a sequía provoca un pequeño aumento en los niveles de ABA en raíces, pero al tiempo en que se presenta el cierre de los estomas, este incremento de ABA aún no alcanza a ser detectado tanto en savia de xilema como en hoja. El mecanismo de respuesta estomática es sugerida en términos de la existencia de un regulador de la conducta estomática aún no identificado.

## PERSPECTIVAS

Debido a los resultados obtenidos en esta tesis y a las referencias presentadas a lo largo de este documento se puede esperar que los primeros pasos a seguir en la búsqueda por encontrar el ó los factores que pudieran estar determinando este cierre de estomas anormal en las palmas de coco enfermas de AL son, principalmente:

a) determinación durante el transcurso de la enfermedad de la concentración endógena de algunas de las otras hormonas que se ha demostrado pueden tener alguna ingerencia en este fenómeno, por ejemplo ácido giberélico, ácido indol acético y citocininas. Así como la aplicación de las hormonas antes mencionadas en pinnas de palmas enfermas, para ver si se pueden abrir sus estomas, y por lo tanto poder deducir si el fenómeno es permanente o reversible.

b) la detección de sustancias tóxicas o no, fisiológicamente activas, producidas por el fitoplasma, que pudieran estar afectando la conducta estomática de las palmas enfermas de AL.

c) especificar las condiciones nutricionales de las palmas afectadas por AL, en especial aquellos iones que pudieran afectar directamente la conducta estomática (p.e., potasio, principal promotor de la apertura estomática), indirectamente (p.e., nitrógeno y fosforo, las cuales al presentarse deficiencias en su contenido tienen la capacidad incrementar la sensibilidad de la célula guarda hacia ABA) o que pueda tener alguna implicación metabólica con el potencial osmótico de la hoja, afectando la estabilidad del estoma.

Es de primordial importancia tratar de entender el mecanismo de acción de la enfermedad, esto con el fin de establecer estrategias que pudieran tratar de detener la enfermedad o para obtener variedades resistentes.

## BIBLIOGRAFIA

- Amodeo, G.; L. Talbott; E. Zeiger. 1996.** Use of potassium and sucrose by onion guard cells during a daily cycle of osmoregulation. *Plant Cell Physiol.* 37: 575-579.
- Bittisnich, D.; L. Entwisle; T. Neales. 1987.** Acid-induced opening in *Vicia faba* L. and the role of guard cell elasticity. *Plant Physiol.* 85: 554-557.
- Chen, R.A. 1966.** Nutritional aspects of lethal yellowing in coconuts. *Trop Agric, Trin.* 43: 211-218.
- Dabek, A.J.; P. Hunt. 1976.** Biochemistry of leaf senescence in coconut lethal yellowing, a disease associated with micoplasma-like organism. *Trop Agric.* 53: 115-123.
- Daniels, M. 1983.** Mechanisms of spiroplasma pathogenicity. *Ann Rev Phytopathol.* 21: 29-43.
- Davies, W.J.; J. Zhang. 1991.** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol.* 42: 55-76.
- Douglas, S.M. 1976.** Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokeberry with X-disease by fluorescence microscopy. *Phytopathol.* 76: 784-787.
- Eskafi, F.M.; H.G. Basham; R.E. McCoy. 1986.** Decreased water transport in lethal yellowing-diseased coconut palms. *Trop Agric.* 63: 225-228.
- Gauch, H. and W. Dugger. 1953.** The role of boron in the translocation of sucrose. *Plant Physiol.* 28: 457-466.
- Halloin, J. 1994.** Localization of phenolic compounds in crowns and roots of healthy and *Rhizoctonia solani*-infected sugar beets. *Plant Sci.* 99: 223-228.
- Islas-Flores, I.; J.M. Santamaría; I. Cordova; C. Oropeza. 1998.** Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera* L.) affected by lethal yellowing. *J Plant Physiol.* In press.
- Kirkpatrick, B.C. 1986.** Characteristics of western X-disease mycoplasma-like organisms. PhD thesis. University of California, Berkeley.
- Kurosaki, F.; N. Tashiro; A. Nishi. 1986.** Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Plant Cell Physiol.* 27: 1587-1591.
- León, R.; J. Santamaría; L. Alpizar; J.A. Escamilla y C. Oropeza. 1996.** Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytol.* 134: 227-234.
- McIlrath, W. and B. Palser. 1956.** Responses of tomato, turnip and cotton to variations in boron nutrition. *Bot Gaz.* 118: 43-52.
- Munns, R.; R. King. 1988.** Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. *Plant Physiol.* 88: 703-708.
- Neemann, G.; A. van der Kerk; M. Niessen; K. Versluis. 1991.** Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. *Physiol Mol Plant Pathol.* 38: 417-432.

- Nicholson, R.; R. Hammerschmidt. 1992.** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol.* 30: 369-389.
- Plumbe, A.; C. Willmer. 1986.** Phytoalexins, water-stress and stomata. II. The effects of phytoalexins on stomatal responses in epidermal strips and on guard cell protoplasts. *New Phytol.* 102: 375-384.
- Radin, J. 1984.** Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiol.* 76: 392-394.
- Radin, J.; L. Parker; G. Guinn. 1982.** Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. *Plant Physiol.* 70: 1066-1070.
- Schneider, H. 1973.** Cytological and histological aberrations in woody plants following infection with viruses, mycoplasmas, rickettsias, and flagellates. *Ann Rev Phytopathol.* 11: 119-146.
- Schurr, U.; T. Gollan; E.D. Schulze. 1992.** Stomatal response to drying soil in relations to changes in xilem sap composition of *Heliantus annus* L. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xilem sap. *Plant Cell Environ.* 15: 561-567.
- Trejo, C.; W. Davies. 1991.** Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xilem ABA concentration. *J Exp Bot.* 42: 1507-1515.
- Zhang, J.; U. Schurr; W.J. Davies. 1987.** Control of stomatal behaviour by Abscisic Acid which apparently originates in roots. *J Exp Bot.* 38: 1174-1181.
- Zhang, J.; W. Davies. 1986.** Chemical and hydraulic influences on the stomata of flooded plants. *J Exp Bot.* 37: 1479-1491.

