DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN DE PALMAS DE COCO RESISTENTES A AMARILLAMIENTO LETAL

INFORME FINAL

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN

DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN DE PALMAS DE COCO RESISTENTES A AMARILLAMIENTO LETAL

Proyecto (Ref. CONACYT 2220P-B)

Informe final

Participantes:

Rolando Cardeña López

Roger Ashburner Lowson

Carlos Oropeza Salín

Jorge Santamaría Fernández

Iván Córdova Lara

Ligia Brito Argáez

María Narváez Cab

Sergio Martínez Aguirre

Mérida, Yucatán, México

Junio de 1999

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde fines del siglo XIX, la aparición y dispersión de la enfermedad conocida como amarillamiento letal (AL) ha arrasado con el cultivo del cocotero en países de África y América. La única alternativa disponible actualmente para hacer frente a los efectos de esta devastadora enfermedad es replantar las áreas afectadas con materiales resistentes. Esta situación ha determinado que la selección de germoplasma de cocotero resistente al AL se haya convertido en un objetivo central de los programas de mejoramiento y conservación de esta especie (Been, 1995).

México es el principal país productor de cocotero en el continente americano, y uno de los más importantes a nivel mundial (Oropeza and Zizumbo, 1997). La dispersión del AL a nivel nacional ha arrasado las plantaciones de cocotero en la zona del Golfo de México, y su reciente aparición en la costa del Pacífico representa una seria amenaza para las principales zonas productoras del país.

El desconocimiento de marcadores de resistencia al AL es un factor que limita la selección de germoplasma de cocotero resistente a la enfermedad. Esta situación se ve agravada por la falta de métodos para transmitirla en una forma controlada. Actualmente, la selección de palmas de coco resistentes al AL implica el establecimiento de plantaciones experimentales en áreas afectadas, en las cuales se espera que ocurra la transmisión natural de la enfermedad. Esta estrategia es efectiva, pero lenta y costosa. Adicionalmente, presenta la desventaja de que no permite determinar si las palmas sobrevivientes son realmente resistentes, o si simplemente escaparon a la infección. Su aplicación en Jamaica ha llevado a plantear que se necesitan al menos 15 años para obtener resultados confiables (Been, 1981). Tal período es inaceptable en el contexto de un programa de mejoramiento, por lo que el establecimiento de una metodología para la selección de palmas de coco resistentes al AL se presenta como una prioridad para el mejoramiento de este cultivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Efectuar análisis orientados a identificar marcadores bioqímicos, fisiológicos y genéticos que estén asociados con resistencia al AL en el cocotero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Realizar análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) orientados a identificar marcadores asociados con resistencia al AL.

2. Efectuar estudios encaminados a determinar la posible participación de diferentes mecanismos bioquímicos y fisiológicos de resistencia a enfermedades en plantas, en la respuesta de palmas de coco ante la infección por el AL.

3. Formar recursos humanos mediante la dirección de una tesis de licenciatura, una de maestría y una de doctorado.

4. Publicar los resultados del proyecto en trabajos arbitrados de nivel internacional.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se siguieron en forma paralela diseños experimentales centrados en los siguientes temas:

1. Identificación de marcadores genéticos de resistencia.
2. Exploración del nivel del proceso de infección en el cual se manifiesta la resistencia.
3. Análisis de cambios fisiológicos asociados a la enfermedad.

Dentro de tales temas, las estrategias seguidas fueron como a continuación se describen:

MARCADORES GENÉTICOS.

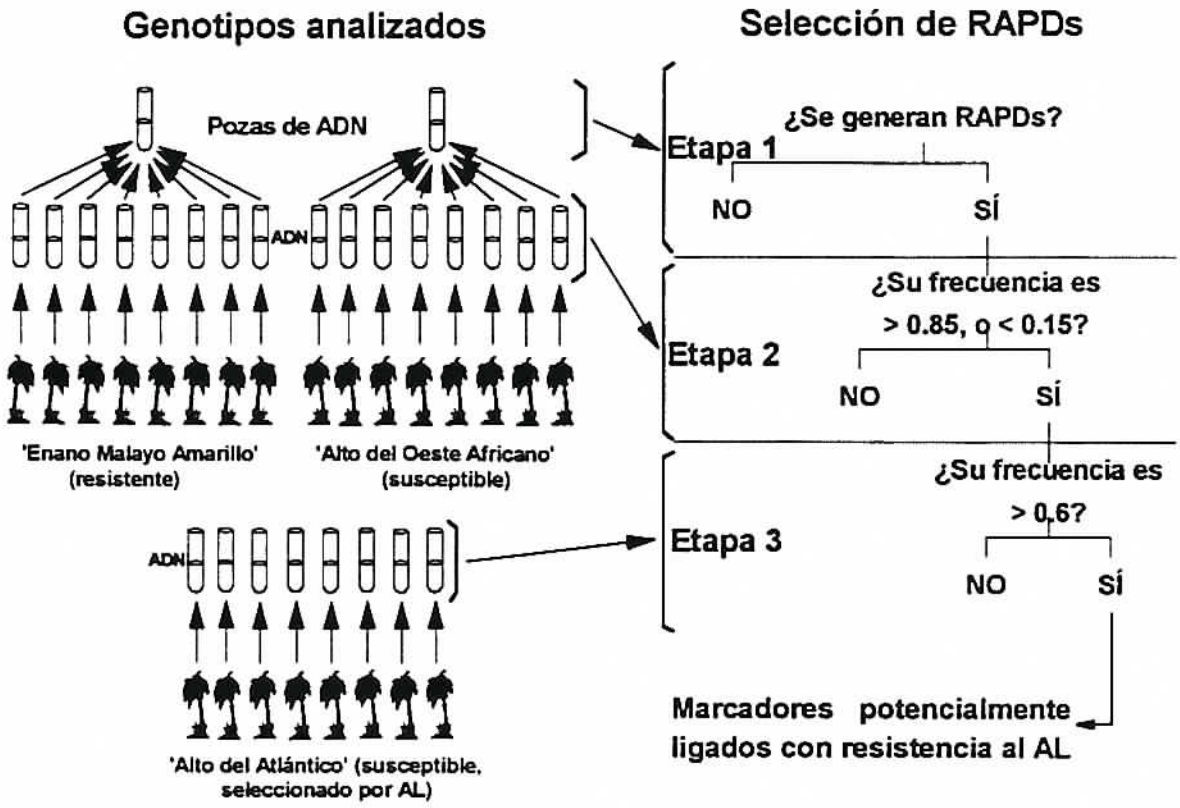
Se siguió un esquema de sustracción genética, en el cual se aplicó la técnica RAPD para identificar marcadores cuya distribución fuese como a continuación se indica:

1) Presentes en la poza de ADN de una población resistente, y ausentes en la de una población susceptible.

2) Presentes en frecuencias no menores que 0.85 en la población resistente, y no mayores que 0.15 en la susceptible.

3) Presentes en frecuencias no menores que 0.6 en una segunda población susceptible, la cual haya sido seleccionada en el campo en base a su sobrevivencia al AL, y sea genéticamente similar a la población susceptible inicial.

Los RAPDs así seleccionados se consideraron como potencialmente ligados con resistencia al AL. La estrategia seguida se esquematiza a continuación.



NIVEL DE EXPRESIÓN DE LA RESISTENCIA.

La estrategia propuesta contempló los siguientes análisis:

1) Diagnóstico por PCR de la presencia del patógeno en plantas resistentes (Enano Malayo) que hubieran estado expuestas al AL. Si los análisis son positivos, se consideraría que su sobrevivencia está mediada por mecanismos que les permiten tolerar cierto nivel de multiplicación del patógeno. En caso negativo, se consideraría que su resistencia actúa a nivel de mecanismos que impiden la inoculación del patógeno, o su dispersión después de la inoculación, y se desarrollarían los siguientes análisis.

2) Ensayos orientados a comparar la capacidad de síntesis de calosa en hojas (posible

sitio de inoculación) de plantas resistentes y susceptibles. Si tal capacidad es mayor en las plantas resistentes, se consideraría que esta respuesta fisiológica posiblemente actúe impidiendo la dispersión del patógeno posteriormente a su inoculación, y por lo tanto constituiría un marcador fisiológico potencialmente aplicable en la identificación de plantas resistentes.

FISIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

Para elucidar el posible papel de diferentes parámetros en el modo de acción del AL, específicamente en el cierre anormal de estomas que se observa desde las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad, se efectuaron los siguientes análisis:

1) Cuantificación de ácido abscísico (ABA) en savia de xilema, hojas y raíces, durante el desarrollo de los síntomas del AL.

2) Conductividad, osmolaridad y concentración de fenoles solubles, K^- y azúcares solubles, en extractos de hojas de palmas sanas y enfermas.

3) Búsqueda de compuestos presentes en hojas de palmas enfermas que provoquen cierre estomático, mediante la evaluación de extractos de éstas en dos modelos experimentales:

i) Segmentos de hoja de palmas de coco sanas.

ii) Epidermis desprendidas de *Commelina communis* L.

PARTICIPANTES

Responsable[a]	Áreas de trabajo		
	Marcadores genéticos	Nivel de expresión de la resistencia	Fisiolo enfer
Roger Ashburner L.[b]	Roger Ashburner L.[b]	Roger Ashburner L.[b]	Carlos Or
Rolando Cardeña L.[f]	Rolando Cardeña L.[f]	Iván Córdova L.[c]	Jorge Sant
		Ligia Brito A.[c]	Sergio Ma
		Rolando Cardeña L.[f]	
		María Narváez C.[d]	

[a]El Dr. R. Ashburner regresó a su país natal al finalizar el contrato por el cual ingresó al CICY; [b]Investigador; [c]Técnico; [d]Estudiante de licenciatura; [e]Estudiante de maestría; [f]Estudiante de doctorado, eventualmente investigador y responsable del proyecto.

ANTECEDENTES, METODOLOGÍAS Y RESULTADOS

MARCADORES GENÉTICOS.

Antecedentes.

El desconocimiento de marcadores de resistencia al AL es un factor que limita la selección de germoplasma de cocotero resistente a la enfermedad. Esta situación se ve agravada por la imposibilidad de transmitir el AL en una forma controlada. Actualmente, la selección de plantas resistentes depende de la realización de pruebas de campo en las que la transmisión ocurre de forma natural. Ésto plantea importantes desventajas: 1) El tiempo requerido para que la enfermedad llegue y se disperse puede llegar a ser de muchos años; 2) el establecimiento y mantenimiento de las plantaciones es un proceso costoso y laborioso.

Se han realizado pruebas de campo orientadas a identificar germoplasma resistente al AL y enfermedades relacionadas en países tales como Jamaica (Been 1981), Tanzania (Schuiling *et al.*, 1992; Kullaya *et al.*, 1997), Ghana (Sangaré *et al.*, 1992; Dery, 1997) y México (Zizumbo *et al.*, 1999). El análisis genético a nivel molecular de genotipos de cocotero que han mostrado resistencia o susceptibilidad al AL podría permitir la identificación de marcadores que estén asociados con resistencia a esta enfermedad. Tales marcadores serían de gran utilidad en programas de mejoramiento que incluyan como objetivo la selección y propagación de germoplasma de cocotero resistente al AL.

El análisis de fragmentos de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs) es una técnica de desarrollo reciente que ha mostrado una gran utilidad para identificar en forma rápida marcadores asociados con genes de interés agronómico (Michelmore, 1991; Waugh y Powell, 1992). La técnica se basa en el uso de oligonucleótidos (decámeros o nonámeros) de secuencia al azar para reconocer, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), regiones variables dentro del genoma. Esta técnica es particularmente eficiente para identificar marcadores asociados con caracteres poligénicos, de los cuales la resistencia al AL ha sido señalada ser un caso (Ashburner y Been, 1997). En este proyecto se analizaron RAPDs en distintos genotipos de cocotero con el propósito de identificar marcadores que estén potencialmente asociados con la resistencia al AL.

Materiales y métodos.

Genotipos.

Se analizaron genotipos colectados en México, los cuales habían sido seleccionados en el campo por el AL, o no habían estado en contacto con la enfermedad. El nivel de resistencia de los genotipos de este último grupo había sido determinado en

evaluaciones previas (Been, 1981; Schuiling *et al.*, 1992; Kullaya *et al.*, 1997; Sangare *et al.*, 1992; Dery *et al.*, 1997; Zizumbo *et al.*, in press). Tales genotipos fueron el Enano Malayo Amarillo (MYD, resistente) y el Alto del Oeste Africano (WAT, susceptible). Las plantas seleccionadas por el AL provinieron de una población Alto del Atlántico (AT, susceptible) del estado de Campeche, la cual fue severamente atacada por la enfermedad durante los previos seis años (Oropeza y Zizumbo, 1997). La edad de estas plantas fue de aproximadamente 20 años, y desde dos años antes de ser colectadas su tasa de mortalidad se había mantenido en un 10 por ciento. Los registros históricos sobre el origen de la población AT analizada, así como análisis basados en morfología del fruto y variación isoenzimática, indicaron que este genotipo estaba estrechamente relacionado con el WAT (Zizumbo, 1997; Zizumbo-Villarreal y Piñero, 1998). Los genotipos MYD y WAT fueron introducidos a México en forma de semillas, a partir de una colección de germoplasma establecida por el Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) en Costa de Marfil, Africa (Manciot, 1978; Meunier, 1982). Estas plantas tuvieron aproximadamente 19 años y estaban localizadas en una estación experimental del estado de Guerrero, en donde hasta el momento no se ha detectado el AL. Además de las poblaciones anteriores, se analizaron las pozas de ADN del MYD y del WAT. Cada población contuvo 21 individuos.

Extracción de ADN.

Folíolos provenientes de hojas no senescentes fueron cortados y guardados en bolsas de polietileno dentro de una nevera con hielo durante su transporte. En el laboratorio las hojas fueron lavadas, secadas y cortadas en segmentos de 0.3 g los cuales fueron envueltos en papel aluminio y almacenados en ultracongelación (-80 °C) para su posterior extracción. La extracción se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Rogers y Bendich (1985).

Electroforesis y visualización de ADN.

La electroforesis se efectuó en geles de agarosa al 1.2 por ciento, en sistema de amortiguador TAE contínuo, a 100 V constantes. El ADN en los geles se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (100 ng/ml, 15 min de incubación y 15 min de lavado), y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Los patrones de bandeo se registraron en película Polaroid 667 (ISO 3000).

Formación de pozas de ADN.

Para cada población, el ADN de 20 palmas se extrajo y se sometió a electroforesis. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio (1 μg/ml), y la concentración relativa de ADN genómico en cada extracto se estimó visualmente mediante comparación con estándares de concentración conocida. Cada extracto se diluyó a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml. Una vez igualadas las concentraciones, las pozas genéticas se

formaron mezclando alícuotas de los extractos correspondientes a una misma población.

Amplificación de fragmentos RAPD.

Se probaron 80 decámeros (Operon Technologies; series A, B, AB y AL), usando las condiciones descritas por Banks (1994). La mezcla de reacción contuvo polimerasa taq (0.04 U/µl), dNTPs (200 µM), un decámero iniciador (1 µM), ADN muestra (10 ng/µl), y $MgCl_2$ en concentraciones que variaron según el decámero (2.5 mM para B4, B7, AB5 y AL3, 3.0 mM para B1, B11, AB3, AB4 y AB16, o 1.5 mM para los demás), en amortiguador (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3). El perfil de temperaturas usado se describe a continuación.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de repeticiones
1. Predesnaturalización	85	5	1
2 { Desnaturalización	94	1	
2 { Alineamiento	35	1	44
2 { Extensión	72	1	
3. Extensión	72	5	1

Análisis y selección de RAPDs.

Los decámeros probados durante la primera etapa del diseño experimental se clasificaron según los criterios abajo descritos. El tamaño de los RAPDs del grupo IV se estimó en base a la migración de los marcadores de una escalera de 1 kbp, mediante análisis de regresión efectuados con el programa Stat Graphics, version 5.0.

Grupo de clasificación	Tipo de fragmentos amplificados
I	Sin amplificación, o con bandas demasiado ténues para ser analizadas.
II	Con amplificación, pero sólamente de bandas monomórficas.
III	Con fragmentos polimórficos difíciles de analizar (dobletes, bandas ténues o con fondo intenso).
IV	Con fragmentos polimórficos evidentes y de fácil análisis.

Resultados.

Primera etapa: Análisis de pozas de ADN.

