

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE LA
INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO EN PALMA DE ACEITE *Elaeis
guinensis* Jacq. EN ESTADO SANO E INTERMEDIO DE
PUDRICIÓN DE COGOLLO**

ROSA LUDY RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Qca

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE LA
INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO EN PALMA DE ACEITE *Elaeis
guinensis* Jacq. EN ESTADO SANO E INTERMEDIO DE
PUDRICIÓN DE COGOLLO**

ROSA LUDY RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, *Qca*

**Trabajo de investigación para optar el título de:
Magister en Química**

**Directora: Dra. STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ
Codirectora: M.Sc LUZ YOLANDA VARGAS FIALLO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

A Dios, por darme las capacidades físicas y mentales

A mi padre Angelmiro, aunque ya no estés físicamente tus enseñanzas siguen inspirándome

A mi madre Amanda, por su amor, apoyo, comprensión, dedicación y fortaleza

A mi amor, por animarme día a día con su compañía, sus palabras y sus actos

A Fernando, por animarme a iniciar la maestría

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

A la profesora Stelia Carolina Méndez S, PhD, Directora de este proyecto, por hacerme parte de su equipo de trabajo, por darme sus ideas, su conocimiento y por su valiosa orientación, pero en especial por su acompañamiento permanente en cada una de las etapas de ésta investigación.

A la profesora Yolanda Vargas, Ms, Codirectora de este proyecto, por su apoyo constante a mi labor como química

A la VIE - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER por brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de ésta investigación.

A CENIPALMA por brindarme el material vegetal para el desarrollo de ésta investigación.

A Luis Villareal, por sus valiosos conocimientos acerca de la colecta de material vegetal adecuado para los análisis realizados.

A Aurora Carreño, por su invaluable ayuda en la construcción de este libro.

Al Grupo de investigación en bioquímica y Microbiología de la UIS por brindarme la infraestructura necesaria para la realización de ésta investigación.

A Alexander Rodríguez y Jenifer Tibabuiza por su acompañamiento en los viajes de colecta de material vegetal

A mis compañeros de bioenergética mitocondrial (Diana, Viviana, Natalia), por compartir gratas horas de trabajo y por brindarme su valiosa ayuda.

Finalmente agradezco a todos aquellos que han apoyado mis ideas y actos a lo largo de mi vida (familiares y amigos).

CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	18
2. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 LA PALMA DE ACEITE:	21
2.2. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD PUDRICIÓN DE COGOLLO EN LAS ZONAS COLOMBIANAS.....	24
2.2.1 Descripción y Sintomatología de la PC	26
2.2.2 Causas de la PC en Palmas de Aceite	26
2.3 SUELO, FERTILIDAD DEL SUELO Y NUTRICION MINERAL.....	30
2.3.1 La fertilidad del suelo:	31
2.3.2 Propiedades físicas del suelo:	31
2.3.3 Propiedades Químicas.....	33
2.3.3.1 Reacción del suelo (pH):	33
2.3.3.2 Aluminio (Al).....	35
2.3.3.3 Materia Orgánica del Suelo (MO):.....	38
2.3.3.4 La capacidad de intercambio catiónico (CIC).	39
2.3.4 Nutrientes Minerales	40
2.3.4.1 Elementos mayores o macronutrientes:.....	40
2.3.4.2 Elementos Secundarios.....	46
2.3.4.3 Micronutrientes.....	55
2.4 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	67
2.4.1 Transporte de electrones en la mitocondria.	69
2.5 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.....	74
2.6 PROTEÍNAS DE DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL EN PLANTAS (UCP).....	77
2.7. DAÑOS EN FOSFOLÍPIDOS Y PROTEINAS POR ESTRÉS OXIDATIVO.....	79
2.8 ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	81
2.8.1 Superóxido dismutasa (SOD):	82
2.8.2 Catalasa (CAT):.....	83
2.8.3. Glutathiona reductasa (GR):	83
2.8.4 Glutathiona Peroxidasa (GPX):.....	83
2.9 TRANSPORTE DE CALCIO EN PLANTAS.....	84

3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	88
4.	HIPOTESIS	89
5.	OBJETIVOS	90
5.1	GENERAL.....	90
5.2	ESPECÍFICOS	90
6.	METODOLOGÍA.....	91
6.1	SUELO:.....	91
6.1.1	pH: Método potenciométrico. Relación suelo: agua(1:1).....	92
6.1.2	Acidez intercambiable:.....	92
6.1.3	Bases (calcio, magnesio, potasio y sodio):	93
6.1.4	Elementos menores (hierro, manganeso, zinc y cobre):	94
6.1.5	Capacidad de intercambio catiónico (CIC):.....	94
6.1.6	Fosforo (P):.....	95
6.1.7	Azufre	96
6.1.8	Boro:.....	97
6.2	Tejido vegetal, cogollo y meristemo de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	98
6.2.1	Determinación de micro y macronutrientes en tejido vegetal.	98
6.2.2	Determinación por microscopia Electrónica (SEM).....	99
6.3	CÉLULAS DE COGOLLO Y MERISTEMO DE PALMA DE ACEITE	100
6.3.1	Aislamiento de mitocondrias de cogollo y meristemo de palma de aceite.	100
6.3.2	Determinación del consumo de oxígeno	100
6.3.3	Determinación de la captación y liberación de calcio por las mitocondrias.	101
6.4	DETERMINACIÓN ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.	101
6.4.1	Superóxido Dismutasa (SOD).....	101
6.4.2	Catalasa (CAT).....	101
6.4.3	Glutaciona Peroxidasa (Gpx).....	102
6.4.4	Glutaciona Reductasa (Gred)	102
6.5	MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA.....	102
6.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
7.1	NUTRICIÓN	103

7.2 ANÁLISIS DE TEJIDOS VEGETALES DE PALMA <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. UTILIZANDO MICROSCOPIA SEM.....	122
7.3 BIOENERGÉTICA EN PLANTAS.....	126
7.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y LIPOPEROXIDACIÓN	136
7.5 TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS ENERGIZADAS DE PALMA.....	139
8. CONCLUSIONES.....	141
BIBLIOGRAFÍA.....	143

