

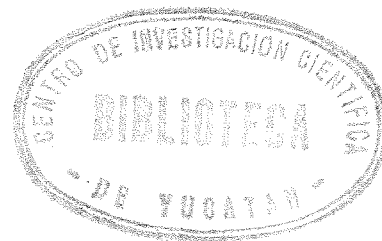


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA
EVALUAR SINTESIS DE CALOSA EN
HOJAS DE COCOTERO**

TESIS



PRESENTADA POR:

Maria del Socorro Narvaez Cab

**EN SU EXAMEN PROFESIONAL
EN OPCION AL TITULO DE:**

QUIMICO BIOLOGO BROMATOLOGO

MERIDA, YUCATAN, MEXICO.

1 9 9 9

ÍNDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
El cocotero	2
Importancia de su cultivo	2
Descripción Botánica	3
Clasificación	4
Variedades	4
El Amarillamiento Letal	
Origen y Distribución	6
Agente Causal	7
Transmisión	7
Sintomatología	9
Plantas resistentes al amarillamiento letal	9
La Calosa	
Generalidades	11
Inducción de la síntesis de calosa por agentes químicos	13
Participación de calosa en resistencia a patógenos	14
Síntesis de calosa y resistencia al amarillamiento letal	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	
Material biológico	20
Establecimiento de condiciones para el análisis de calosa por microscopía	
Aplicabilidad de un protocolo de tinción mediante azul de anilina	20
Pruebas de fijación	21
Uso de técnicas de aclaramiento	23
Optimización de la reacción con ácido periódico y reactivo de Schiff	25
Fluorometría	

Selección de un protocolo de inducción	30
--	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microscopía

Detección de calosa con azul de anilina	32
---	----

Fijación	34
----------	----

Aclaramiento	35
--------------	----

Optimización de la reacción con ácido periódico y reactivo de Schiff	36
--	----

Fluorometría

Extracción de calosa	39
----------------------	----

Inducción de calosa	43
---------------------	----

CONCLUSIONES	45
---------------------	----

REFERENCIAS	47
--------------------	----

RESUMEN

Con el propósito de establecer un bioensayo que permita determinar el papel de la síntesis de calosa en la resistencia al amarillamiento letal, se usó el fluorocromo azul de anilina para estudiar la síntesis de este glucano en tejidos foliares de cocotero. Con este fin, se optimizaron técnicas de microscopía y fluorometría previamente descritas, y se evaluó el efecto de cuatro condiciones que han mostrado su eficacia para inducir síntesis de calosa en distintos modelos experimentales (daño mecánico, o incubación en quitosano o concentraciones altas de Al o Mn).

En los análisis de microscopía, la confiabilidad de las condiciones de tinción se corroboró mediante su capacidad para mostrar acumulaciones de calosa en tejidos afectados por el amarillamiento letal. De las distintas modificaciones probadas para la fijación, el aclaramiento y la reducción de autofluorescencia, se seleccionaron las siguientes: uso de hojas jóvenes, adición de mercaptoetanol al fijador (FAA), infiltración de los tejidos con el fijador mediante la aplicación de vacío, aclaramiento con mezclas de glicerol y etanol, y alargamiento del tiempo de incubación en ácido periódico a una hora.

La obtención de extractos que permitieran la cuantificación confiable de calosa se logró a través de la introducción de numerosas modificaciones, las cuales permitieron eliminar la interferencia encontrada inicialmente en los análisis fluorométricos. Los cambios introducidos incluyeron: maceración de los tejidos con nitrógeno líquido al inicio de la extracción, sustitución del amortiguador de HEPES por uno de ascorbatos, incorporación de dos etapas de extracción adicionales (una con amortiguador, la otra con éter), y uso de antioxidantes durante la extracción alcalina.

Los cuatro tratamientos probados para inducir síntesis de calosa causaron un aumento del 12 por ciento en su concentración después del primer día, y en los tres días posteriores se observaron velocidades de aumento menos importantes. El control de los tratamientos de incubación mostró variaciones similares. Puesto que en todos estos casos los tejidos analizados sufrieron cierto daño mecánico inherente a las condiciones experimentales, los resultados sugieren que la hoja es un tejido muy sensible a este tipo de estrés. De las condiciones que indujeron síntesis de calosa, la incubación con amortiguador libre de quitosano, Mn o Al, representa el tratamiento más simple capaz de permitir el control de las condiciones del medio durante el tratamiento. Por lo tanto, se propone este procedimiento como un punto de partida para estudios subsiguientes.