La Figura 1 muestra patrones de bandeo generados por decámeros de la serie A, en los que se identifican algunos fragmentos polimórficos. El análisis de los patrones de bandeo generados por los 80 decámeros probados, en base a los criterios de clasificación considerados, llevó a agruparlos como se indica en la Tabla 1. El 12.2 por ciento de los

decámeros no produjo amplificación, o dio productos apenas perceptibles (grupo I). El 31.7 por ciento generó patrones de bandeo que no pudieron diferenciar a las pozas de ADN del MYD y el WAT (grupo II). El 56.1 por ciento amplificó por lo menos una banda específica de la poza genética del MYD o del WAT (grupos III y IV). Sin embargo, se consideró que sólo 33 de éstos (grupo IV, 40.2 por ciento del total) generaron RAPDs fáciles de analizar en las etapas subsecuentes.

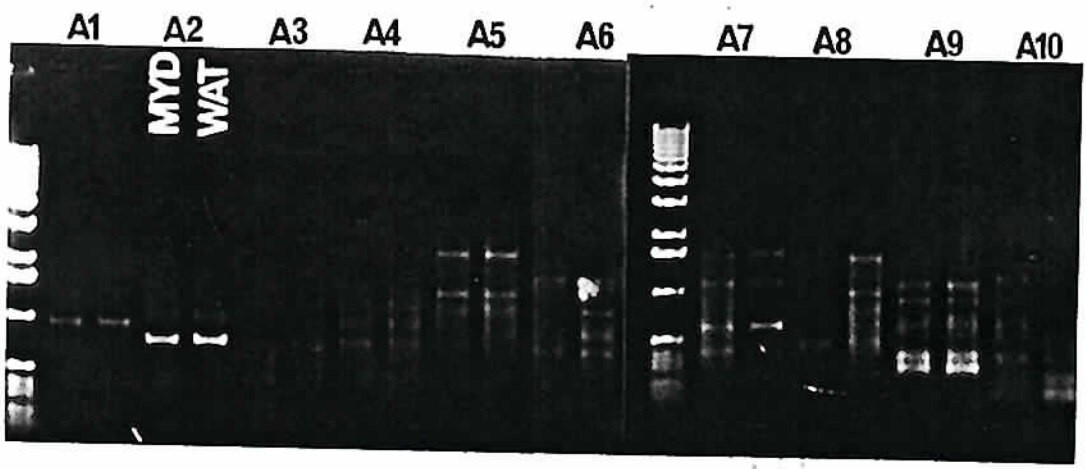


Figura 1. Patrones de bandeo generados por decámeros de la serie A. Cada par de carriles muestra, sucesivamente, los fragmentos amplificados por las pozas de ADN del Enano Malayo Amarillo (MYD) y el Alto del Oeste Africano (WAT). Los carriles marcados con M contienen los marcadores de tamaño de una escalera de ADN de 1 kbp. Los asteriscos muestran la posición de polimorfismos detectables.

Tabla 1. Decámeros asignados a cada grupo de clasificación.

Grupo	Decámeros
I	A5, A6, A12, A14, A16, A17, A19, B2, B3, AL2
II	A1, A2, A3, A4, A10, A15, A18, A20, B6, B8, B9, B12, B14, B15, B18, AB1, AB8, AB12, AB14, AB17, AL1, AL4, AL5, AL7, AL13, AL15
III	A8, A9, B10, AB5, AB6, AB7, AB9, AB10, AB11, AB15, AL6, AL10, AL17
IV	A7, A11, A13, B1, B4, B5, B7, B11, B13, B16, B17, B19, B20, AB2, AB3, AB4, AB5, AB13, AB16, AB18, AB19, AB20, AL3, AL7, AL8, AL9, AL11, AL12, AL14, AL16, AL18, AL19, AL20

La migración de los fragmentos de interés no siempre fue similar a la de los marcadores usados, por lo que su tamaño se estimó mediante análisis de regresión. La primera opción probada fue la regresión exponencial, la cual supone que una gráfica de log (tamaño) vs. distancia recorrida debe mostrar una tendencia lineal. Tales regresiones mostraron buenos ajustes, con coeficientes de correlación no menores al 90 por ciento. Sin embargo, las gráficas de residuales mostraron tendencias evidentes y repetitivas, lo cual indicó que a pesar de la transformación logarítmica los datos aún conservaban alguna tendencia de agrupamiento no lineal. Por lo tanto, se probó el efecto de conservar la transformación exponencial ($y=e^{(a-bx)}$, donde y = tamaño; x= distancia recorrida; a= ordenada en el origen; b= pendiente) y aplicar una segunda transformación, la cual fue de tipo exponencial, multiplicativa, o recíproca. El mejor ajuste, tanto desde el punto de vista de los coeficientes de correlación alcanzados, como por la desaparición de tendencias en las gráficas de residuales, se logró cuando la segunda transformación fue recíproca ($y=e^{(a-bx)^{-1}}$). También, los ANOVAs mostraron que tal modelo fue el que mejor se ajustó al comportamiento de los datos experimentales. Los coeficientes de correlación variaron del 99.4 al 99.9 por ciento, y las R^2 de los ANOVAs variaron del 98.7 al 99.9 por ciento.

A partir del desplazamiento de los marcadores de tamaño incluídos en cada electroforesis, el modelo anterior se usó para estimar el tamaño de los RAPDs amplificados por los decámeros del grupo IV. Los resultados de estos cálculos, redondeados a la decena de pares de bases más cercana, se presentan en la Tabla 2. Los 33 decámeros analizados generaron un total de 82 RAPDs, 42 específicos de la poza de ADN del MYD y 40 específicos de la del WAT, cuyos tamaños variaron entre 350 y 1710 bp. Tales RAPDs se analizaron en la siguiente etapa del diseño experimental.

Segunda etapa: Análisis poblacionales (MYD y WAT).

Los 82 RAPDs seleccionados en la etapa anterior se analizaron en las poblaciones de MYD y WAT que se usaron para formar las pozas de ADN, encontrándose que 12 de ellos, o sus respectivos fenotipos nulos, aparecieron en frecuencias no menores que 0.85 en una de las poblaciones, y no mayores que 0.15 en la otra. Tales marcadores aparecen enlistados en la Tabla 3, y señalados dentro de los patrones de bandeo de la Figura 2. El hecho de que aparecieran en proporciones altas en una de las poblaciones, y bajas en la otra, los señala como posibles marcadores de resistencia al AL. La posibilidad de que estén ligados con el carácter de resistencia quedaría reforzada si aquellos que aparecieron en frecuencias altas dentro del MYD (resistente) aparecieran también en frecuencias altas en alguna población que tuviera las siguientes características: i) susceptible al AL, ii) genéticamente similar al WAT (en donde aparecieron en frecuencias bajas), y iii) que hayan sobrevivido a una exposición prolongada al AL. Tal posibilidad se evaluó en la siguiente etapa del diseño experimental.

Tabla 2. Tamaño (bp) de los fragmentos generados por los decámeros del grupo IV. en las pozas de ADN del Enano Malayo Amarillo (MYD) y el Alto del Oeste Africano (WAT).

Poza de ADN	Decámero										
	A7	A11	A13	B1	B4	B5	B7	B11	B13	B16	B17
MYD		520	410	410	1140	1290	780	570	1710	1130	
					380	550	620		1310	580	
									440	950	
WAT	540	990	460	610	980		990	1140	800	520	690
	470				570			480	610		420
	B19	B20	AB2	AB3	AB4	AB5	AB13	AB16	AB18	AB19	AB20
MYD	520	830	460	410		1310	780	780	680		460
		500					690	600			
							490				
							430				
WAT	1160	690	510	650	930	500	1250	450		860	1130
					640			990		550	
	AL3	AL7	AL8	AL9	AL11	AL12	AL14	AL16	AL18	AL19	AL20
MYD			1320	570	970	860	1370	1080	430	790	1080
			1060			500				660	
			430								
WAT	1160	1350				1370		370		1180	1210
	930	350				430					700
	540										

Tabla 3. Decámeros que generaron RAPDs específicos de las poblaciones del Enano Malayo Amarillo (MYD) o del Alto del Oeste Africano (WAT), y tamaño (bp) de tales RAPDs.

Población	Decámero										
	A11	B1	B4	B7	B11	AB3	AB4	AB5	AB16	AL3	AL7
MYD	990										
WAT	520	610	570	990	1140	650	930	500	450	1160	350

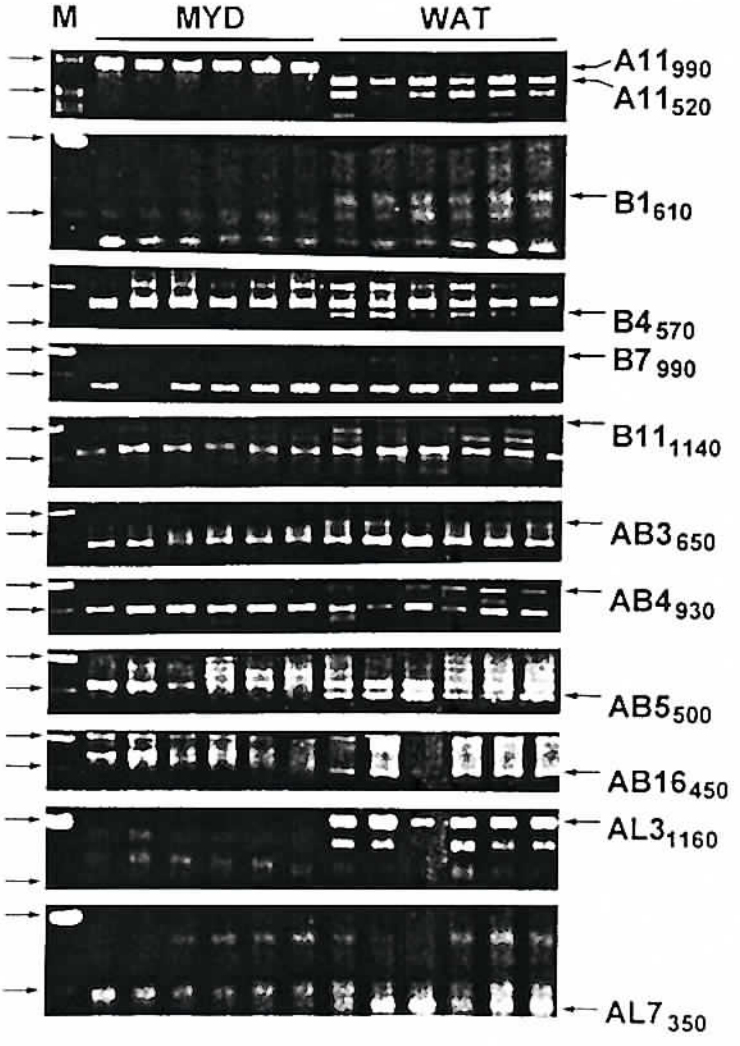


Figura 2. Patrones de bandeo de los RAPDs enlistados en la Tabla 3. MYD. Enano Malayo Amarillo: WAT. Alto del Oeste Africano: M. fragmentos de 0.5 y 1 kbp (flechas superior e inferior. respectivamente) de una escalera de ADN.

Tercera etapa: Análisis poblacionales (sobrevivientes AT).

La distribución de los 12 marcadores identificados en la etapa anterior dentro de la población AT escogida para éste estudio se muestra en la Tabla 4. Las frecuencias resultantes se comparan en la Figura 3. Se observaron frecuencias que variaron entre 0 y 1.0, y tres marcadores, representados por los fenotipos nulos de $B4_{570}$, $B7_{990}$ y $AL3_{1160}$, aparecieron en frecuencias mayores que 0.50, que fue la frecuencia mínima considerada para identificar posibles ligamientos con resistancia al AL. Las frecuencias de tales marcadores fueron 0.80, 0.60 y 1.0, respectivamente. Las eficiencias de las tres etapas del esquema de sustracción genética probado se comparan en la Tabla 5.

Tabla 4. Distribución de los RAPDs mostrados en la Figura 2 en la población de sobrevivientes Alto del Atlántico.

No. de individuo	RAPD											
	$A11_{520}$	$A11_{990}$	$B1_{610}$	$B4_{570}$	$B7_{990}$	$B11_{1140}$	$AB3_{650}$	$AB4_{930}$	$AB5_{500}$	$AB16_{450}$	$AL3_{1160}$	$AL7_{350}$
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
2	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
4	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
5	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
6	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
7	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
8	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
9	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
10	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1
11	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
12	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
13	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
14	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
15	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
16	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
17	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
18	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
19	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
20	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1

1, presente; 0, ausente

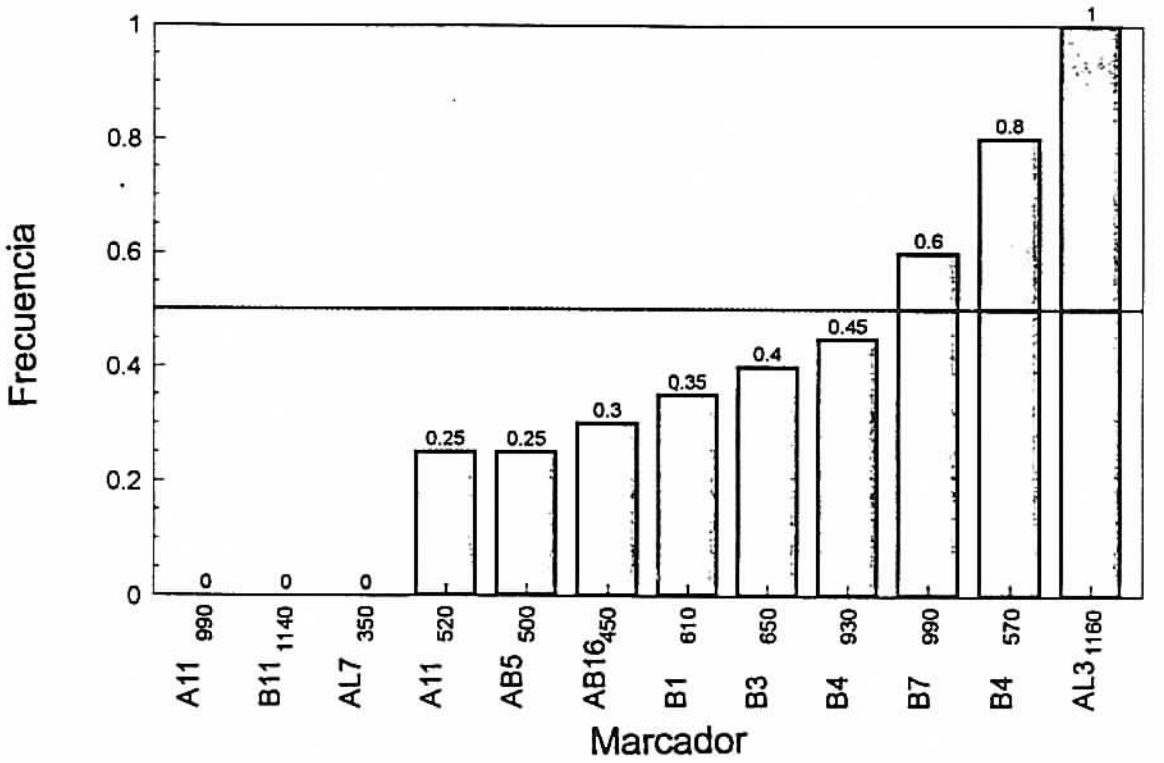


Figura 3. Frecuencia de los RAPDs mostrados en la Figura 2 en la población de sobrevivientes Alto del Atlántico. Excepto por $A11_{990}$, los nombres de los RAPDs se refieren a sus respectivos fenotipos nulos. La línea horizontal representa la frecuencia mínima considerada para identificar a un marcador como asociado con resistencia al AL.

Tabla 5. Decámeros seleccionados en las distintas etapas experimentales, y número de RAPDs generados por éstos.

	Total analizado	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Decámeros seleccionados	A1 al A20, B1 al B20, AB1 al AB20, AL1 al AL20	A7, A11, A13, B1, B4, B5, B7, B11, B13, B16, B17, B19, B20, AB2, AB3, AB4, AB5, AB13, AB16, AB18, AB19, AB20, AL3, AL7, AL8, AL9, AL11, AL12, AL14, AL16, AL18, AL19, AL20	A11, B1, B4, B7, B11, AB3, AB4, AB5, AB16, AL3, AL7	B4, B7, AL3
Total	80	33	11	3
No. de RAPDs	>82	82	12	3

NIVEL DE EXPRESIÓN DE LA RESISTENCIA.

DIAGNÓSTICO DEL AL EN POSIBLES PORTADORES RESISTENTES.