LISTADO DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Hectáreas sembradas con palma de aceite en Colombia, desde 1964 - 2008.	22
Figura 2. Zonas de producción de palma de aceite en Colombia	24
Figura 3. Disponibilidad de los nutrientes en función del pH del suelo.	34
Figura 4. Representación esquemática de la secuencia de asimilación denitrato en las células de las hojas.	41
Figura 5. Funciones y distribución del nitrógeno en la planta.	42
Figura 6. Funciones y distribución del fósforo en las plantas.	43
Figura 7. Funciones y distribución del potasio en las plantas.	45
Figura 8. Funciones y distribución del azufre en las plantas.	46
Figura 9. Síntesis de la glutatona (GSH).	48
Figura 10. Funciones y distribución del magnesio	48
Figura 11. Funciones y distribución del calcio en la planta.	50
Figura 12. Biosíntesis de la clorofila y las proteínas hemo.	56
Figura 13. Las peroxidasas y la formación de lignina.	57
Figura 14. La ferredoxina y la transferencia de electrones.	58
Figura 15. La reacción de Hill	59
Figura 16. El manganeso como cofactor en el ciclo de los ácidos tricarbónicos	60
Figura 17. Flujo electrónico fotosintético (función plastocianina)	62
Figura 18. Función del Cu en la transformación de fenol	63
Figura 19. Intervención del zinc en la detoxificación de los radicales superóxido y los efectos de los radicales libres en la función de la membrana y el metabolismo del AIA	65
Figura 20. Rol del boro en el metabolismo del fenol y la biosíntesis de lignina.	67

Figura 21. Estructura mitocondrial A-estructura tridimensional, B-micrografía electrónica.	68
Figura 22. Complejos proteínicos de la cadena respiratoria mitocondrial.	70
Figura 23. Cadena de transporte electrónico en plantas, oxidasas alternativas	73
Figura 24. Reacciones de generación de las especies reactivas de oxígeno (ERO)	76
Figura 25. Reacción en el proceso de lipoperoxidación.	80
Figura 26. ERO y mecanismos de defensa antioxidantes.	81
Figura 27. Vías de flujo de calcio la mitocondria y sus inhibidores específicos.	87
Figura 28. Resultados análisis de suelos.	105
Figura 29. Contenido de nitrógeno en tejidos de Palma <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	105
Figura 30. Contenido de fosforo en tejidos de Palma <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	108
Figura 31. Contenido de Potasio en tejidos de Palma <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	109
Figura 32. Contenido de Calcio en tejidos de Palma <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	110
Figura 33. Contenido de Magnesio en tejidos de palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq.	113
Figura 34. Contenido de azufre en tejidos de Palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq.	114
Figura 35. Contenido de hierro en tejidos de Palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq.	115
Figura 36. Contenido de manganeso en tejidos de Palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq.	116
Figura 37. Contenido de cobre en tejidos de Palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq	117
Figura 38. Contenido de zinc en tejidos de Palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq.	118
Figura 39. Contenido de boro en tejidos de Palma <i>Eleais guineensis</i> Jacq	119
Figura 40. Tejido de hoja sin necrosis aparente y con necrosis en palma enferma	122
Figura 41. Tejido de hoja con necrosis en palma enferma	122
Figura 42. Tejido de hoja con necrosis en palma enferma con aparente entra de patógeno	123
Figura 43. Tejido de hoja sin necrosis en palma enferma	123

Figura 44. Meristemas sano con presencia aparente de Patógeno.	124
Figura 45. Meristemo Palma enferma	124
Figura 46. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma sana, energizada con malato y glutamato.	126
Figura 47. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma sana, energizada con succinato.	127
Figura 48. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma enferma, energizada con malato y glutamato.	129
Figura 49. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma enferma, energizada con succinato.	130
Figura 50. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma sana y posterior adición de ácido oléico.	131
Figura 51. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma enferma y posterior adición de ácido oléico.	132
Figura 52. Mitocondrias de palma sana, en presencia de cianuro y SHAM.	133
Figura 53. Mitocondrias de palma enferma, en presencia de cianuro y SHAM.	134
Figura 54. Lipoperoxidacion	136
Figura 55. Superoxido dismutasa (SOD)	137
Figura 56. Catalasa (CAT)	137
Figura 57. Glutaciona Reductasa	138
Figura 58. Transporte de calcio en las mitocondrias de palmas de aceite <i>Elaeis guineensis</i> Jacq	139

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Proyecciones de Área sembrada y producción de Aceite de palma Colombia.	22
Tabla 2. Estrategia de defensa contra el estrés oxidativo en mitocondrias de plantas	77
Tabla 3. Material Vegetal.	103
Tabla 4. Fertilización.	104
Tabla 5. Liberación en calcio en presencia de FCCP	140

ABREVIATURAS:

ADP	Adenosin 5'-difosfato
ATP	Adenosin 5'-trifosfato
BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	Albumina bovina sérica
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico
CTP	Citidina trifosfato
Cys	Cisteína
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol bis(éter 2-aminoetil)-N,N,N',N' tetracético
ELC	Extracto libre de células
EPL	Endoperóxido lipídico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FCCP	Carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazona
FL	Fosfolípidos
Gpx	Glutaciona peroxidasa
Gred	Glutaciona reductasa
GSH	Glutaciona reducida
GSSG	Glutaciona oxidada
GTP	Guanosin trifosfato
Ha	Hectárea
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanosulfónico
HPL	Hidroxiperóxido lipídico
IP6	Inositol hexa fosfato
ICA	Instituto Colombiano de Agricultura

MDA	Malondialdehído
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido reducida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducida
NBT	nitroazul de tetrazolio
NO [•]	Oxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
[•] OH	Radical hidroxilo
[•] ONOO ⁻	Peroxinitrito
PC	Pudrición de Cogollo
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	fosfato inorgánico
PP	pirofosfato
UDP	Uridina Difosfato

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE LA INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO EN PALMA DE ACEITE *Elaeis guineensis Jacq.* EN ESTADO SANO E INTERMEDIO DE PUDRICIÓN DE COGOLLO*

Autor: RODRIGUEZ RODRIGUEZ, Rosa Ludy**

Palabras Claves: Palma de aceite, pudrición de cogollo, interaccion planta-patogeno

CONTENIDO:

La enfermedad conocida como “pudrición de cogollo” (PC) es una enfermedad que afecta el cultivo de palma de aceite, cultivo que produce el segundo aceite más consumido a nivel mundial y es el cuarto en hectáreas sembradas en Colombia. Este es un problema que viene presentándose hace más de 30 años y que aún no tiene una solución clara. Se han presentado dos hipótesis para explicar por qué las palmas se infectan, una biótica en la que se hace referencia al patógeno (que en el 2008 Cenipalma logró identificar como pseudohongo *Phytophthora Palmivora*) como el agente causal; y otra abiótica que hace referencia a un complejo de factores climáticos y edáficos.