Antecedentes.

Myndus crudus, un vector confirmado del AL, es un insecto que se alimenta de la savia del floema de hojas de cocotero (Eden-Green, 1997). Lo anterior sugiere que la hoja es el sitio de inoculación del fitoplasma que causa esta enfermedad, a partir de donde éste se distribuye al resto de la planta y eventualmente se establece y prolifera en órganos en crecimiento activo (raíces jóvenes, inflorescencias, bases de pecíolo de hojas jóvenes, meristemo apical).

Un estudio efectuado en una zona que se ha mantenido afectada por el AL mostró que las densidades poblacionales de *M. crudus* en plantas resistentes (Enano Malayo) y susceptibles (Alto del Atlántico) fueron similares (Piña, 1993). Ésto llevó a suponer que tales grupos de plantas podrían haber estado expuestos a inoculación con el fitoplasma del AL en forma similar. En tal caso, el diagnóstico de la presencia del patógeno en las inflorescencias de las plantas resistentes de esa misma zona proporcionaría una primera línea de evidencia sobre el nivel al cual éstas expresan su resistencia ante la enfermedad. Concretamente, un resultado positivo en tales análisis implicaría que los Enanos Malayos sí fueron inoculados y además permitieron el transporte del patógeno hacia la inflorescencia, y su posterior proliferación dentro de este órgano. Un resultado negativo también sería informativo pues sugeriría que las plantas habrían expresado algún mecanismo de resistencia capaz de impedir el transporte patógeno hacia la inflorescencia, o su proliferación dentro de ésta.

Materiales y métodos.

Se analizaron poblaciones de Enano Malayo (resistente) localizadas en el ejido San Crisanto, municipio de Sinanché, Yucatán. La plantación experimental había estado sometida los 5 años previos al ataque del AL. Se analizaron 30 plantas, 10 de cada uno de los ecotipos Amarillo, Rojo y Verde. Como control positivo se usaron 5 plantas Alto del Atlántico (susceptible) con síntomas de AL (grado 5), procedentes de una zona afectada por la enfermedad en Belice.

La extracción de ADN y el diagnóstico por PCR se efectuaron de acuerdo al protocolo de Harrison *et al.* (1994), incorporando en la extracción dos etapas iniciales de centrifugación en gradiente para enriquecer el extracto en ADN del fitoplasma. Segmentos de inflorescencia fueron lavados, cortados en fragmentos pequeños y licuados en amortiguador de enriquecimiento frío (Por litro: sacarosa 100 g, fructosa 8 g, K_2HPO_4 3 H_2O 21.8 g, KH_2PO_4 4.2 g, EDTA 3.36 g, albúmina sérica bovina 1.5 g, PVP-40 20 g, ácido ascórbico 5.2 g, pH 7.3). El homogenado se filtró a través de gasa y se centrifugó a

3000 g por 10 min a 4 °C. En esta etapa se sedimentaron plastidios, gránulos de almidón y fragmentos celulares. El sobrenadante se filtró a través de gasa y se centrifugó nuevamente, ahora a 20000 g por 30 min a 4 °C. En esta etapa se sedimentaron fitoplasmas intactos, mitocondrias y fragmentos celulares restantes. El sobrenadante se eliminó y las pastillas se procesaron de acuerdo a lo descrito en el protocolo original. Como iniciadores se usaron dos oligonucleótidos (5'-CAT ATT TTA TTT CTT TTG CAA TCT G-3', hacia adelante; y 5'-TCG TTT TGA TAA TCT TTC ATT TGA, hacia atrás) derivados de una secuencia genómica de aproximadamente 1.0 kb, específica del fitoplasma del AL.

Resultados y discusión.

Las 5 plantas Alto del Atlántico con síntomas de AL fueron positivas en la amplificación, al contrario de lo observado con los 30 Enanos Malayos asintomáticos.

Puesto que el AL permaneció activo en la plantación de los Enanos Malayos desde varios años antes de su colecta, es altamente probable que estas plantas hayan sido inoculadas en algún momento con el fitoplasma causante del AL. Los resultados de un estudio previo en la misma área apoyan esta hipótesis, pues mostraron que las frecuencias de visitas del insecto vector *Myndus crudus* a plantas Enano Malayo y Alto del Atlántico no fueron significativamente diferentes (Oropeza *et al.*, 19xx). Por lo tanto, una explicación probable para los resultados obtenidos es que la resistencia de los Enanos Malayos se exprese en forma de mecanismos que impedirían el transporte del patógeno a la inflorescencia después de su inoculación en la hoja, y/o su proliferación en tal destino. Uno de tales mecanismos podría ser la síntesis de calosa, fenómeno que ha sido ampliamente asociado con situaciones de estrés que inducen daño celular en plantas, y cuya función como mecanismo para evitar la dispersión de patógenos ha sido ampliamente demostrada (ver por ejemplo Kohle *et al.*, 1985).

ANÁLISIS DE CALOSA.

Antecedentes.

La calosa es un 1,3-b-D-glucano sintetizado en algunos tejidos y células vegetales durante etapas de desarrollo específicas (maduración del grano de pólen, crecimiento del tubo polínico, formación de poros en las placas cribosas, gravitropismo), así como en respuesta a situaciones de estrés que involucran alteraciones en la membrana plasmática (heridas, sonicación, tratamientos químicos, choque térmico, ataque por patógenos) (Kohle *et al.*, 1985). En situaciones de estrés, la calosa es sintetizada en forma de depósitos localizados que actúan aislando a la región afectada. Esta función de aislamiento es particularmente significativa en casos de invasión por patógenos, en los que la consecuencia es restringir el avance de la infección. En el cocotero, se sabe que tejidos infectados por fitoplasmas de plantas con síntomas de AL muestran

acumulaciones anormales de calosa. Tales acumulaciones se encontraron asociadas con el floema, y coincidieron con los sitios de presencia de los fitoplasmas (Schuiling *et al.*, 1981).

Los resultados de este proyecto en los análisis por PCR (sección previa) mostraron que las inflorescencias de Enanos Malayos (resistentes al AL) que crecían en un foco de infección no contenían al patógeno. También, en los Antecedentes de la sección anterior se mencionó un estudio que indicó que las densidades poblacionales de *M. crudus* en Enanos Malayos y Altos del Atlántico (susceptibles) de la misma zona eran similares (Piña, 1993). En conjunto, estas observaciones sugirieron que los Enanos Malayos analizados por PCR sí habían sido inoculados con el fitoplasma del AL, y que éstos expresaron algún mecanismo de defensa que impidió el transporte del patógeno hacia la inflorescencia, o su proliferación en este órgano.

Lo anterior, y lo expuesto en relación a la síntesis de calosa como mecanismo capaz de restringir la distribución de patógenos, llevaron a suponer que esta respuesta fisiológica podría estar involucrada en la resistencia que los Enanos Malayos expresan ante el AL.

Materiales y métodos.

Material biológico.

Se analizaron plantas de la variedad Alto del Atlántico (AT), las cuales se colectaron en una plantación localizada en Sabancuy, Campeche. Los análisis se efectuaron cuando las plantas tenían aproximadamente 1 año de edad, usando pinas de la parte media de las frondas.

Establecimiento de condiciones para el análisis de calosa por microscopía.

Aplicabilidad de un protocolo de tinción mediante azul de anilina.

Se probó un protocolo usado originalmente para la detección al microscopio de calosa a través de láminas foliares de cebada, mediante tinción con el fluorocromo azul de anilina (Bayles *et al.*, 1990). Con el propósito de determinar la aplicabilidad de este protocolo para detectar calosa en tejidos de cocotero, se analizó la inflorescencia de una planta enferma de AL ya que se ha descrito que en este tipo de tejido se producen cantidades anormalmente altas de calosa (Schuiling *et al.*, 1981).

Para los análisis, las ramas laterales de la inflorescencia se usaron para efectuar manualmente cortes transversales finos con una navaja de rasurar nueva. Mientras los cortes se iban realizando, los de buena calidad se depositaban en portaobjetos y se cubrían con una gota de amortiguador de fosfatos (0.067 M, pH 8.50). Después de lograr

dos portaobjetos con tres cortes cada uno, el amortiguador se retiró mediante su absorción con papel toalla. En uno de los portaobjetos los cortes se cubrieron con azul de anilina al 0.1% en el mismo amortiguador de fosfatos, durante 10 min. Como control negativo para la tinción, el segundo portaobjetos se trató de forma similar pero excluyendo el fluorocromo del amortiguador. Después de la incubación el líquido de los portaobjetos se drenó con papel toalla y los cortes se enjuagaron brevemente con amortiguador. Después de drenar nuevamente, los cortes se montaron en glicerol y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Karl Zeiss modelo MC63) con un juego de filtros de 436 nm (excitación), 520 nm (barrera) y 510 nm (emisión). Los resultados se fotografiaron en película Kodak a color ISO 400.

Pruebas de fijación.

Con el fin de establecer condiciones de fijación que permitieran conservar lo mejor posible las estructuras físicas y químicas del tejido foliar de palmas de coco, para el posterior análisis de la calosa presente en ellos, se realizaron los siguientes experimentos:

a) Evaluación de un protocolo de fijación estándar.

Segmentos de lámina foliar (0.1 g por segmento) se depositaron en 10 ml de una solución fijadora (FAA) compuesta de etanol al 70%, formaldehído al 5%, y ácido acético al 5%. Los segmentos se dejaron en reposo en la obscuridad durante 24 h, después de lo cual su apariencia fue comparada visualmente con la de un segmento de hoja equivalente recién cortado.

b) Efecto de la edad del tejido, la aplicación de vacío y el uso de mercaptoetanol en la fijación estándar.

El eventual análisis *in situ* de calosa en hojas de cocotero tendría que relizarse en tejidos que permitan una adecuada observación al microscopio, así como su procesamiento por las técnicas histológicas que pudieran requerirse. Un factor que se consideró importante evaluar en este contexto fue la edad de la hoja, ya que durante su maduración aparecen compuestos y estructuras (pigmentos, fenoles, ceras) que podrían dificultar su procesamiento y final análisis microscópico. Paralelamente, debido al efecto negativo que podría tener el aumento en contenido de fenoles asociado a la maduración de la hoja, se evaluó la utilidad de adicionar un antioxidante, ß-mercaptoetanol, a la solución fijadora.

La aplicación de vacío es un procedimiento que acompaña comunmente a los procesos de fijación de tejidos para microscopía, pues facilita la infiltración de éstos con la solución fijadora al desplazar al aire presente en los espacios intercelulares. Para acelerar tal proceso, la diferencia de presión entre la solución fijadora y los espacios intercelulares, lograda después de un período de aplicación de vacío al tejido sumergido

en el fijador, es revertida bruscamente mediante una rápida eliminación del vacío.

El efecto de las variables descritas (edad del tejido, aplicación de vacío, uso de mercaptoetanol) se probó simultáneamente con tres pares de segmentos de hoja (0.1 g por segmento), cada par conteniendo un segmento de hoja joven y otro de hoja madura. Los tratamientos aplicados a cada uno de los pares fueron como a continuación se describe:

i) El primer par se cubrió con 10 ml de solución fijadora (FAA) y se mantuvo en ésta por 24 h en la oscuridad.

ii) El segundo par se trató de forma similar, pero inmediatamente después de sumergirlo en FAA se sometió a infiltración al vacío en un desecador de vidrio. La infiltración consistió de 10 min a 620 mm Hg seguido de rápida eliminación del vacío, por tres ocasiones o hasta que dejaran de aparecer burbujas de aire sobre la superficie del tejido.

iii) El tercer par se trató como el anterior, pero el FAA contuvo además mercaptoetanol al 1%.

Al terminar la incubación, los segmentos se fotografiaron con luz transmitida y el efecto de los tratamientos se evaluó en base a su capacidad de evitar el oscurecimiento de los tejidos, y por el grado de transparencia logrado en los mismos.

Uso de técnicas de aclaramiento.

En un estudio previo sobre la capacidad de hojas de cebada para sintetizar calosa, la detección de este polisacárido se logró mediante su visualización a través de la lámina foliar completa de plántulas recién germinadas (Freialdenhoven *et al.*, 1996). Puesto que se estimó que el grosor y el contenido de pigmentos de las hojas de cocotero serían considerablemente mayores, el eventual uso de este procedimiento sería facilitado si se contara con un procedimiento de aclaración efectivo. Con este propósito, se evaluó la efectividad de diferentes técnicas de aclaramiento descritas en la literatura (Gaviño *et al.*, 1980). Se usaron segmentos de lámina foliar (0.1 g por segmento) previamente fijados, los cuales se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm. Un grupo de tales fragmentos fue mantenido en el fijador para usarlos posteriormente como control, y los demás se trataron de acuerdo a los procedimientos descritos a continuación. En todos los casos, las observaciones se efectuaron después de montar los tejidos en glicerol.

a) Tratamiento con mezcla de etanol y lactofenol.

Los fragmentos de hoja se cubrieron con 10 ml de una mezcla de etanol y lactofenol (2:1), y se incubaron con agitación moderada. La mezcla aclaradora se renovó cada 24 h por un período de 72 h.

b) Infiltración con xilol.

Los segmentos de hoja se sometieron a deshidratación mediante incubaciones

sucesivas de 24 h en soluciones de etanol (10 ml) de concentración creciente (50%, 70%, 95% y 100%). Después de la última deshidratación, los fragmentos se transfirieron a xilol y se incubaron por 24 h.

c) Uso de mezclas de glicerol y etanol.

Los fragmentos se infiltraron con glicerol, a través de una serie de incubaciones sucesivas de 24 h en mezclas (20 ml) de este compuesto y etanol (3:7, 1:1, 7:3, 1:0). En este caso, el efecto aclarador del glicerol provendría de su capacidad de disminuir el índice de refracción de los tejidos.

Optimización de la reacción con ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS).

La reacción con ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS) es usado comunmente para reducir la autofluorescencia de tejidos de plantas (Freialdenhoven *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1990), cuando ésta es debida a la presencia de compuestos fenólicos como las ligninas. Debido a que las hojas del cocotero han sido descritas como tejidos con una alta concentración de compuestos fenolicos (Cardeña, 1998), la reacción PAS se probó como un medio para reducir la interferencia que tales compuestos causarían durante la detección de la fluorescencia del complejo formado por calosa y el azul de anilina.

a) Eficiencia de un protocolo estándar.

Las condiciones de la reacción con PAS, tal como fueron descritas por Bayles *et al.* (1990), fueron aplicadas a tejido foliar de cocotero. Un fragmento de hoja (0.1 g) previamente fijado se lavó con varios cambios de agua durante un período de 24 h, con agitación moderada. En un portaobjetos, el fragmento se cubrió con dos gotas de ácido periódico (0.1%) y se incubó por 10 min en la obscuridad. A continuación el ácido periódico se lavó con agua, se cubrió el tejido con dos gotas de reactivo de Schiff y se incubó nuevamente en la obscuridad, ahora por 20 min. Finalmente, el exceso de reactivo de Schiff se eliminó mediante lavados con agua y el tejido se montó en glicerol. Como control, un fragmento de tejido fijado y lavado se montó directamente en glicerol. La fluorescencia de los tejidos se observó con el microscopio y el juego de filtros que se usaron para la detección de calosa.

b) Variaciones del tiempo de incubación en ácido periódico.

El protocolo anterior fue modificado de manera que las incubaciones en ácido periódico y reactivo de Schiff se efectuaron en tubos de ensayo, para permitir que el volumen usado de tales reactivos (1 ml) cubriera completamente los fragmentos de hoja tratados. Adicionalmente, se probó el efecto de aumentar el tiempo de incubación en ácido periódico, en los siguientes intervalos: 10 min, 25 min, 40 min y 55 min.

Análisis de calosa por fluorometría.

Establecimiento de condiciones para la extracción de calosa.

El protocolo de Köhle *et al.* (1985), usado originalmente para extraer calosa a partir de células en suspensión de soya, se usó de base para probar distintas modificaciones que permitieran adaptarlo al análisis de hojas de cocotero. El objetivo de tales modificaciones fue eliminar las interferencias que se esperó que ocurrirían en el ulterior análisis fluorométrico de los extractos, debido a que las concentraciones de pigmentos y fenoles de las hojas del cocotero son considerablemente mayores que las típicamente encontradas en los cultivos de células en suspensión.