Sin embargo ninguna de las dos hipótesis es completamente satisfactoria y no han contribuido al planteamiento de métodos adecuados para el control de la enfermedad.

En este estudio proponemos contribuir al conocimiento de la enfermedad a través de una caracterización química y bioquímica de factores que influyen la interacción planta-patógeno. Se planteó estudiar 2 grupos de palmas (sanas y con grado medio de PC) en un área donde sea confirmada la presencia del patógeno. Entre las estrategias presentadas se encuentran la determinación de la concentración de macro y micronutrientes en suelo, la presencia de estos iones en tejido vegetal, el transporte de calcio y la actividad de enzimas antioxidantes en células obtenidas del cogollo y meristemo de las palmas, así como los daños sufridos sobre la bioenergética mitocondrial en las palmas afectadas.

*Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora Stelia Carolina Mendez

ABSTRACT

TITLE: CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF PLANT PATHOGEN INTERACTION IN OIL PALM *Elaeis guinensis* Jacq. IN A HEALTHY STATE AND INTERMEDIATE BUD ROT *

Author: RODRIGUEZ RODRIGUEZ, Rosa Ludy **

Keywords: palm oil, bud rot, plant-pathogen interaction

CONTENTS:

The disease known as "bud rot" (PC) is a disease affecting the cultivation of oil palm cultivation that produces the second most consumed oil in the world and is the fourth in hectares in Colombia. This is a problem that is appearing over 30 years ago and still do not have a clear solution. There have been two hypotheses to explain why the palms are infected, a biotic which refers to the pathogen (which in 2008 was identified by Cenipalma as pseudohongo *Phytophthora palmivora*) as the causative agent, and other abiotic refers to a complex climatic and edaphic factors.

However neither hypothesis is not completely satisfactory and have not contributed to methods suitable approach for disease control.

In this study we propose to contribute to the understanding of the disease through chemical and biochemical characterization of factors influencing plant-pathogen interaction. It was proposed to study two groups of palms (healthy and average degree of PC) in an area where it confirmed the presence of the pathogen. Strategies are presented determining the concentration of macro and micronutrients in the soil, the presence of these ions in plant tissue, calcium transport and the activity of the antioxidant enzymes in cells obtained from the shoot meristem of palms and also damage on mitochondrial bioenergetics affected palms.

*Work Degree

**Universidad Industrial de Santander. Faculty of Sciences. Department of Chemistry. Directed by: Stelia Carolina Méndez S, PhD.

1. INTRODUCCION

La enfermedad conocida como “pudrición de cogollo” (PC) es una enfermedad que afecta el cultivo de palma de aceite, cultivo que produce el segundo aceite más consumido a nivel mundial y es el cuarto en hectáreas sembradas en Colombia.

La enfermedad PC ha devastado gran cantidad de hectáreas y puestos de trabajo en las zonas en las cuales se ha propagado, llegando a convertirse en una emergencia fitosanitaria en el año 2010. Este es un problema que viene presentándose hace más de 30 años y que aún no tiene una solución clara. Se han presentado dos hipótesis para explicar por qué las palmas se infectan, una biótica en la que se hace referencia al patógeno (que en el 2008 Cenipalma logró identificar como pseudohongo *Phytophthora Palmivora*) como el agente causal; y otra abiótica que hace referencia a un complejo de factores climáticos y edáficos. Sin embargo ninguna de las dos hipótesis es completamente satisfactoria y no han contribuido al planteamiento de métodos adecuados para el control de la enfermedad.

La búsqueda de bases que soporten que ambas hipótesis convergen para generar esta enfermedad, es decir que son complementarias y necesarias para el desarrollo de la PC, llevó al desarrollo y empleo de técnicas que permitieran determinar, primero, la cantidad de nutrientes y microelementos presente en suelos, tejidos jóvenes y meristemas apicales, en palmas con síntomas de la enfermedad en su forma más temprana vs palmas sanas, y segundo estudiar la bioenergética mitocondrial, dentro de la cual se incluye la respiración mitocondrial, pilar importante para nuestra investigación ya que permite evaluar las respuestas adaptativas ante el estrés biótico o abiótico de palmas sanas y enfermas, ya que en las primeras se reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), mientras que en las enfermas, como respuesta a la PC, estas especies se ven aumentadas.

La respuesta hipersensible de la palma, que envuelve la producción de ERO, le lleva activar canales para aumentar la expresión y/o la actividad de enzimas antioxidantes que evitan la lipoperoxidación de los tejidos, generada por la alta cantidad de ERO. El balance que se presenta en las palmas busca regular tanto la cantidad de ERO como de enzimas antioxidantes, permitiendo generar una respuesta efectiva frente al patógeno sin llegar a la lipoperoxidación y evitar así la necrosis de los tejidos.

Adicionalmente se evaluó el transporte de calcio a nivel celular, específicamente a nivel mitocondrial. El calcio es un ión usado como mensajero secundario (que media las respuestas frente al estrés), observando en las palmas sanas una absorción mayor y una menor liberación del ión, lo que permite inferir que las palmas sanas mantienen bajas las concentraciones de calcio citoplasmático.

En este estudio proponemos contribuir al conocimiento de la enfermedad a través de una caracterización química y bioquímica de factores que influyen en la interacción planta-patógeno. Se planteó estudiar 2 grupos de palmas (sanas y con grado medio de PC) en un área donde sea confirmada la presencia del patógeno. Entre las estrategias presentadas se encuentran la determinación de la concentración de macro y micronutrientes en suelo, la presencia de estos iones en tejido vegetal, el transporte de calcio y la actividad de enzimas antioxidantes en células obtenidas del cogollo y meristemo de las palmas, así como los daños sufridos sobre la bioenergética mitocondrial en las palmas afectadas.

Se espera que con los resultados generados con este proyecto se pueda establecer conexiones entre las hipótesis biótica y abiótica y aportar al conocimiento básico de la enfermedad, conocimiento que pueda ser usado para plantear o reestructurar futuros métodos de control.