En su forma original, el protocolo involucró filtrar 300 mg de las células en suspensión a través de papel Whatman. El paquete celular se lavó inicialmente con 10 ml de agua, y posteriormente con 10 ml de etanol para eliminar compuestos autofluorescentes. Los residuos de etanol se filtraron al vacío, y las células se homogenizaron en 3 ml de NaOH 1 N. El homogenado se incubó a 80 °C por 15 min, se centrifugó (39000 g por 15 min) y el sobrenadante se usó para la cuantificación fluorométrica de calosa mediante reacción con azul de anilina. Una alícuota del extracto se diluyó a 600 µl con NaOH 1 N, la dilución se mezcló con 1200 µl de azul de anilina al 0.1 %, 630 µl de HCl 1N y 770 µl de amortiguador (glicina 1 M, pH 9.5). La mezcla se homogenizó vigorosamente y se incubó inicialmente por 20 min a 50 °C para acelerar la decoloración del azul de anilina, y posteriormente por 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La emisión de fluorescencia se evaluó con un juego de filtros de 365 nm (excitación), 510 nm (emisión) y 520 nm (barrera). Como estándar se usó al ß-1,3 glucano paquimano.

En las secciones siguientes se describen las distintas modificaciones efectuadas al protocolo anterior. Todos los análisis se efectuaron con pinas de las hojas más jóvenes. Las pinas se lavaron y la lámina foliar se cortó en discos de 1 cm de diámetro, los cuales se usaron para la extracción. Para la cuantificación de calosa el estándar paquimano se substituyó por el análogo laminarina, efectuando los análisis en un fluorómetro Turner modelo 111.

a) Protocolo básico.

Los discos foliares (6.5 g) se infiltraron inmediatamente al vacío con FAA (ácido acético al 5 %, etanol al 70 %, formaldehído al 5 %) y se incubaron en este fijador por 24 h. Después de la fijación los discos se lavaron con agua y se maceraron en presencia de 6.5 ml de amortiguador (HEPES 0.5 M, pH 7.0). El homogenado se centrifugó y a continuación el sobrendante se desechó. La pastilla se resuspendió en 6.5 ml de NaOH 1 N y se incubó por 15 min a 80 °C. Finalmente, se centrifugó y el sobrenadante se recuperó para la cuantificación de calosa. La presencia en el extracto de compuestos que

interfirieran con la cuantificación se evaluó al comparar su fluorescencia con la de una solución de laminarina, y con la de una mezcla que contuviera cantidades equivalentes de ambos.

b) Substitución del amortiguador de HEPES por uno de ascorbatos.

Con el propósito de reducir la concentración de compuestos fenólicos en la pastilla que se usaría para la extracción de calosa, así como para evitar la oxidación de éstos durante el proceso de extracción, el amortiguador de HEPES se sustituyó por uno de ascorbatos (ácido ascórbico 0.1 M, cisteína 50 mM, tiourea 5 mM, PVP-40 al 10 %, pH 5.5), el cual había sido usado con éxito para propósitos similares (Cardeña *et al.*, 1998).

c) Reducción del tiempo requerido para la fijación.

Se tomó en cuenta que el procesamiento de los tejidos antes de su extracción (corte con sacabocados, exposición a vacío y a la solución fijadora) podría actuar como un estrés capaz de inducir aumentos en su concentración de calosa. Si ésto ocurriera durante el tiempo en que el fijador penetra y actúa, la concentración de calosa en los extractos finales no reflejaría los niveles basales de este glucano en las hojas analizadas. Para minimizar este riesgo, los discos foliares recién cortados se congelaron y molieron inmediatamente en nitrógeno líquido, y el polvo se mezcló con amortiguador de ascorbatos. En el momento en que la mezcla empezó a descongelarse, se le adicionaron etanol y ácido acético de manera que éstos alcanzaran concentraciones finales de 50% y 7%, respectivamente. El homogenado se dejó en reposo por 30 min, se centrifugó y la pastilla se terminó de procesar de acuerdo al protocolo anterior (lavados adicionales con amortiguador de ascorbatos, extracciones con éter, extracción alcalina, cuantificación fluorométrica de calosa).

d) Reducción de compuestos que interfieren con la cuantificación.

Con el propósito de eliminar más eficientemente los compuestos fenólicos durante la extracción con el amortiguador de ascorbatos, así como para reducir la posible interferencia de pigmentos durante la cuantificación de calosa, se incorporaron al protocolo anterior dos etapas adicionales de extracción. Tales etapas siguieron inmediatamente a la extracción inicial con el amortiguador de ascorbatos, y constaron de tres lavados de 5 min en vortex. Para los lavados se usó inicialmente amortiguador de ascorbatos (10 ml por lavado), y seguidamente éter (5 ml sobre un volumen igual, no renovado, del amortiguador anterior). Después del último lavado la pastilla se usó para la extracción de calosa como se describió en la sección anterior.

e) Uso de antioxidantes durante la extracción alcalina.

A pH alcalino, las reacciones de obscurecimiento en extractos de plantas debidas a la oxidación de fenoles se ven aumentadas (Loomis, 1974). El protocolo anterior se modificó para minimizar la posible ocurrencia de este fenómeno durante la etapa de extracción alcalina de la calosa. Con este propósito, el NaOH 1N usado para la extracción de este polisacárido se substituyó por una mezcla de amortiguador de extracción (2 ml, adicionado inicialmente para resuspender la pastilla) y NaOH 2 N (4 ml).

Evaluación de protocolos de inducción.

Se cuantificó la variación temporal en la concentración de calosa en tejidos de hoja que fueron sometidos a cuatro tratamientos descritos en la literatura como capaces de inducir síntesis de calosa. Tales tratamientos consistieron en daño mecánico (Köhle *et al.*, 1985), e incubación de tejidos con quitosano (Köhle *et al.*, *op. cit.*) o concentraciones tóxicas de Al (Zhang y Taylor, 1988, 1989) o Mn (Wissemeier *et al.*, 1993). En estos dos últimos casos no se tuvo la certeza de que las concentraciones de los inductores fueran realmente tóxicas al tejido. No obstante, éstas fueron cuatro veces mayores que las comunmente usadas en medios para cultivo de tejidos de cocotero (Chan *et al.*, 1998). Cada tratamiento se aplicó a tres pinas consecutivas de la parte media de la hoja abierta más joven, usándose la mitad distal de cada una para el control respectivo. Los tratamientos abarcaron un período de cuatro días, iniciándose alrededor de las 9:00 A.M. (tiempo 0) y efectuando los muestreos para extracción de calosa cada 24 h.

a) Daño mecánico.

Al inicio del experimento (tiempo 0), se efectuaron punciones con una aguja de 0.5 mm de diámetro sobre la lámina foliar de la planta en el vivero, en un patrón de malla cuadrangular de 0.5 cm paralelo al eje de la pina. El área cubierta por las punciones abarcó toda la superficie de los fragmentos que se analizarían a lo largo del experimento. El control consistió en no aplicar las punciones.

b) Quitosano, Mn y Al.

Al inicio del experimento (tiempo 0), fragmentos de lámina foliar de 0.1 g se infiltraron al vacío en presencia de 10 ml de un amortiguador (ácido ascórbico 0.1 M, cisteína 50 mM, tiourea 5 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM, PVP-40 al 10%, pH 5.50) que contuvo o no (control), según el caso, quitosano al 0.01%, $MnSO_4$ 20 mM o $AlCl_3$ 250 mM. La incubación se efectuó a 20 °C, bajo una intensidad lumínica de 240 mmol $m^{-2}s^{-1}$ durante el fotoperiodo (14 h). La solución de incubación se renovó cada 24 h.

Resultados y discusión.

Microscopía.

Detección de calosa con azul de anilina.

Al observar los cortes de inflorescencia en luz visible se logró reconocer facilmente los haces vasculares incluídos en células de parénquima. Dentro de los haces vasculares, los vasos de xilema pudieron ser fácilmente diferenciados por los engrosamientos helicoidales de lignina característicos de este tipo de célula. Los grupos de tubos cribosos pudieron reconocerse como bandas de apariencia homogénea adyacentes a los vasos de xilema, distinguibles por la aparente ausencia de estructuras perpendiculares a la dirección de los haces vasculares (Figura 4A). Bajo iluminación ultravioleta los cortes mostraron una ténue autofluorescencia de color verde. En los cortes tratados con azul de anilina se observaron regiones con una intensa fluorescencia amarilla-verdosa, las cuales coincidieron con la localización de los tubos cribosos. La fluorescencia apareció en forma de grupos de pequeños puntos, bordeando segmentos de la pared longitudinal en algunos tubos cribosos, y como segmentos cortos perpendiculares o diagonales respecto a la dirección del haz vascular, de longitud equivalente al diámetro de los tubos cribosos (Figura 4B). En ocasiones, los sitios donde aparecían estos segmentos coincidían con la localización de alguna placa cribosa (Figura 4C). En conjunto, estas observaciones indicaron que el protocolo usado fue capaz de permitir la detección de calosa. Los grupos de puntos fluorescentes corresponderían a zonas de concentración de poros cribosos recubiertos de calosa. Así mismo, el tamaño de los segmentos fluorescentes, su eventual co-localización con estructuras reconocibles como placas cribosas, y el hecho de que tales segmentos siempre aparecieron en posición perpendicular o diagonal a la dirección de los haces vasculares, sugieren fuertemente que se trataban de placas cribosas recubiertas de calosa.

Fijación.

Mediante la aplicación del protocolo original se observó que los fragmentos de tejido foliar adquirieron una coloración café verdosa, típica de la oxidación de compuestos fenólicos. Esta observación llevó a pensar en la necesidad de acelerar el proceso de fijación, y evitar la oxidación de fenoles asociada a éste. Con este propósito, se introdujeron dos modificaciones al protocolo de fijación original: i) aplicación de vacío para infiltrar los tejidos con la solución fijadora inmediatamente después de ser sumergidos en ésta, y ii) adición del antioxidante mercaptoetanol a la solución fijadora.

Las modificaciones mencionadas se probaron con tejido foliar joven y maduro, mediante la aplicación de un diseño factorial. Lo anterior indicó que el uso de tejido joven, en combinación con infiltración al vacío y uso de mercaptoetanol, fue el tratamiento que mejor conservó la apariencia original de los tejidos (Figura 5).

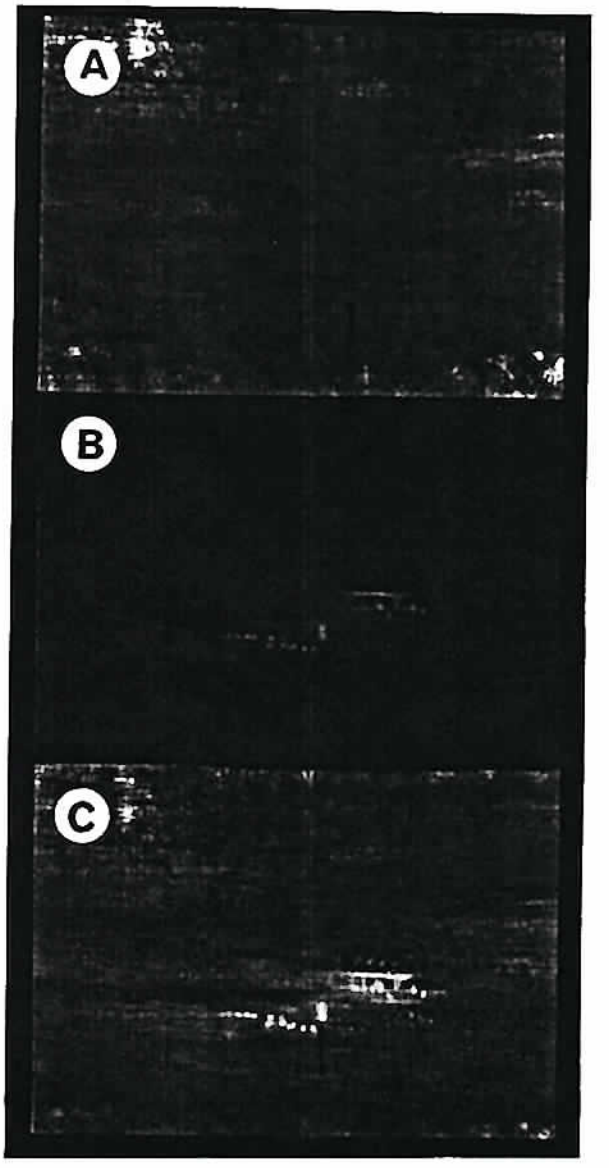


Figura 4. Corte de inflorescencia teñido con azul de anilina, mostrando un haz vascular y observado a través de luz visible (A), epifluorescencia (B), y una combinación de ambas (C). La flecha señala una placa cribosa.

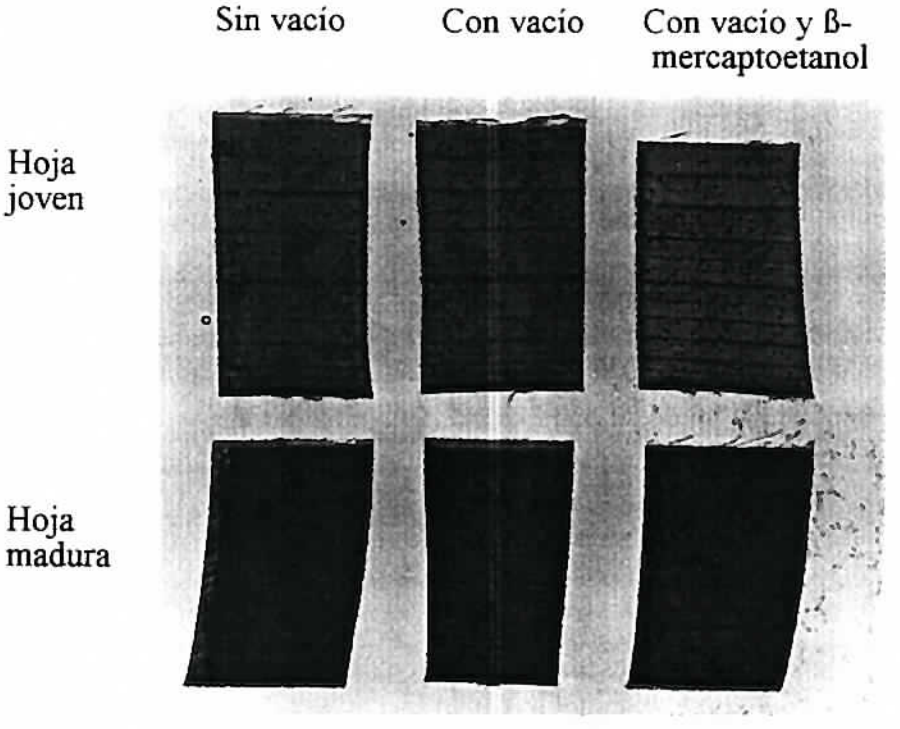


Figura 5. Efectos producidos por distintas modificaciones incorporadas al protocolo de fijación.

Aclaramiento.

Las técnicas de aclaramiento se aplicaron con el propósito de facilitar la observación de depósitos de calosa a través de láminas foliares de cocotero, ya que de esta manera se podría estudiar mejor la respuesta de este tejido ante tratamientos de inducción localizados tales como el daño mecánico.

Durante la incubación en etanol y lactofenol, el aclaramiento avanzó muy lentamente desde los bordes de los tejidos hacia el interior de éstos. Al final de la incubación (72 h), el perímetro de los segmentos de hoja (cuadrados de 1.0 cm por lado) mostraba una zona de aclaramiento de aproximadamente 2 mm de ancho. En vista de la lentitud e ineficiencia de este procedimiento, se descartó la posibilidad de usarlo como tratamiento previo a la tinción de calosa y se probó para este propósito otros métodos de aclaramiento.

Al aplicar el aclaramiento con xilol, la etapa inicial de deshidratación incluída dentro de este procedimiento causó que el tejido se decolorara rápidamente debido a la solubilidad de las clorofilas en el medio de deshidratación (etanol). Posteriormente a la incubación en el xilol, el tejido adquirió una apariencia casi transparente. A pesar de la eficiencia de esta técnica, su uso previo a la tinción de calosa requeriría que después de la incubación en xilol los tejidos se sometan a una etapa de rehidratación, ya que este solvente es inmiscible en agua y durante la tinción se utilizan sólamente soluciones acuosas.

Los cuatro periodos sucesivos de incubación en concentraciones crecientes de glicerol (24 h en cada concentración) no permitieron alcanzar el grado de aclaramiento logrado mediante el uso de xilol. Sin embargo éste fue mejor que el alcanzado después del tratamiento con etanol y lactofenol, y a diferencia de lo que ocurrió en este caso, el aclaramiento no quedó restringido a los bordes del tejido.