Adicionalmente se busca generar en nuestro laboratorio una nueva línea de investigación que integre la bioquímica, la bioenergética mitocondrial y la química

analítica para, en un futuro cercano, poder plantear estrategias que permitan llevar nuestros avances y estudios al sector agropecuario y contribuir con soluciones a problemáticas de gran impacto.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA PALMA DE ACEITE:

La palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. es una planta perenne cultivada por su alta productividad de aceite. Taxonómicamente la palma se ha clasificado de la siguiente forma: división: fanerógamas; tipo: angiospermas; clave, monocotiledoneas; orden: palmales; familia: palmaceae, tribu: cocoinea, genero: *Elaeis* y especie: *guineensis* (QUESADA, 2000).

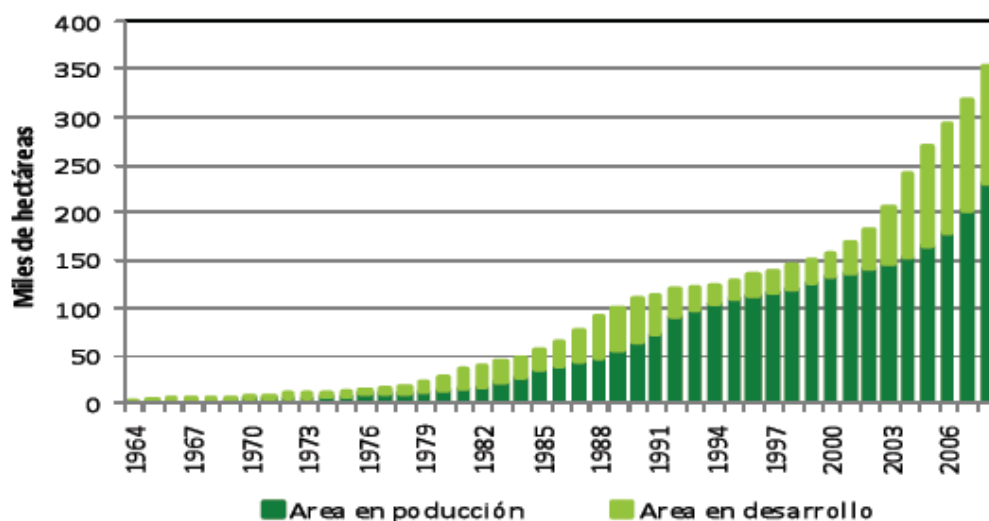
La palma africana es una especie monoica que produce inflorescencias masculinas y femeninas por separado (ciclos masculinos y femeninos alternos evitando autofecundaciones). Una inflorescencia femenina se convierte en un racimo con frutos maduros de color rojo amarillentos pasados 5 meses a partir de la apertura de las flores y es de éstos frutos de donde se obtiene el aceite de palma. Actualmente, el aceite de palma es el segundo aceite mas consumido del mundo y se emplea en las labores del hogar y en la industria en general. Contiene igual proporción de ácidos grasos no saturados, conteniendo alrededor del 40% de ácido oleico, 10% de ácido linoleico, 44% de ácido palmítico y 5% de ácido esteárico. Este aceite es una fuente natural de vitamina E, tocofenoles y cocotrienoles y el aceite sin refinar también es una fuente importante de vitamina A (fedepalma, 2010). Además de sus anteriores aplicaciones, en las últimas décadas se viene utilizando como biocombustible. En una mezcla de 90% fósil y 10% biodiesel de palma.

La industria de palma agrupa desde pequeños cultivadores, trabajadores agrícolas, profesionales de diferentes ramas administrativas, técnicas y científicas, y empresarios del campo y la industrial. El cultivo se ubica actualmente en 103 municipios de 16 departamentos y genera 114.000 empleos directos e indirectos en Colombia (Fedepalma, 2010). Este es uno de los productos con mayor

demanda agrícola del país, siendo el cuarto cultivo mas importante en área sembrada (DNP, 2007). Según Fedepalma, en 2009 se contaba con 364.970 Ha sembradas con palma de aceite, produciendo 859.554 toneladas de aceite en ese año.

Desde sus inicios aproximadamente en 1970 hasta el 2008, ha habido un desarrollo creciente en el área sembrada en palma, no solo en Colombia, sino también en América latina, (Figura 1). Este es un cultivo de gran interés tanto económico como científico debido a las expectativas de siembra proyectadas en el país, las cuales triplicarán en los próximos 10 años, de acuerdo a los datos del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), ver tabla 1.

Figura 1. Hectáreas sembradas con palma de aceite en Colombia, desde 1964 - 2008.



Fuente: FEDEPALMA, 2008

Tabla 1. Proyecciones de Área sembrada y producción de Aceite de palma Colombia.

	2010	2015	2020
Área (Ha)	443.037	664,377	996,296
Producción de Aceite palma (Ton)	1,204.382	2.018.786	3,383,892

Fuente: MADR dirección de cadenas productivas-dirección de política sectorial-DNP. Visión 2010. Proyecciones, en Min Comercio, 2010.

Según estas proyecciones y gracias a la promoción del cultivo como posible biocombustible, se pasará de 443mil Ha a 996 mil Ha, en un periodo de 10 años, lo que significaría un crecimiento del 125% en hectáreas sembradas, brindándole a este cultivo más importancia tanto a nivel económico como social. (PÉREZ, 2009)

Hay un potencial de producción en nuestro país, según las proyecciones, que debe ser desarrollado, pero que también requiere ser conservado y protegido de factores que atenúan la producción, como los suelos ácidos, zonas con contenidos altos de aluminio, falta de drenajes, fertilizaciones pobres, variedades susceptibles a enfermedades, entre otros.

Entre estos factores la enfermedad conocida como “Pudrición de Cogollo” o PC es uno de los factores atenuantes más importantes, convirtiéndose en el principal problema que enfrenta el sector palmero en Colombia. Esta enfermedad ha devastado gran cantidad de hectáreas y puestos de trabajo en las cuatro zonas palmeras del país (Figura 2), según informes de prensa recientes y alertas por parte del ICA, la enfermedad sigue avanzando. Entre 2000-2009 Fedepalma calculó pérdidas de 135.225 toneladas, solo en la zona oriental y, aunque se ha tratado de controlar la enfermedad desde diferentes áreas del conocimiento aún sigue siendo un problema por resolver para el sector palmero (FEDEPALMA, 2010).

Figura 2. Zonas de producción de palma de aceite en Colombia



Fuente Fedepalma, 2010.

2.2. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD PUDRICIÓN DE COGOLLO EN LAS ZONAS COLOMBIANAS

En Colombia la Pudrición de Cogollo, se ha presentado en diferentes zonas de sembrado de palma desde 1965. En la plantación la Arenosa, en la región de Turbo, se reportó el primer caso, se generaron pérdidas del 20% de las palmas en un área de 1.800 Ha. Para 1975 la plantación estaba completamente infectada (FRANQUEVILLE, 2001; NIETO, 1996; TURNER, 1981; DEROJAS Y RUIZ, 1972).

En el municipio de Tumaco (Nariño), la enfermedad fue registrada por primera vez en 1977, pero en los años 2005 y 2006 la enfermedad adquirió características epidémicas (CORPOICA, 2007). Se incremento la incidencia acumulada del 8,3% al 58% reduciendo la producción de aceite (CORREDOR, 2008). A partir del 2008

el aumento exponencial de la enfermedad, generó en la zona occidental una emergencia sanitaria y económica, causando reducción del 90% de la producción del aceite y más del 70% del área sembrada se había perdido (MARTÍNEZ Y SILVA, 2009).

En la zona oriente (llanos) la PC apareció a fines de los años 70 (CORRADO, 1970), sin la misma intensidad como la observada en Turbo en lo referente a incidencia y mortalidad, pero en 1988 la enfermedad alcanzó un nivel más preocupante (NIETO Y GÓMEZ, 1991; GÓMEZ 1995). Posteriormente, en esta zona debido a diversos factores abióticos propios de la región, se observó la recuperación espontánea de algunas palmas, incluso durante los últimos 20 años se ha podido convivir con la enfermedad, aprovechando las épocas del año que desfavorecen el desarrollo de la PC (MARTÍNEZ Y TORRES, 2007).

Recientemente en la zona Central (Magdalena medio, Cesar y Norte de Santander) la problemática por la PC ha incrementado. Durante años la enfermedad en esta zona no pasaba de la pudrición de la flecha (hoja que va a nacer). A partir del 2004 se incremento la PC y para el 2009 en algunas plantaciones su aumento fue considerable, alcanzando incidencias del 25% (MARTÍNEZ Y SILVA, 2009).

En particular en Santander el ICA decreto en febrero de 2010 el estado de emergencia fitosanitaria en los municipios de Barrancabermeja, Puerto Wilches, sabana de torres y San Vicente de Chucuri, por esta enfermedad por un término de 3 años. De las 15.000 Ha de palma afectadas en la zona central, el 85% se encuentran en el municipio de Puerto Wilches, lo cual indica que 12.750 Ha están siendo atacadas por la enfermedad de PC y según Jens Mesa Dishington, presidente ejecutivo de la Federación Nacional de Palmicultores, Fedepalma, “si no hacemos nada y dejamos morir esas palmas, se perderían entre 4 y 5 mil empleos. Las pérdidas por salarios serían \$100 mil millones anuales, el costo de

oportunidad por producción sería de \$260 mil millones” (VANGUARDIA, 21 marzo de 2010).

2.2.1 Descripción y Sintomatología de la PC

Hay una sintomatología general constante en las fases tempranas del desarrollo de la enfermedad. Generalmente, los primeros síntomas se expresan por una clorosis (amarillamiento) en las hojas jóvenes, que emergen presentando lesiones necróticas con diferentes grados de severidad y contagiando otras hojas emergentes a través del contacto de un folio a otro (FRANQUEVILLE, 2001; MARTÍNEZ Y TORRES, 2007; SARRIA, 2008). El tejido necrosado aumenta hasta el punto de contagiar todo el cogollo y meristemo de forma que la palma se muestra ausente de hojas nuevas.

Cenipalma, ha diseñado una escala para determinar el grado de severidad de la enfermedad de pudrición de cogollo en palma de aceite, para facilitar la identificación del avance de la enfermedad de acuerdo a sus síntomas. Grado 0: no hay lesiones; Grado 1 (0,1-.20% del área de la flecha afectada): lesiones pequeñas, tejidos que se desintegran y quedan las nervaduras; Grado 2 (20.1 – 40% del área de la flecha afectada): aquí hay necrosis o muerte del tejido debido al proceso de pudrición; Grado 3 (40.1 – 60% del área de la flecha afectada), avance de la enfermedad, se evidencia un gran daño; Grado 4 (60.1 – 80% del área de la flecha afectada) sigue el necrosamiento y daño de casi la totalidad de la hoja; Grado 5 (80.1-100% del área de la flecha afectada) daño total de la hoja, se llega al estado de cráter, aquí todos los tejidos nuevos desaparecen. (SANTOS, 2010; MARTÍNEZ, 2009).

2.2.2 Causas de la PC en Palmas de Aceite

Desde sus inicios en 1976, se han presentado dos hipótesis como causa de la PC, conocidas como las teorías biótica y abiótica. La biótica, toma en cuenta el papel de insectos, hongos y bacterias y en ocasiones complicaciones por virus. La

abiótica, generalmente relacionada con un complejo de factores climáticos y edáficos como causa de un desorden nutricional muy complejo, a continuación se explicará brevemente los fundamentos de cada una de las hipótesis.

Hipótesis Biótica:

Con la intención de identificar el organismo patógeno que induce la PC en palma de aceite se realizaron diversos estudios descartando la correlación insecto-incidencia de PC (FRANQUEVILLE, 2001; GÓMEZ, 1995; SYED, 1979), nematodo-incidencia PC (IRHO, 1986,1987; GUEVARA Y NIETO, 1999).

Recientemente Cenipalma encontró, tras realizar aislamientos y pruebas de patogenicidad, que un microorganismo del genero *Phytophthora* sp es el responsable de las lesiones iniciales de la pudrición del cogollo de palma de aceite (CENIPALMA, 2010). Después de aislar, cultivar, purificar y adelantar pruebas de patogenicidad de la amplia gama de microorganismos asociados con las lesiones presentadas en palmas enfermas, lograron hacer un tamizaje que los llevo a descartar a muchos de ellos como los responsables de iniciar la enfermedad y finalmente se concentraron en las estructuras resistentes que se venían observando en el cogollo en estados muy tempranos. Después de estos estudios y usando además de palma, frutas tropicales como pera, sandia, entre otras, se logró la clara identificación, que el daño conocido como pudrición del cogollo lo ocasiona específicamente el hongo *Phytophthora palmivora*.

Es importante tener en cuenta que la *Phytophthora palmivora* es el que inicia el daño y luego aparecen una serie de microorganismos oportunistas, hongos y bacterias, que llegan a colonizar el tejido ya destruido por la *Phytophthora* (CENIPALMA, 2010).