Los resultados anteriores indicaron que el mejor procedimiento de aclaramiento fue la infiltración con xilol. Sin embargo, debido a que el xilol es inmiscible en agua, la aplicación de este procedimiento requeriría que este solvente fuese desplazado por agua previamente a la tinción de calosa, y consecuentemente el procesamiento se haría más largo y complicado. Por tal motivo, la infiltración con glicerol se presenta como una opción de aclaramiento más apropiada.

Optimización de la reacción con ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS).

La reacción con PAS se usó para disminuir la autofluorescencia que se esperó que aparecería durante el análisis por microscopía de los tejidos foliares de cocotero, debido a los compuestos fenólicos normalmente presentes en éstos. Esta reacción se aplicó con el propósito de evitar la interferencia que tal autofluorescencia causaría durante la posterior detección de calosa mediante el fluorocromo azul de anilina.

Al aplicar el protocolo estándar se observó que los bordes de los fragmentos de hoja (cuadrados de 1 cm por lado) adquirieron una coloración roja intensa. Esta coloración penetró gradualmente desde las orillas del tejido durante su incubación en el reactivo de Schiff, y formó un borde de 2 a 3 mm de espesor. La observación al microscopio de los fragmentos tratados mostró que las zonas no teñidas conservaron una fuerte autofluorescencia, mientras que en los bordes rojos ésta desapareció casi por completo. La autofluorescencia en la zona central (no teñida) de los fragmentos tratados con PAS fue similar en color e intensidad a la observada en el control (Figura 6).

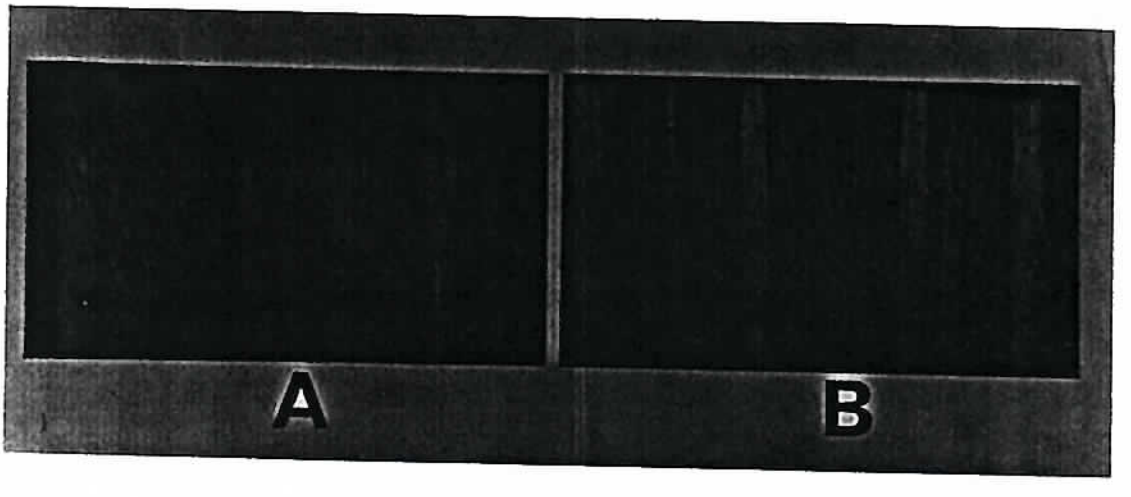


Figura 6. Efecto del tratamiento con ácido periódico y reactivo de Schiff sobre la autofluorescencia de láminas foliares de cocotero. A, tejido tratado; B, control.

Estos resultados indicaron que el protocolo usado para aplicar la reacción con PAS permitió eliminar la autofluorescencia de los tejidos sólamente de una manera parcial. Además, sugieron que la acción limitada del tratamiento se debió a que la difusión de los reactivos al interior de los tejidos ocurrió principalmente a través de las zonas de corte en los bordes. Aparentemente, la duración del tratamiento fue insuficiente para permitir una infiltración completa.

En base a los resultados previos, se probó el efecto de tiempos de incubación mayores con el äcido periódico. Esta prueba mostró claramente que, al aumentar el tiempo de incubación, el área con autofluorescencia en el centro de los fragmentos foliares se iba reduciendo (Figura 7). A los 55 min de exposición en ácido periódoco, solamente una pequeña porción en el centro de los fragmentos conservaba autofluorescencia. Dada la velocidad de avance de la respuesta, se estimó que con 60 min de exposición en ácido periódico la autofluorescencia de los tejidos se podría eliminar prácticamente por completo.

10 min 25 min 40 min 55 min

Figura 7. Reducción del area autofluorescente (zona clara) en los fragmentos foliares sometidos a diferentes tiempos de incubación en ácido periódico.

Fluorometría.

Extracción de calosa.

En el protocolo usado para la extracción de calosa, ésta se solubilizó a partir de una pastilla que contenía las paredes celulares del tejido mediante una etapa de hidrólisis alcalina (NaOH 1 N a 80 °C por 15 min) (Köhle *et al.*, 1985). La aplicación del protocolo anterior proporcionó extractos de un intenso color ámbar, el cual ya era evidente en el sobrenadante obtenido después de macerar los tejidos. Esta coloración es característica de la oxidación de fenoles a quinonas. Por otra parte, cuando los extractos fueron neutralizados durante su procesamiento para la cuantificación de calosa, se formó un precipitado de color rojo. Al eliminar este precipitado mediante centrifugación los extractos quedaban casi transparentes, con un ligero tono amarillento. La formación del precipitado rojo durante la neutralización sería consistente con la siguiente serie de eventos, correspondientes a reacciones típicas de las clorofilas (White *et al.*, 1978) (Figura 8):

1) Solubilización de clorofilas durante la extracción acuosa.

2) Formación de clorofilidas durante la etapa de digestión alcalina, mediante saponificación de los ésteres formados por los grupos carboxílicos de las cadenas unidas al núcleo porfirínico.

3) Durante la adición de ácido (etapa de neutralización), precipitación de los núcleos porfirínicos al perder su solubilidad por el desplazamiento de los átomos de sodio esterificados. Simultáneamente, formación de feoforbidas (coloración café rojiza) por eliminación del átomo de magnesio.

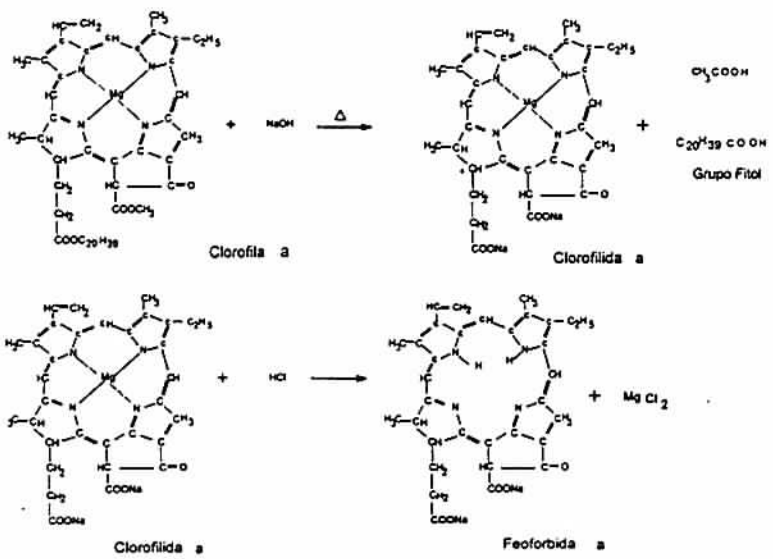


Figura 8. Eventos que conducirían a la formación de un precipitado de color rojo durante el análisis de los extractos obtenidos mediante el protocolo de Köhle *et al.* (1985).

Para determinar si los extractos contenían compuestos que interfirieran con la cuantificación de calosa se comparó las fluorescencias de soluciones que contuvieron 425 µl de extracto, 173 µg de laminarina, o una mezcla equivalente de ambos. Los porcentajes de fluorescencia observados para estas soluciones fueron de 39, 55 y 66, respectivamente. Estos resultados mostraron que la suma de los porcentajes de fluorescencia de las soluciones de extracto y laminarina (94) fue mayor que el porcentaje de fluorescencia de su mezcla (66).

Lo anterior indicó que el protocolo empleado provocó la extracción de compuestos que interfirieron con el ensayo para la cuantificación de calosa. Estos compuestos podrían ser fenoles (y sus productos de oxidación, quinonas), los cuales muestran máximos de absorción en un amplio intervalo de la región ultravioleta del espectro.

En base a estos resultados, el amortiguador de extracción se substituyó por uno que había sido probado con éxito para evitar problemas asociados a la extracción de compuestos fenólicos en hojas de cocotero (Cardeña *et al.*, 1998). El uso de este amortiguador redujo notablemente el color obscuro del sobrenadante obtenido después de la maceración. Sin embargo, las reacciones de obscurecimiento que ocurrían durante la digestión alcalina de la pastilla, y durante la neutralización del extracto para su análisis por fluorometría, no lograron evitarse. El color final de los extractos obtenidos con el amortiguador de ascorbatos fue indistinguible del que se obtuvo con el amortiguador de HEPES. Estos resultados indicaron que, aunque el amortiguador de ascorbatos sí mostró un efecto benéfico sobre el color del sobrenadante después de la extracción inicial, tal efecto fue insuficiente para contrarrestar las reacciones de obscurecimiento que se presentaron posteriormente. El esquema de reacciones propuesto anteriormente para explicar el obscurecimiento de los extractos considera que tal efecto es debido, al menos en parte, a la presencia de clorofilas en la pastilla tratada con NaOH. Esta hipótesis se vio apoyada por la observación de que tanto el sobrenadante como la pastilla que se obtuvieron después de macerar los tejidos con el amortiguador de ascorbatos presentaron un intenso color verde.

Consecuentemente, se trató de minimizar las posibles causas del obscurecimiento de los extractos mediante la incorporación de dos modificaciones adicionales al protocolo de extracción:

i) la reducción del tiempo requerido para la fijación, usada para disminuir reacciones de oxidación durante este proceso, y

ii) la eliminación de pigmentos en la pastilla mediante lavados sucesivos con amortiguador de ascorbatos, y con éter.

Se observó que cada uno de estos tratamientos produjo un aclaramiento notable del extracto final, siendo ambos efectos muy similares entre sí. La combinación de los dos tratamientos produjo un aclaramiento más intenso, observándose un aparente efecto sinergístico. Sin embargo, aún en este caso los extractos conservaban un tinte ámbar claro y presentaban autofluorescencia.

Por lo anterior, se trató de limitar las reacciones de oxidación que pudieran ocurrir

durante la solubilización alcalina de la calosa, mediante la adición de amortiguador de ascorbatos a la solución de NaOH usada en esta etapa. De esta forma se trató de mantener activo el efecto de los antioxidantes presentes en el amortiguador, durante el tratamiento alcalino de la pastilla. Esta modificación permitió obtener extractos casi transparentes y libres de autofluorescencia. Lo anterior indicó que el ambiente oxidante inducido por el tratamiento alcalino de la pastilla, aunque necesario para solubilizar la calosa, había estado causando la aparición de compuestos que interfieren con su cuantificación fluorométrica.

Inducción de la síntesis de calosa.

Con el propósito de seleccionar un tratamiento que permitiera inducir síntesis de calosa en hojas de cocotero, se determinó la variación en su concentración a lo largo de un período de cuatro días posteriores a la aplicación de cada uno de los siguientes tratamientos: punciones bajo condiciones de campo, o infiltración al vacío de fragmentos con soluciones que contuvieron quitosano, o concentraciones altas de Mn o Al.

Se encontró que todos los tratamientos causaron aumentos en la concentración de calosa de aproximadamente un 12 por ciento a las 24 h. En los tratamientos de infiltración la concentración de calosa mostró aumentos posteriores menos significativos, pero en todos los casos la respuesta fue similar a la del control (infiltración con amortiguador) (Figura 9). Lo anterior indicó que cualquiera de los tratamientos probados podría usarse para inducir síntesis de calosa en hojas de cocotero. La respuesta similar ante los cuatro tratamientos experimentales, y entre éstos y el control de los tratamientos de infiltración, sugiere que la hoja es un tejido muy sensible al daño mecánico. En los tratamientos de infiltración y su control, el daño mecánico habría sido inducido por la aplicación de vacío. De todas las condiciones probadas, la infiltración al vacío con amortiguador representó el tratamiento más simple capaz de inducir síntesis de calosa bajo condiciones experimentales controladas.

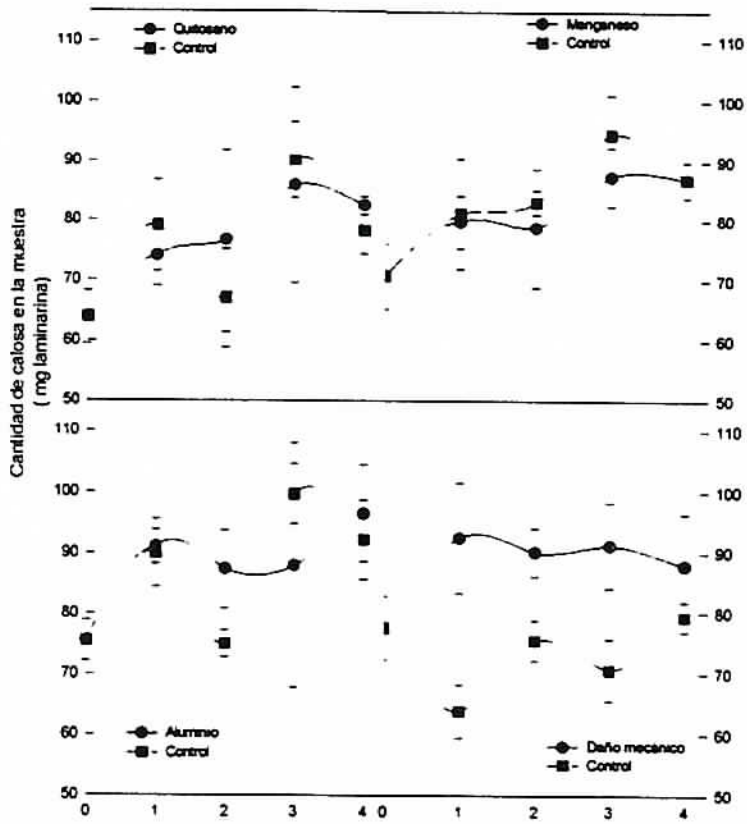


Figura 9. Efecto de los tratamientos probados sobre la cinética de acumulación de calosa.

Las cuatro condiciones probadas para inducir síntesis de calosa dieron lugar a aumentos en los niveles de este glucano en las hojas tratadas. Sin embargo, para cada tratamiento la respuesta que se obtuvo no fue significativamente diferente a la del control. De manera similar, no se encontraron diferencias significativas en la intensidad de la respuesta entre los distintos tratamientos. Estos resultados sugirieron que la hoja es un tejido muy sensible a condiciones de estrés mecánico, las cuales fueron comunes a todos los procedimientos evaluados. Entre éstos, la infiltración al vacío con amortiguador libre de quitosano, Mn o Al, fue el tratamiento más simple capaz de permitir el control de las condiciones del medio durante el tratamiento. Sin embargo, la aplicación de este tratamiento en dos pruebas subsecuentes dio lugar a acumulaciones de calosa más bajas, las cuales no se iniciaron sino hasta el cuarto y tercer día, respectivamente. Ésto sugirió la participación de efectos ambientales sobre la capacidad de acumulación de calosa bajo las condiciones de los ensayos, e indicó la importancia de evaluar otros protocolos (o modificaciones de los protocolos probados) para lograr un análisis más confiable de esta respuesta fisiológica.

FISIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

Antecedentes.

El AL causa múltiples alteraciones fisiológicas en la palma de coco, siendo una de las más notorias el cierre de los estomas, el cual se presenta desde los primeros estadíos de la enfermedad (León *et al.*, 1996). Se ha sugerido que este cierre anormal de estomas es uno de los factores que promueven la posterior muerte de la planta, ya que afectaría a procesos metabólicos fundamentales como la fotosíntesis al limitar el intercambio gaseoso (asimilación de CO_2), y el transporte de agua y nutrientes al abatir la transpiración (Oropeza *et al.*, 1995).