A pesar de aún no haber sido caracterizado, la acción enzimática de la *Phytophthora palmivora*, se conoce que otras *Phytophthoras* presentan actividad enzimática

propia para el ataque al hospedero (planta). SYSUEV y sus colaboradores en 1978 reportaron que la *Phytophthora infestans* posee actividad ATPasa, pirofosfatasa y tripolifosfatasa, siendo estas dos últimas enzimas inhibidas por concentraciones de calcio entre 0,1 y 20mM. Para la formación de esporangios (una de las formas de esporas de las *Phytophthoras*) es necesaria la absorción de calcio que en el caso de la *Phytophthora infestans* es dependiente de pirofosfato e inhibido por la presencia de otros cationes divalentes como el Mg^{2+} y por agentes desacopladores de la cadena respiratoria mitocondrial como el FCCP y 2,4-dinitrofenol (OKOROCOV et al, 1978). Adicional a estos estudios también fue reportado que la *P. infestans* produce tres enzimas constitutivas extracelulares con actividad pectinesterasa (FOSTER & RASCHED, 1985), lo que podría ser usado para facilitar el daño de la pared celular de la planta, debilitándola, permitiendo el acceso de otros microorganismo y promoviendo la liberación de calcio contenido en la pared que a su vez puede ser usado por el patógeno para su proliferación.

Hipótesis Abiótica

Aunque la PC ocurre en todos los tipos de suelos, para numerosos autores la severidad de la enfermedad depende de múltiples factores, incluyendo además de los factores climáticos, la aireación de la tierra, bajos niveles de desarrollo radicular y diversos desordenes nutricionales como niveles bajos de calcio y potasio (CHINCHILLA Y DURAN, 1999).

Desde sus inicios en el Congo la incidencia de la enfermedad en palma de aceite es muy severa, solamente en aéreas donde las condiciones de producción (suelos y clima) son pobres, pero palmas nativas crecían sin dificultad (DUFF, 1963). En América Latina se ha considerado que la PC está relacionada a drenajes insuficientes, a suelos compactos y densos y a asfixia radicular. En Turbo, la ausencia de drenaje y la fertilización inadecuada han sido consideradas como la causa de la PC (HARTLEY, 1965). También refiriéndose a Turbo, GÓMEZ(2000),

sugirió que la PC podría ser causada por la acumulación de nitritos unida a la falta de oxigenación en los suelos pesados pobremente drenados.

Cenipalma condujo investigaciones en diversas zonas del país demostrando que la presencia de la enfermedad es generalmente mayor donde existen limitaciones físicas como suelos arcillosos, lotes con cantidades significativas de arcillas en el horizonte (0-40cm). Esto podría estar relacionado con la dificultad que presentan las raíces para desarrollarse correctamente en suelos arcillosos, debido a que presentan más dureza y además no permiten el drenaje adecuado generando compactación. Al realizar drenajes en lotes afectados con PC, monitoreando la enfermedad durante 22 meses, hubo una significativa reducción de la frecuencia de la pudrición (MUNEVAR, 2005).

La acidez del suelo se ha mencionado como un posible factor que induce o favorece la PC al igual que el aluminio, el cual es más soluble y más tóxico cuando el pH es ácido. El pH en tres regiones de Colombia (Central, Occidental y Oriental) ubican la mayor parte de los suelos con $\text{pH} < 5$, según datos de análisis de suelos de Cenipalma.

Se debe tener en cuenta que la exagerada fertilización en algunas ocasiones aumenta la acidez de los suelos. El uso de fertilizantes amoniacales (urea con menos efecto) en dosis concentradas liberan H^+ por nitrificación bacteriana de $\text{NH}_4 \rightarrow \text{NO}_3$. El bajo contenido de materia orgánica en el plateo (coronas desnudas), donde las pocas raíces terciarias y cuaternarias son sometidas a alta acidez y al Al^{3+} tóxico, son deformadas sufriendo alteraciones en sus funciones de absorción de nutrientes generando desbalance nutricional. (LAING, 2009)

Comparando las concentraciones de macro y micro elementos en palmas sanas vs enfermas, VIEGAS (2000) midió la concentración de Cu, Fe, Mn y Zn en las hojas 1, 9 y 17 (siendo 1 hoja más joven) de palmas sanas, palmas enfermas y de

híbridos inter-específicos, demostrando que los niveles de Cu fueron ligeramente inferiores en palma *P. guineensis* enfermas en comparación a palmas sanas, el hierro en las hojas 1 y 9 de las diferentes palmas testadas presentaron concentraciones similares, pero en la hoja 17 de las palmas enfermas fueron superiores, los niveles de Zn fueron muy inferiores en la palma enferma, independiente de la posición de las hojas analizadas.

Resultados de investigaciones aplicando una fertilización completa (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn, Cu y Zn) y comparando con otros tratamientos quitando un elemento vs un testigo sin fertilizar muestran que la fórmula completa favorece el proceso de remisión, la exclusión de todos los macro elementos (N, P,K) no modifica el desarrollo de los síntomas, las fórmulas sin Ca y S favorecen la repetición de los síntomas y la exclusión de cualquier micro elemento (Fe, Mn,Cu,Zn y B) favorece el recrudecimiento de los síntomas (ROCHA,2000; MUNEVAR, 2005).

Dada la importancia de la nutrición mineral en las plantas y como fundamento dentro de la hipótesis abiótica se hará una amplia descripción de cada uno de los elementos que constituyen la nutrición vegetal y su función en las plantas, especialmente lo relacionado con los metabolismos de defensa.

2.3 SUELO, FERTILIDAD DEL SUELO Y NUTRICION MINERAL

Suelo

En cuanto a que es el suelo, existen muchos conceptos, los cuales se pueden resumir en “suelo: es un ente natural, tridimensional, trifásico y dinámico, sobre el cual crecen y se desarrollan la mayoría de las plantas”. Es un ente, porque tiene vida; tridimensional, porque es visto a lo largo, ancho y profundidad; trifásico, porque existe fase sólida, líquida y gaseosa; dinámico porque dentro de el suelo

ocurren procesos que involucran constantes cambios físicos y químicos. Adicionalmente es el medio natural donde crecen las plantas, por tanto sirve como soporte (SÁNCHEZ, 2007).

2.3.1 La fertilidad del suelo:

La fertilidad del suelo es una cualidad resultante de la interacción entre las características físicas, químicas y biológicas del mismo y que consiste en la capacidad de poder suministrar condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Cuando se habla de condiciones óptimas para el asentamiento de las plantas, estas no son independientes, es decir, un suelo puede estar provisto de suficientes elementos minerales –fertilidad química- pero no estar provisto de buenas condiciones físicas y viceversa. Igualmente, la fertilidad no es suficiente para el crecimiento de las plantas; el clima juega un papel importante y determinante en muchos casos.

En cuanto a su condición en general una proporción ideal está dada por: 45-48% de partículas minerales, 2-5% de materia orgánica, 25% aire y 25% de H₂O (SÁNCHEZ, 2007; CASTRO, 1998).

2.3.2 Propiedades físicas del suelo:

Textura: se refiere a la proporción de arena, limo y arcilla expresados en porcentaje. En la fracción mineral del suelo, son de interés edafológico solamente las partículas menores de 2mm de diámetro.

$$\% \text{ arena} + \% \text{ limo} + \% \text{ arcilla} = 100\%$$

Es una propiedad física primaria y guarda relación con otras, como por ejemplo:

- La permeabilidad
- La capacidad retentiva del agua

- La porosidad
- La aireación
- La densidad real y aparente
- La capacidad de intercambio catiónico (CIC)
- La estructura

De acuerdo a las diferentes proporciones de arena, limo y arcilla, los suelos son agrupados en clases texturales. Existen 12 clases texturales van desde arenoso, limoso, arcilloso y la mezcla de estos son los suelos francos. (SALISBURY & ROSS, 2000; SÁNCHEZ, 2007)

Características según la textura.

Suelos arenosos: son suelos sueltos con mucha aireación, baja retención de agua, muy permeables y con poca fertilidad, especialmente si se encuentran en zonas altas en lluvias. Se deben abonar en dosis pequeñas o con sustancias poco solubles.

Suelos Arcillosos: son suelos plásticos y difíciles de trabajar que se conocen como suelos pesados o fuertes. Son suelos fértiles, con buenas propiedades químicas, pero de propiedades físicas poco manejables, no son permeables, se erosionan fácilmente porque el agua no penetra, sino que corre superficialmente arrastrando los nutrientes; se encharcan fácilmente, afectando los cultivos por la falta de aire en las raíces tornándose amarillas. Son ricos en nutrientes y cuando se adiciona materia orgánica mejoran sus condiciones físicas.

Suelos Limosos: son suelos intermedios entre arenosos y arcillosos, predominando el limo. Aunque tienen buenas propiedades físicas y químicas se encharcan fácilmente produciendo problemas a las plantas por deficiencia de oxígeno. Es la peor situación, el limo carece de propiedades coloidales formadoras de estructura y son suelos que se apelmazan con facilidad impidiendo aireación y

la circulación de agua. Son casi imposibles de corregir y solo la aplicación de gran cantidad de abono orgánico puede atenuar sus malas características.

Suelos francos: son suelos ideales porque tienen una proporción equilibrada entre arena, limo y arcilla. Presentan propiedades físicas y químicas óptimas para el crecimiento de las plantas. (CASTRO, 1998)

2.3.3 Propiedades Químicas.

2.3.3.1 Reacción del suelo (pH):

El pH es una propiedad que tiene influencia indirecta en los procesos químicos, disponibilidad de nutrientes, procesos biológicos y actividad microbiana. Se define como el logaritmo inverso de la actividad de iones hidrógeno en la solución del suelo. Normalmente el rango de pH de los suelos varía entre 3,5 a 9,0; la razón por la que no alcanza valores extremos de 0-14 se debe a que la solución del suelo no es una solución verdadera, sino una solución coloidal.

A la mayoría de las especies cultivadas, les favorece valores pH entre de 5,5 a 7,5, pero cada especie y variedad tienen un rango específico donde se desarrolla mejor. Los suelos de pH fuertemente ácido (< 5.5) no son recomendables por la gran cantidad de aluminio y la disminución de la actividad microbiana. Los suelos alcalinos originan una escasa disponibilidad de elementos menores, excepto el molibdeno. (Sánchez, 2007)

El pH es una de las propiedades más importantes del suelo, influye sobre los siguientes aspectos:

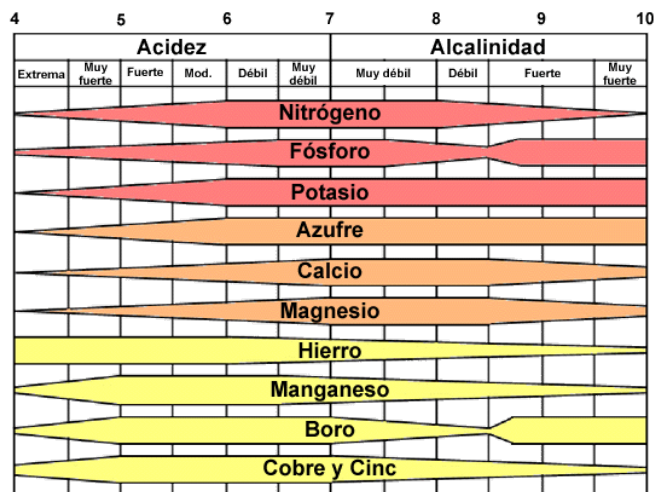
- Disponibilidad de nutrientes en la planta
- Solubilidad de nutrientes
- Control de la clase y tipo de actividad microbiana
- Actúa sobre la mineralización de la materia orgánica

- Regula la concentración de iones tóxicos en el suelo como aluminio, sodio y sales.
- Controla la capacidad de intercambio catiónico y aniónico en suelos
- Controla la presencia de enfermedades e insectos en el suelo.

Importancia del grado de acidez.

Los suelos muy ácidos generalmente están muy lixiviados, lo cual los convierte en escasos en nutrientes minerales (Ca, Mg y P). Muchos cultivos son dañados por la alcalinidad excesiva o la acidez excesiva, esto debido a la disponibilidad de nutrientes según el pH. (Figura 3)

Figura 3. Disponibilidad de los nutrientes en función del pH del suelo.



Fuente: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/05/09/65262>

La acidez del suelo se corrige con la aplicación de enmiendas, tales como cal, roca fosfórica, entre otras y la cantidad va a depender principalmente del cultivo a establecer, del pH, del aluminio intercambiable, de la textura del suelo y el contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico y el % de saturación de bases.

La acidez intercambiable es la acidez debida a los iones de aluminio e hidrógeno intercambiables desplazables con una sal neutra (KCl 1N). Se ha demostrado que los suelos ácidos de Colombia de origen mineral tienen muy poco H^+ intercambiable y que es el aluminio y no el H^+ el responsable de la acidez del suelo. Ya que el aluminio intercambiable al pasar a la solución del suelo reacciona con el agua formando hidróxido de aluminio ($Al(OH)$ y $Al(OH)_2$), el cual es tóxico para las plantas cuando el pH es menor a 5,5. (CASTRO, 1998).