Se ha demostrado en diversas especies que bajo condiciones de estres abiótico (sequía, inundación, salinidad, etc.) puede ocurrir cierre de estomas como resultado de un aumento en la sintesis de ácido abscísico (ABA) (Zhang *et al.*, 1987). Un estudio efectuado en palmas de coco enfermas de AL (León *et al.*, 1996) indicó que las variaciones observadas en la concentración foliar de ABA a lo largo de la enfermedad no estuvieron relacionadas con el cierre anormal de los estomas. En tal estudio se detectó un aumento en la concentracion de ABA, pero éste ocurrió en los grados tardíos de la enfermedad, mucho después de iniciarse el cierre permanente de los estomas.

Los resultados del estudio anterior, sin embargo, no permiten descartar que el metabolismo del ABA durante el AL juegue algún papel en el cierre anormal de estomas que ocurre en esta enfermedad. Otras evidencias sugieren que el cierre de estomas oservado en plantas sometidas a estres hídrico se relaciona en forma más directa con aumentos en la concentración de este fitorregulador en raices (un sitio de síntesis) y en savia de xilema (vía de transporte), que en hoja (Davies y Zhang, 1991; Schurr *et al.*, 1992). Así, se probó la hipótesis de que el cierre de estomas inducido por el AL es fisiológicamente análogo al que ocurre en plantas sometidas a estres hídrico. Paralelamente, se analizó la posible participación de otros factores fisico-químicos (K^+, conductividad, osmolaridad, azúcares, fenoles) que han sido descritos como capaces de alterar el funcionamiento estomático en distintos modelos experimentales.

Materiales y métodos.

Material biológico y diagnóstico del AL.

Se analizaron plantas del genotipo Alto del Atlántico de entre 20 y 30 años de edad, localizadas en una plantación del municipio de Sabancuy, Campeche. Se usaron tanto palmas sanas como enfermas, en todos los grados del esquema de sintomatología descrito por McCoy (1973). Se consideró como palmas sanas a aquellas que no mostraban síntomas de la enfermedad y dieron resultados negativos cuando se les realizó diagnóstico mediante PCR (Escamilla *et al.*, 1995).

Adicionalmente, para la evaluación de compuestos con actividad de cierre estomático se usaron plántulas de *Commelina communis* germinadas en el laboratorio. Las semillas se incubaron en papel filtro humedecido a 30 °C, en la obscuridad. Una vez germinadas se transplantaron a un sustrato inerte (Agrolita) en una cámara de crecimiento con temperatura de 20 °C, intensidad lumínica de 240 mmol $m^{-2}s^{-1}$ y ciclo luz/oscuridad de 14 h. Las plántulas se regaron diariamente con agua, y cada tercer día con solución nutritiva de Hoagland al 50 % (Hoagland, 1950). Cuando las plantas tuvieron entre 5 y 6 semanas de edad, las hojas más jovenes completamente expandidas se usaron como fuente de material experimental.

Concentración foliar de ABA durante el desarrollo del AL.

Fragmentos de hoja o raíz se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron durante aproximadamente 48 h. Los tejidos liofilizados se maceraron hasta obtener un polvo fino. El homogenado (1 g) se extrajo con 30 ml de agua destilada y desgasificada, con agitación y a temperatura constante (2 °C) , durante 12 h. La suspensión se centrifugó a 20000 g por 1 min y el sobrenadante se recuperó para los análisis. Alternativamente, se analizó savia de xilema extraída segmentos de hojas mediante inyección de nitrógeno gaseoso (15 a 20 bars) en su extremo basal. La extracción de savia se realizó con una cámara de presión (PMS Instruments). La concentración de ABA se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA), usando anticuerpos monoclonales específicos para (+) ABA (Quarrie *et al.*, 1988).

Bioensayos para compuestos con actividad de cierre estomático.

Hojas de palmas enfermas se extrajeron mediante el protocolo de extracción descrito arriba, y los extractos se probaron en los siguientes bioensayos:

Modelo 1. Segmentos de hoja de cocoteros sanos.

La sensibilidad de estomas de plantas de coco sanas ante extractos de hoja de plantas enfermas se evaluó mediante un bioensayo de transpiración (Weyers y Meidner, 1990). Segmentos de lámina foliar de plantas sanas (15 cm de largo) se cortaron bajo agua destilada y se colocaron en vasos de precipitado (60 ml) con 20 ml de amortiguador (10 mM MES, 50 mM KCl, pH de 6.15), conteniendo o no (tratamiento control) el extracto por evaluar. El extremo basal del segmento de hoja quedaba sumergido y los frascos se cubrían con papel aluminio, permitiendo que el otro extremo sobresaliera del frasco. El extremo expuesto de la hoja representaba la superficie transpirable de la misma (Figura 1). Posteriormente los dispositivos se colocaban en la oscuridad por 12 h, al término de las cuales se encendía la luz y se registraba el peso a intervalos de 1 h hasta completar cinco lecturas. Con el fin de considerar las pérdidas por evaporación durante el período de obscuridad, los dispositivos se pesaban durante la hora previa al período de iluminación, y de este valor se restaban los pesos registrados durante el período de luz.

Los ensayos se efectuaron en un cuarto con luz, temperatura y humedad relativa controladas (flujo de fotones fotosintéticamente activos 210 mmol m^{-2s-1}, temperatura de 26 +/- °C y humedad relativa de 45%).

Las tasas de transpiración se expresaron en base al área de hoja expuesta (área transpirable), la cual se determinó con un medidor de área foliar. Los cálculos se efectuaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

Tasa de transpiración = (P1 - P2) / (T · A)

Donde:

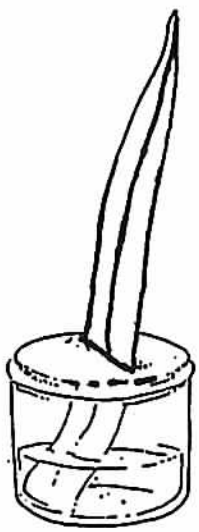
P1= Peso inicial del sistema (descontando evaporación).

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

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

A= Area foliar transpirable.

El dispositivo usado para los ensayos de transpiración se presenta en el esquema siguiente.



Modelo 2. Epidermis desprendidas de Commelina communis *L.*

Epidermis desprendidas de la superficie abaxial de hojas de *C. communis* se cortaron en segmentos de 5 mm x 10 mm y se incubaron en una solución amortiguadora (10 mM MES, 50 mM KCl, pH de 6.15) por 30 min en la oscuridad. Esta incubación garantizaba que la mayoría de los estomas se encontraran cerrados antes del análisis de los extractos. Posteriormente la incubación se continuó por otras 3 h a 25 +/- 1 °C bajo una intensidad lumínica de 280 mmol m^{-2s-1}, con burbujeo de aire libre de CO_2 a una velocidad de 8.8 ml min^{-1}. Los extracto se evaluaron adicionándolos o no (tratamiénto

control) al inicio de esta incubación. Finalmente, los segmentos de epidermis se analizaron en un microscopio digitalizador de imágenes y las aperturas de los estomas se midieron individualmente.

Análisis fisicoquímicos.

Fenoles solubles.

El contenido de compuestos fenólicos solubles se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Swain y Hillis (1959). Se mezclaron volúmenes iguales de la muestra por analizar y el reactivo de Folin-Ciocateau, y la mezcla se diluyó con 18 volúmenes de agua. La dilución se incubó 30 min a temperatura ambiente, y se determinó su absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro. La cuantificación se efectuó por comparación con curvas estándar de ácido caféico.

Potasio (K^-).

La concentración de K^- en los extractos se determinó con un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3100). En tal equipo, las muestras se asperjaron sobre la flama ionizante, a través de la cual se hizo pasar un haz de luz de 766 nm. La cantidad de K^- se determinó en base a lecturas de absorbancia.

Azúcares.

La cuantificación de azúcares totales se efectuó según Buysse y Merckx (1993), y la de azúcares reductores según Bernfeld (1955). La concentración de azúcares reductores se estimó al calcular la diferencia entre los dos valores. Para los azúcares totales, se mezclaron sucesivamente 0.1 ml de extracto, 1.9 ml de agua, 1 ml de fenol al 5 % y 5 ml de H_2SO_4, con agitación. La mezcla se dejó reposar por 10 min, se agitó y se dejó reposar 15 min adicionales. Finalmente, se registró la absorbancia a 490 nm. Para la cuantificación se usaron curvas estándar de glucosa.

Para los azúcares reductores, se mezclaron sucesivamente 0.1 ml de extracto, 1.5 ml de agua y 3 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS). La mezcla se hirvió por 5 min, se enfrió y se le adicionó 15.5 ml de agua. Se agitó y se determinó su absorbancia a 550 nm.

Conductividad y osmolaridad..

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

Resultados y discusión.

Concentración de ABA durante el desarrollo del AL.

En la Figura 10 se muestran las concentraciones de ABA en extractos de hoja (pánel a), en savia de xilema (pánel b), y en extractos de raices primarias (pánel c) y secundarias (pánel d), de plantas sanas (grado 0) y en diferentes grados de avance del AL (grados 1 al 6).

En las hojas de palmas sanas se observó que las concentraciones de ABA se mantuvieron constantes (de 1 a 2 mg g^{-1} P.S.) al ir progresando la sintomatología del AL hasta alcanzarse el grado 6, cuando éstas alcanzaron un promedio de 3 mg g^{-1} P.S. Estos resultados estuvieron de acuerdo con lo observado en un estudio previo similar (León *et al.*, 1996).

En savia de xilema, las concentraciones de ABA siguieron una tendencia similar a la observada en las hojas, aunque el aumento de concentración ocurrió más tempranamente, a partir del grado 5. En este caso, las concentraciones iniciales variaron de 0.022 a 0.229 ng ml^{-1}, y el máximo detectado fue de 0.924 ng ml^{-1}.

Con raíces secundarias, los análisis no incluyeron los grados 5 y 6 de la enfermedad puesto que en tales etapas este tipo de raíz ya ha sufrido degeneración y necrosis. En las etapas previas, la concentración de ABA se mantuvo constante en niveles de aproximadamente 0.15 mg g^{-1} P.S.

En las raíces primarias, la tendencia y los valores obtenidos para los grados 1 al 6 fue la misma que se observó en las raíces secundarias. Sin embargo, en el grado 0 se encontraron concentraciones marcadamente más elevadas, con un promedio de 1.38 mg g^{-1} P.S.

Debido a las evidencias que señalan a ABA como el principal regulador de la apertura estomática en diversas clases de estrés abiótico (Zhang *et al.*, 1989; Davies y Zhang, 1991; Schurr *et al.*, 1992), se propuso a este fitoregulador como causante del cierre anormal de estomas en palmas de coco enfermas de AL. Sin embargo nuestros resultados confirmaron lo observado en un estudio previo (León *et al.*, 1996) al mostrar que, aunque los niveles de ABA aumentaron tanto en hoja como en savia, tales aumentos ocurrieron en los grados avanzados del AL. Este comportamiento no justifica el cierre de los estomas que se presenta a partir del grado 1 de enfermedad. Los aumentos de ABA que se observaron en savia y hoja podrían estar relacionados, ya que ambos aparecieron en los grados de la enfermedad cuando el potencial hídrico de la hoja comienza a verse afectado (a partir del grado 5) (León *et al.*, *op. cit).*

Lo anterior sugiró que el aumento de ABA en savia fue una consecuencia del aumento detectado en la hoja, ya que en las raíces su concentración se mantuvo constante o, inclusive, disminuyó. Tal disminución podría deberse a las alteraciones bioquímicas y fisiológicas (disminución en la tasa de respiración y en el contenido de azúcares), que ocurren en las raíces antes de la aparición de los síntomas visuales (Islas-Flores *et al.*, en

prensa). Tales alteraciones podrían afectar el metabolismo de las raíces al grado de alterar la síntesis, e incluso provocar la degradación, de ABA.

En base a los resultados obtenidos, la posibilidad de que aparezcan en las hojas otros compuestos con actividad de cierre de estomas durante el desarrollo del AL, no puede descartarse. La presencia de tales compuestos pudo haber sido enmascarada por la actividad anti-transpiracional detectada en los extractos de hoja, la cual estuvo presente en las plantas sanas y se mantuvo a lo largo de todas las etapas de la enfermedad.

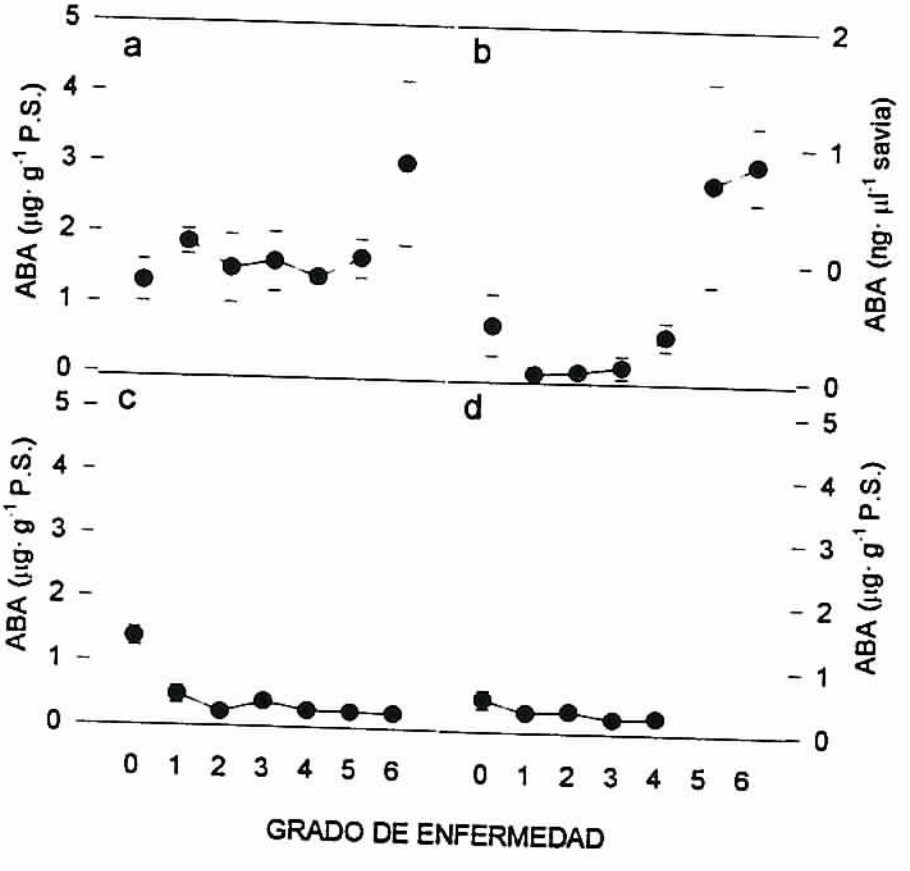


Figura 10. Concentración de ABA en hojas (a), savia de xilema (b), raices primarias (c) y raices secundarias (d), de palmas de coco en diferentes grados de desarrollo del AL. En grado 5 y 6 no se encontraron raices secundarias. El grado 0 corresponde a plantas sanas (control). Las determinaciones en hojas se realizaron de la parte media de la fronda. Cada punto representa el promedio de tres plantas con tres réplicas, y las barras la desviación estándar.

Bioensayos para la evaluación de cierre estomático.

Modelo 1: Segmentos de hojas de cocotero.

En el bioensayo de transpiración, los segmentos de hojas de cocotero mostraron respuestas dependientes de la dosis ante la aplicación de ABA, en forma tal que la transpiración disminuyó al aumentar la concentración del fitorregulador en el amortiguador (Figura 11, pánel a). Según la concentración probada, a las tres horas se observaron reducciones en la transpiración del 30% (1×10^{-8} M), 60% (1×10^{-6} M) y 95% (1×10^{-5} M). Estos resultados demostraron la utilidad del bioensayo empleado para detectar compuestos que afecten el cierre estomatal en hojas de cocoteros sanos.

Cuando se compararon los efectos de los extractos de plantas sanas con los de plantas enfermas, se encontraron cinéticas de transpiración muy similares (Figura 11, pánel b). A la tercera hora del ensayo, ambos tipos de extracto redujeron la transpiración, siendo esta reducción mayor con los extractos de plantas sanas (aproximadamente 30% del control) que con los de plantas enfermas (aproximadamente 50% del control). Ésto indica que tanto los extractos de plantas sanas como los de plantas enfermas contuvieron algún compuesto que actuó inhibiendo la transpiración en los segmentos de hoja de plantas sanas. Tal inhbidor podría haberse producido durante la extracción, a partir de modificaciones químicas o enzimáticas de compuestos naturalmente presentes en las hojas. Así mismo, los resultados indican que el (los) inhibidor (-es) de la transpiración estuvieron más diluídos en los extractos de plantas enfermas.

Modelo 2: Epidermis desprendidas de C. communis.

La capacidad del sistema experimental de responder a compuestos con actividad de cierre estomático se evaluó mediante la aplicación al mismo de concentraciones variables de ABA. En este ensayo, se observó que la apertura de los estomas disminuyó al aumentarse la dosis de ABA (Figura 12, pánel b). Para las dosis probadas, se encontraron reducciones en la apertura estomática del 20% (1×10^{-8} M), 60% (1×10^{-6} M) y 95% (1×10^{-4} M). Estos resultados demostraron la utilidad del bioensayo para detectar compuestos con actividad de cierre estomático.

Cuando se probaron los extractos de plantas sanas (grado 0) y enfermas (grados 1 al 6), se observó que todos produjeron cierres estomáticos hasta valores cercanos al 25% de la apertura del control, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 12, pánel a). Estos resultados estuvieron de acuerdo con lo observado mediante el bioensayo de transpiración.

Factores fisicoquímicos.

En la Figura 13 se muestran las concentraciones de fenoles solubles (pánel a), potasio (pánel b) y azúcares (pánel c) en los extractos de palmas de coco sanas (grado 0)

y enfermas (grados 1 al 6). La concentración de fenoles no varió significativamente durante el desarrollo de la enfermedad, manteniéndose dentro del intervalo de 20 a 30 mg g^{-1} P.S. Estos resultados sugieren que los compuestos fenólicos presentes en las hojas no contribuyen al cierre anormal de los estomas de palmas afectadas por AL.

Las concentraciones de K^- mostraron una tendencia general a disminuir durante el desarrollo de la enfermedad (grado 0, 5 mg g^{-1} P.S.; grado 6, 2 mg g^{-1} P.S.), con un aumento temporal en las primeras etapas (grados 2 y 3) cuyo máximo se observó en el grado 3 (7.5 mg g^{-1} P.S.) (Figura 13, pánel b).

Las concentraciones de azúcares no variaron significativamente durante el desarrollo del AL (Figura 13, pánel c). Los azúcares reductores se mantuvieron en valores muy cercanos a 4 mg g^{-1} P.S., mientras que las concentraciones de azúcares totales variaron de manera más irregular.

La osmolaridad (Figura 14, pánel a) y la conductividad (Figura 14, pánel b) no mostraron cambios que pudieran explicar el cierre anormal de estomas en palmas enfermas de AL. La osmolaridad varió en el intervalo entre 40 y 45 mOsm kg-1 H2O, mientras que la conductividad se mantuvo en valores muy cercanos a 4 mS.

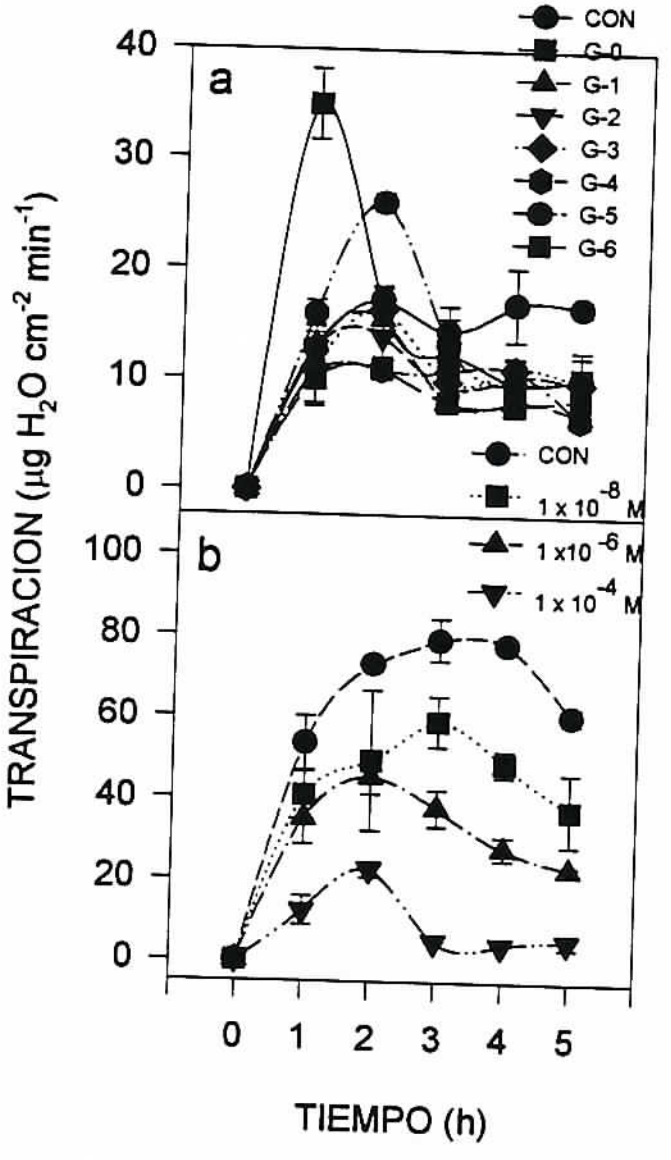


Figura 11. Cinética transpiracional de segmentos de hoja de palmas de coco sanas, las cuales se expusieron a concentraciones variables de ABA (a), o a extractos foliares de palmas de coco en diferentes grados de desarrollo del AL (G-0 a G-6) (b). G-0 representa a palmas sanas, y CON a los tratamientos control. Se analizaron hojas de la parte media de la fronda. Cada punto representa el promedio de tres segmentos de hoja con tres réplicas, y las barras la desviación estándar.

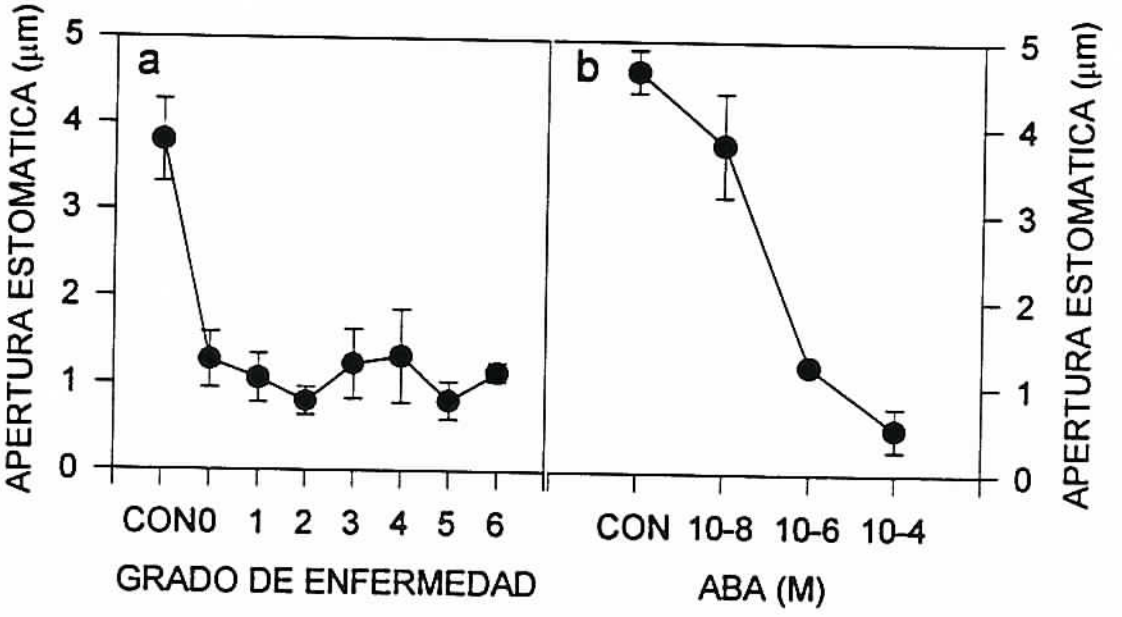


Figura 12. Apertura estomática despúes de 3 h de incubación de epidermis de *C. communis* en presencia de concentraciones variables de ABA (b), o extractos foliares de palmas de coco en diferentes grados de desarrollo del AL (a). Las epidermis se obtuvieron de plantas de 3 semanas, a partir de las hojas expandidas más jóvenes. Cada punto representa el promedio de 60 estomas con tres réplicas, y las barras la desviación estándar.

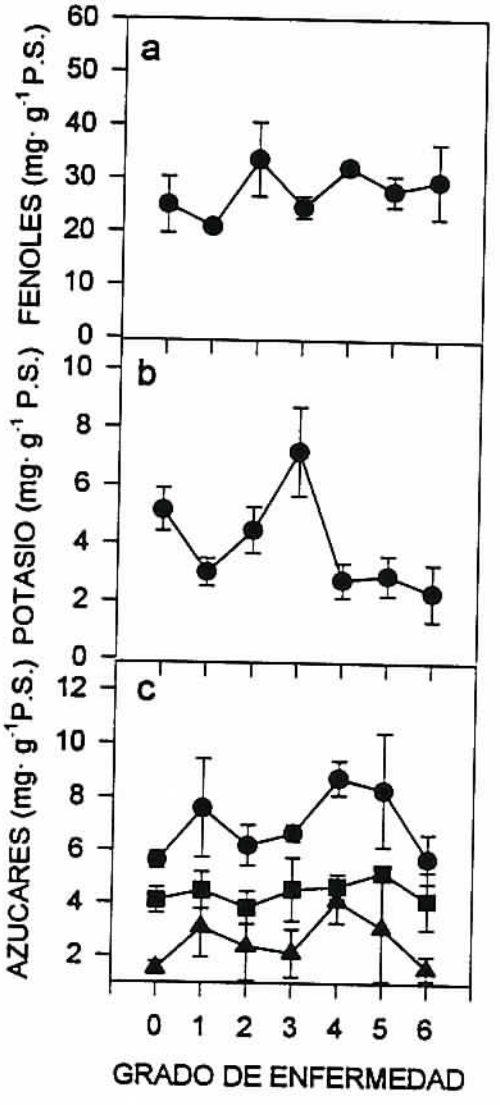


Figura 13. Concentración de fenoles solubles (a), K^- (b) y azúcares (●= totales, ■= reductores, ▲= no reductores) (c), en extractos foliares de palmas de coco en diferentes grados de desarrollo del AL. El grado 0 corresponde a plantas sanas. Las determinaciones se realizaron en hojas de la parte media de la fronda. Cada punto representa el promedio de tres plantas con tres réplicas, y las barras la desviación estándar.

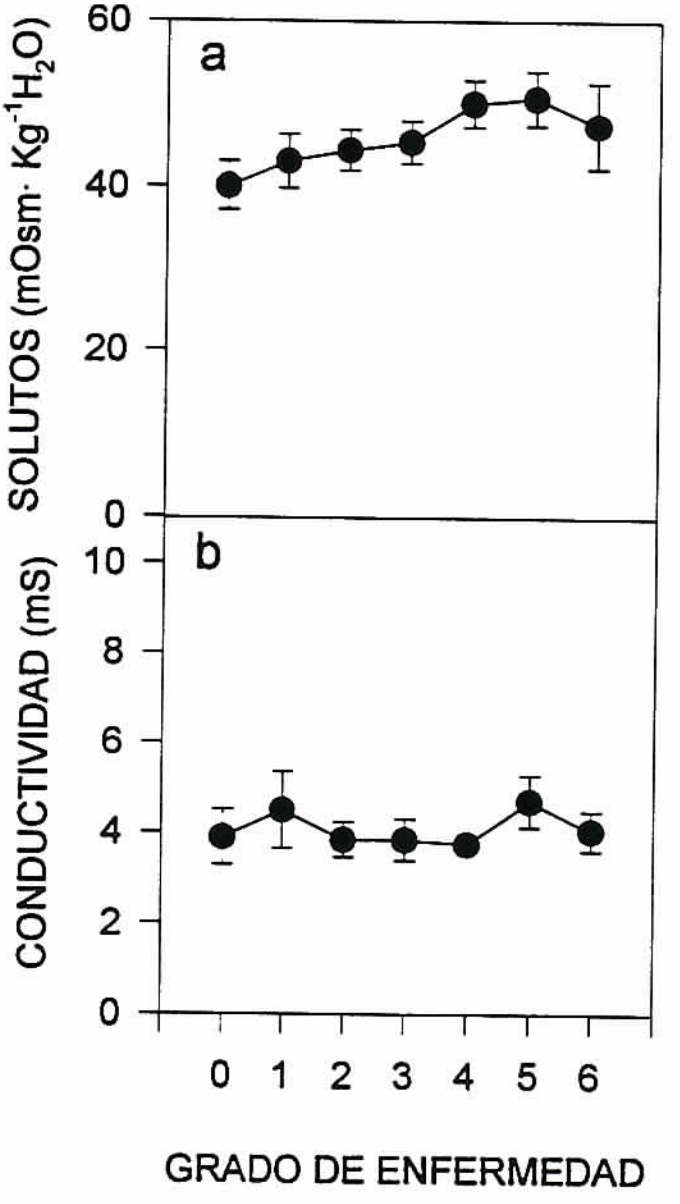


Figura 2. Osmolaridad (a) y conductividad (b) de extractos foliares de palmas de coco en diferentes grados de desarrollo del AL. El grado 0 corresponde a plantas sanas. Las determinaciones se realizaron en hojas de la parte media de la fronda. Cada punto representa el promedio de tres plantas con tres réplicas, y las barras la desviación estándar.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En este proyecto se siguieron dos estrategias para identificar posibles métodos de selección de palmas de coco resistentes al AL. La primera estrategia involucró identificar marcadores de ADN que estuvieran asociados con el carácter de resistencia. La segunda se centró en reconocer elementos clave de la resistencia a nivel bioquímico o fisiológico, que pudieran ser usados para definir diferencias entre plantas resistentes y susceptibles. Por lo tanto, la primera estrategia involucró la identificación de marcadores genéticos, y la segunda de marcadores fenéticos, de resistencia.

El diseño experimental seguido en la búsqueda de marcadores genéticos demostró ser una estrategia adecuada para identificar a algunos cuya distribución dentro de diferentes poblaciones de cocotero los señaló como asociados con resistencia al AL. Del total de decámeros probados (80), se identificó a tres capaces de generar un número igual de RAPDs potencialmente ligados con el carácter de resistencia. Además, se detectó un total de 82 polimorfismos que pueden ser usados en estudios sobre caracterización de germoplasma de cocotero. Los 12 RAPDs que aparecieron en frecuencia mínima de 0.85 en MYD o WAT podrían ser usados para diferenciar entre sí a estos genotipos y a sus híbridos, y serían por lo tanto herramientas valiosas en programas de mejoramiento basados en estos materiales (Bourdeix *et al.*, 1992). El ligamiento entre la resistencia al AL y los tres marcadores que se encontraron asociados a este carácter necesitaría ser confirmado mediante pruebas genéticas formales como el análisis de segregantes, el cual permitiría confirmar su aplicabilidad como herramientas para la selección de germoplasma resistente.

Esquemas de selección similares al probado en este estudio podrían ser aplicados a otros cultivos perennes que presenten problemas para su mejoramiento genético similares a los del cocotero, tales como tiempos de generación largos, baja producción de semillas y/o mecanismos ineficientes de propagación vegetativa. La aplicación de tales esquemas dependerá de la disponibilidad de genotipos que expresen fenotipos contrastantes para el carácter de interés. Las posibles dificultades para llevar a cabo análisis genéticos formales en tales cultivos podría significar que el uso de estrategias como la seguida en este estudio represente la alternativa más viable para identificar marcadores aplicables en la selección de características deseables.

Los análisis de diagnóstico por PCR sugirieron que la resistencia de los Enanos Malayos podría deberse a mecanismos que impedirían el transporte del patógeno desde la hoja (sitio de inoculación) hasta la inflorescencia (sitio de proliferación), y/o su establecimiento en este órgano. La aplicación reciente de la técnica de PCR con iniciadores anidados (nested PCR) al diagnóstico del AL (Harrison et al., 1999) ha abierto la posibilidad de seguir de manera más precisa la distribución de su agente causal durante el desarrollo de la enfermedad. Este tipo de análisis será de gran utilidad para elucidar el nivel al cual se expresa la resistencia al AL en el cocotero, y su aplicación dentro de nuestro grupo se inició recientemente dentro de otro proyecto financiado por el CONACYT (980107).

Los análisis de calosa, desarrollados para evaluar la posible participación de la síntesis de este glucano como un mecanismo de resistencia al AL, permitieron establecer protocolos para su detección microscópica en láminas foliares, así como para su cuantificación en extractos de estos tejidos. De las distintas modificaciones que se probaron para facilitar la observación microscópica de calosa, las siguientes mostraron los mejores resultados en cuanto a su capacidad para evitar el obscurecimiento de los tejidos, aumentar su transparencia, reducir su autofluorescencia, y mantener su procesamiento lo más breve posible:

1) Uso de hojas jóvenes.
2) Adición de mercaptoetanol al fijador (FAA).
3) Infiltración de los tejidos con el fijador mediante la aplicación de vacío.
4) Aclaramiento con mezclas de glicerol y etanol.
5) Alargamiento del tiempo de incubación en ácido periódico a una hora.

La cuantificación confiable de calosa se logró mediante la incorporación de varias modificaciones a un protocolo de extracción usado originalmente para células de soya en suspensión. Tales modificaciones permitieron eliminar la interferencia encontrada durante los análisis fluorométricos, la cual se encontró posiblemente asociada a compuestos fenólicos y a la formación de derivados de clorofilas. Los cambios introducidos involucraron lo siguiente:

1) Maceración de los tejidos con nitrógeno líquido al inicio de la extracción.
2) Substitución del amortiguador de HEPES por uno de ascorbatos.
3) Lavado de la pastilla sometida a extracción con amortiguador y éter.
4) Adición de antioxidantes durante la extracción alcalina.

La evaluación de métodos para inducir síntesis de calosa sugirió que la hoja es un tejido muy sensible a estrés mecánico, el cual fue una parte integral de todos los procedimientos evaluados. Entre éstos, la infiltración al vacío con amortiguador fue el tratamiento más simple capaz de permitir el control de las condiciones del medio durante los análisis. Sin embargo, la falta de reproducibilidad en la respuesta inducida por este tratamiento sugirió la influencia de efectos ambientales sobre la misma, e indicó la importancia de evaluar otros protocolos para lograr un análisis confiable de este posible mecanismo de resistencia al AL. Una alternativa que permitiría reducir posibles influencias ambientales durante los análisis sería trabajar con pinas que se mantendrían con la base sumergida en medio nutritivo, dentro de cuartos con condiciones controladas. En cualquier caso, los protocolos que se establecieron para el análisis de calosa representan una valiosa herramienta para determinar su posible participación dentro de la resistencia al AL.

En conjunto, los estudios fisiológicos proporcionaron evidencias de que el ABA no está involucrado en el cierre estomático asociado al AL. Esto planteó otras posibles causas, como la acción de algún otro fitorregulador, desbalances iónicos producidos por aquellos síntomas del AL que reducen la movilización de nutrientes (daño en raíces, disminución de flujo en el xilema; Dabek y Hunt, 1976), compuestos producidos por el patógeno, o cualquier otro compuesto con acción antitranspirante. La posibilidad de que alguno de los mecanismos anteriores esté participando dentro del modo de patogenicidad

del AL se evaluó mediante los análisis físicoquímicos efectuados en raíces y hojas.

Los análisis de compuestos fenólicos indicaron no mostraron alteraciones que pudieran explicar el cierre estomático observado al inicio del AL. Esta evidencia, sin embargo, no permite descartar que grupos específicos de compuestos fenólicos puedan participar como mecanismos de defensa ante el AL. Se han descrito evidencias de este tipo en otros sistemas, como es el caso de los fenoles betagarina y betavulgarina (Halloin, 1994), o ácidos benzoicos y fenilpropanoides (Kurosaki *et al.*, 1986; Neemann *et al.*, 1991). En el caso del AL, se requeriría efectuar analísis más específicos para determinar la identidad y la cantidad de los fenoles que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad.

Los análisis de K^- no permitieron atribuir alguna participación a este ion dentro del cierre estomático que ocurre al inicio del AL. El notable aumento en su concentración alcanzado en el grado 3 es contradictorio con la disminución en absorción y transporte de nutrientes que se esperarían del daño que ocurre en las raíces al inicio de la enfermedad. Se requieren estudios adicionales que expliquen la razón de este aumento inesperado. En cualquier caso, el análisis de las concentraciones citoplásmicas de K^- en las células guarda sería conclusivo para esclarecer si este ion realmente participa en el cierre estomático de las plantes enfermas de AL.

Los análisis de azúcares no mostraron alteraciones que pudieran explicar el cierre estomatal que se presenta al inicio del AL. Anteriormente se había asociado al AL con un aumento en la concentración de azúcares reductores y sacarosa, y una disminución en el contenido de almidón, concluyéndose que la enfermedad provoca desequilibrios en el metabolismo de los carbohidratos (Chen, 1966). Al respecto, lo único notable en nuestros resultados fue que las concentraciones de azúcares fueron más constantes en las palmas sanas que en los distintos grados de desarrollo de la enfermedad. Lo anterior resalta la necesidad de analizar azúcares específicos para detectar la posible participación de alguno de ellos con el cierre de los estomas. También en este caso, la realización de tales análisis a nivel del citoplasma de las células guarda representaría el medio más directo para determinar relaciones de causalidad.

Los análisis de conductividad y osmolaridad se plantearon como un medio adicional para detectar posibles desbalances en la concentración de compuestos que afecten el potencial osmótico de la hoja (azúcares, por ejemplo), o algún desequilibrio iónico (K^-?). Aunque estas técnicas son bastante inespecíficas, sus resultados estuvieron de acuerdo con los de los análisis de azúcares y K^-. Es decir, no se encontraron alteraciones que pudieran asociarse con el cierre estomático que ocurre al inicio del AL. Por lo tanto, se hace necesario efectuar pruebas específicas para la detección y cuantificación de compuestos que pudieran estar afectando la osmolaridad de la hoja. En este contexto, el análisis de nitrógeno (N) y fósforo (P) se presenta como una alternativa de interés, pues la deficiencia de estos nutrientes se ha encontrado asociada con disminuciones en la conductancia estomática (Radin *et al.*, 1982; Radin, 1984).

PRODUCTOS

PUBLICACIONES.

•Cardeña, R., G.R. Ashburner y C. Oropeza (1998) Identificación de marcadores moleculares con uso potencial en la selección de palmas de coco resistentes al amarillamiento letal. En: SAGAR, Gobierno del estado de Guerrero, Fundación Produce de Guerrero A.C., INIFAP (Eds.) I Reunión Nacional de Palma de Coco (Memorias de una serie de conferencias). Acapulco, Guerrero, México.

•Cardeña, R., C. Oropeza. and G.R. Ashburner (1999) Prospects for marker-assisted breeding of lethal yellowing-resistant coconuts. In: C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña and J.M. Santamaría (Eds.) Recent Advances in Coconut Biotechnology, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

•Martínez, S., I. Córdova, B.E. Maust, C. Trejo, C. Oropeza and J.M. Santamaría. Is abscisic acid responsible for abnormal stomatal closure in coconut palms showing lethal yellowing? Sometido a Journal of Plant Physiology (Ref. MS#98-12-20).

TESIS.

•Cardeña, R. (1998) Identification of biochemical and molecular markers with potential application in the genetic improvement of coconut palms. Tesis de doctorado (Biotecnología de Plantas). Centro de Investigación Científica de Yucatán.

•Narváez, M. del S. (1999) Establecimiento de protocolos para evaluar síntesis de calosa en hojas de cocotero. Tesis de licenciatura (Químico Biólogo Bromatólogo). Universidad Autónoma de Yucatán.

•Martínez, S. Papel del ácido abscísico en el comportamiento estomático de palmas (*Cocos nucifera* L.) afectadas por el amarillamiento letal. Tesis de maestría (Biotecnología de plantas; aceptada para su defensa, fecha de examen en trámite). Centro de Investigación Científica de Yucatán.

REFERENCIAS

Ashburner, G.R. and B.O. Been (1997) Characterisation of resistance to lethal yellowing in *Cocos nucifera* and implications for genetic improvement of this species in the Caribbean region. In: Eden-Green, S.J. and F. Ofori (Eds.) Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut. NRI, Chatham, pp. 173-183.

Banks, F.M. (1994) Identifying RAPD markers in coconut palms which have a potential use in breeding programmes to combat lethal yellowing disease. M.Sc. Thesis, University of Bristol, U.K.

Bayles, C.J., M.S. Ghemawat and J.R. Aist (1990) Inhibition by 2 deoxy-D-glucose of callose formation, papilla deposition, and resistance to powdery mildew in an *ml-o* barley mutant. Physiol. Mol. Plant P 36: 63 - 72.

Been, B.O. (1981) Observations on field resistance to lethal yellowing in coconut varieties and hybrids in Jamaica. Oléagineux 36: 9-11.

Been, B.O. (1995) Integrated pest management for the control of lethal yellowing: quarantine, cultural practices and optimal use of hybrids. In: Oropeza, C., F.W. Howard and G.R. Ashburner (Eds.) Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 101-109.

Bernfeld, P. (1955) Methods Enzymol. 1: 149-158.

Bourdeix, R., Y.P.N'Cho, A. Sangare, L. Baudoin and M. de Nuce de Lamothe (1992) L'hybride de cocotier PB121 amelioré, croisement de Nain Jaune Malais et de géniteurs Grand Ouest Africain sélectionnés. Oléagineux 47: 620-633.

Buysse, J. and R. Merckx (1993) An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. J. Exp. Bot. 44: 1627-1629.

Cardeña, R. (1998) Identification of biochemical and molecular markers with potential application in the genetic improvement of coconut palms. Tesis doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

Cardeña, R., C. Oropeza and D. Zizumbo (1998) Leaf proteins as markers useful in the genetic improvement of coconut palms. Euphytica 102: 81 - 86.

Chan, J.L., L. Sáenz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17: 515 - 521.

Chen, R.A. (1966) Nutricional aspects of lethal yellowing in coconuts. Trop. Agric. Trin. 43: 211-218.

Dabek, A.J. and P. Hunt (1976) Biochemistry of leaf senescence in coconut lethal

yellowing, a disease associated with mycoplasma-like organisms. Trop. Agric. 53: 115-123.

Davies, W.J. and 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.

Dery, S.K., Y.P.N'Cho, A. Sangare and E.D. Arkhurst (1997) Cape St Paul wilt disease: Resistance screening and prospects for rehabilitating the coconut industry in Ghana. In: Eden-Green, S.J. and F. Ofori (Eds.) Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut. NRI, Chatham, pp. 147-151.

Eden-Green, S.J. (1997) History, world distribution and present status of lethal yellowing-like diseases. In: Eden-Green, S.J. and F. Ofori (Eds.) Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut. NRI, Chatham, pp. 9-26.

Escamilla, J.A., N.A. Harrison, H. Nuñez, L. Alpizar, I. Cordova, I. Islas-Flores and C. Oropeza (1995) Practical use of DNA probes for the detection of lethal yellowing of *Cocos nucifera* L. in Mexico. In: Oropeza, C., F.W. Howard and G.R. Ashburner (Eds.) Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 93-100.

Freialdenhoven, A., C. Peterthansel, J. Kurth, F. Kreuzaler and P. Schulze-Lefert (1996) Identification of genes required for function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. The Plant Cell 8: 5-14.

Gaviño, G., J.C. Juárez y H.H. Figueroa (1980) Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo. Limusa, México, pp. 57 - 80.

Halloin, J. (1994) Localization of phenolic compounds in crowns and roots of healthy and *Rhizoctonia solani*-infected sugar beets. Plant Sci. 99: 223-228.

Harrison, N.A., I. Cordova, P. Richardson and R. Dibonito (1999) Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: Oropeza, C., J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña and J.M. Santamaria (Eds). Current Advances in Coconut Biotenhnology. Kluwer Academic Publichers. Dordrecht, The Netherlands.

Hoagland, D.R. and D.I. Amon (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Current 347, Calif. Agr.Expt. Sta.

Islas-Flores, I., J.M. Santamaría, I. Cordova and C. Oropeza (1999) Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera* L.) affected by lethal yellowing. J. Plant Physiol. (in press).

Köhle, H., W. Jeblick, F. Poten, W. Blaschek and H. Kauss (1985) Chitosan elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2-} dependent process. Plant Physiol. 77: 544-551.

Köhle, H., D.H. Young and H. Kauss (1983) Physiological changes in suspension cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. Plant Sci. Lett. 33: 221- 230.

Kullaya, A., A. Mpunami, H.C. Harries, M. Schuiling and D.A. Kaiza (1997) Lethal disease resistance screening in Tanzania and Prospects for rehabilitation. In: Eden-Green, S.J. and F. Ofori (Eds.) Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut. NRI, Chatham, pp. 163-172.

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, I.R. (1990) Aspectos fisiológicos y relaciones hídricas de *Cocos nucifera* L. afectadas por el Amarillamiento Letal. Tesis de Licenciatura (Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia). Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2, Conkal, Yucatán, México.

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.

Manciot, R. (1978) Programme de recherches pour la regeneration et l'intensification de la production de la cocoteraie du Guerrero (Mexique). Doc. no. 1394. IRHO. 11 Square Petrarque 75016, Paris.

McCoy, R.E. (1973) Effect of various antibiotics on development of lethal yellowing in coconut palm. Proc. Florida State Hortic. Soc. 83: 503-506.

Meunier, J. (1982) Visit to Impulsora Guerrerense del cocotero. Internal report. IRHO. 11 Square Petrarque 75016, Paris.

Michelmore, R.W, L. Paran and R.V. Kesseli (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9828-9832.

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.

Oropeza, C. and D. Zizumbo (1997) History of lethal yellowing in Mexico. In: Eden-Green, S.J. and F. Ofori (Eds.) Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Diseases of Coconut. NRI, Chatham, 1997, pp. 69-76.

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 Yelowing Research and Practical Aspects. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 65-76.

Piña, P. (1993) Estudio poblacional de *Myndus crudus* van Duzee (Homoptera: Cixiidae) vector del amarillamiento letal del cocotero en el Estado de Yucatán. Tesis de licenciatura (Biologia), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, México.

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.

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 sesitivity to abscisic acid. Plant Physiol. 70: 1066-1070.

Rogers, S.O. and A.J. Bendich (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. Plant Mol. Biol. 5: 69-76.

Sangare, A., G. de Taffin, H. de Franqueville, E.D. Arkhurst and M. Pomier (1992) Coconut lethal yellowing in Ghana: Initial results on planting material performance in the field. Oléagineux 47: 699-704.

Schuiling, M., A. Mpunami, D.A. Kaiza and H.C. Harries (1992) Lethal disease of the coconut palm in Tanzania: III.- Low resistance of imported germplasm. Oléagineux 47: 693-697.

Schuiling, M., F. Nienhaus and D.A. Kaiza (1981). The syndrome in coconut palms affected by a lethal disease in Tanzania. Z. Pflznkrank Pflznschutz 85: 665-677.

Schurr, U., T. Gollan and E.D. Schulze (1992). Stomatal response to drying soil in relation 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.

Swain, T. and W. Hillis (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica.* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 63-68.

Waugh, R. and W. Powell (1992) Using RAPD markers for crop improvement. TIBTECH 10: 186-191.

Weyers, J. and H. Meidner (1990). Methods in stomatal research. Harlow: Longman. Scientific and Technical, London.

White, A., P. Handler, E.L. Smith, R.L. Hill y I.R. Lehman (1978). Principios de Bioquímica. 6a. edición (2a. edición en español). McGraw Hill.

Wissemeier, A.H., A. Hergenröder, G. Mix-Wagner and W.J. Horst (1993) Induction of callose formation by manganese in cell suspension culture and leaves of soybean (*Glycine max* L.). J. Plant Physiol. 142: 67 - 73.

Zhang, G. and G.J. Taylor (1988) Effect of aluminum on growth and distribution of aluminum in tolerant and sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 19: 1195-1205.

Zhang, G. and G.J. Taylor (1989) Kinetics of aluminum uptake by excised roots of

aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. Plant Physiol. 91: 1094 - 1099.

Zizumbo, D. (1997) El cocotero en México: Historia, variación morfo-fisiológica y diversidad genética. Tesis doctoral, Instituto de Ecología, UACPyP/CCH, México.

Zizumbo, D., M. Fernández and R. Cardeña (1999) Evaluation of lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. In: Oropeza, C., J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña and J.M. Santamaría (Eds). Current Advances in Coconut Biotenhnology. Kluwer Academic Publichers. Dordrecht, The Netherlands.

Zizumbo-Villarreal, D. and D. Piñero (1998) Pattern of morphological variation and diversity of *Cocos nucifera* (Arecaceae) in Mexico. Amer. J. Bot. 85: 855-865.