2.3.3.2 Aluminio (Al).

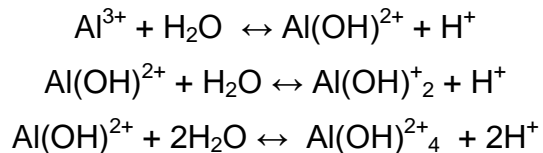
Considerado ya uno de los más fuertes reductores del crecimiento vegetal en suelos ácidos (SALISBURY, 2000), el pH es uno de los factores más importantes que determina la disponibilidad o no de este metal. Existen zonas del planeta que presentan de forma natural un pH ácido como las zonas tropicales y subtropicales. Esto se puede agravar con el uso de fertilizantes y acidificantes o de fuentes de energía fósil como carbón y petróleo, que liberan una gran cantidad de NO_x y SO_2 , los cuales en presencia de sustancias oxidantes, dan lugar al H_2SO_4 y al HNO_3 . Como consecuencia hay una mayor disponibilidad de aluminio y otros metales para las plantas que pueden ser tóxicos.

La química del aluminio es bastante compleja. Debido a su alta carga iónica y su pequeño radio atómico, es capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran en el suelo en forma soluble.

En estudios en los que se determinó la forma del aluminio que predomina a cada valor de pH, se observó que cuando se encuentra en medio muy ácido el aluminio se presenta en forma iónica (Al^{+3}) o bien en forma de monómeros $Al(OH)^{2+}$ y $Al(OH)_2^{1+}$, a valores de pH entre 3,5-5,0 estos aumentan y llegan a una concentración máxima. Cuando el $pH > 5$, tanto las formas monoméricas como los polímeros de hidróxido disminuyen y aparecen los hidróxidos altamente básicos $Al(OH)_3$, $Al(OH)_4$, entre otros, que son insolubles y precipitan fácilmente

por que no son disponibles para la planta; por tanto, no tienen efecto sobre ella. (GARZÓN, 2003; CASTRO, 1998).

Las reacciones que encontramos en esos suelos son:



A pH neutro el aluminio se encuentra como $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Gibbsite).

Distribución del aluminio en la raíz:

Para entender la toxicidad del aluminio sobre los vegetales es necesario elucidar su localización tanto a nivel de tejido como a nivel celular. Como la inhibición de la elongación de la raíz es uno de los primeros síntomas visibles en la planta tras la aplicación externa de aluminio, la mayoría de estudios indican que la concentración de Al en la raíz depende de la diferencia en la sensibilidad de la planta al metal y la disminución en el crecimiento de la raíz se relaciona con el contenido de este en la raíz, ya que las plantas más resistentes tienen mecanismos de exclusión del metal (YARAMOTO, 1994).

Aluminio en la Pared Celular:

Diferentes estudios de RENGEL en 1996 indican que más del 95% del aluminio asociado a las raíces de las plantas se encuentra en la pared celular y que el Al es el responsable del rápido e irreversible desplazamiento del calcio en la pared celular. El aluminio es el gran competidor del calcio, ya que tiene preferencia por donantes de electrones que contienen O_2 . Las paredes celulares contienen una gran variedad de lugares cargados negativamente, de los cuales el más importante es el ácido galacturónico que forma cadenas lineales altamente ramificadas dando lugar a las pectinas. Los principales polisacáridos pécticos

son: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y II y arabinogalactano. El homogalacturonano forma un gel rígido e insoluble en presencia de calcio. Es posible que el Al con una mayor capacidad de unión a las pectinas que el Ca, se una produciendo un aumento en la rigidez de la pared de la raíz impidiendo la expansión celular (GARZÓN, 2003).

Aluminio y la membrana plasmática:

El aluminio no solo afecta rápidamente a la pared celular, sino que también a las características de la membrana plasmática. Se ha comprobado como en plantas expuestas a tratamientos con Al, el flujo de cationes (Ca^{+2} , NH_4 y K^+) se reduce y el flujo de los aniones (NO_3^- , PO_4^{3-}) aumenta, mediante un mecanismo donde el Al se une a los fosfolípidos de membrana formando una capa cargada positivamente que impediría o dificultaría el transporte de los cationes y facilitaría el de aniones (GARZÓN, 2003).

Una de las primeras consecuencias identificadas en la toxicidad por Al, fue la reducción en la absorción de Ca^{2+} (RENGEL, 1992). El Ca actúa como mensajero secundario en la transducción de señales desde el medio exterior que rodea la planta, hacia elementos del metabolismo de ésta y se encuentra implicado sobretodo en la expansión celular. Diversos estudios han mostrado cómo el Al puede bloquear los canales de calcio en la membrana plasmática evitando la entrada de calcio al citoplasma (PIÑEROS, 1995).

El aluminio y las alteraciones en la funcionalidad del calcio:

El Ca actúa como mensajero secundario en la transducción de diferentes señales desde el medio exterior que rodea a la célula, estas señales son iniciadas por el inositol trifosfato (TREWAVAS Y GILROY, 1991). Se cree que la distorsión de la homeostasis del calcio es uno de los primeros síntomas de toxicidad por aluminio.

2.3.3.3 Materia Orgánica del Suelo (MO):

Esta constituida por todos los desechos o residuos de origen animal y vegetal, rastrojos, hierbas, hojas, ramas, troncos, raíces, desperdicios de cosecha, abonos de origen animal, abonos verdes, compostaje y los macro y microorganismos del suelo. La materia orgánica influye sobre algunas propiedades como estructura, porosidad, retención de agua y retención de cationes intercambiables, población de microorganismos y fijación de fósforo. Es una fracción muy importante ya que ayuda a mantener la fertilidad del suelo mejorando las características físicas y químicas del mismo.

Funciones de la materia orgánica en el suelo:

Protección contra erosión: la materia orgánica gruesa en la superficie reduce el impacto de la gota de lluvia que cae y permite que el agua se filtre con suavidad, reduciendo el escurrimiento superficial y la erosión, dando a los cultivos agua para su desarrollo. La pérdida por evaporación se reduce por capas protectoras de materia orgánica. Las capas de paja y estiércol bajan la temperatura en verano y en épocas de frío o heladas la mantienen templada.

Factores de agregación del suelo: la materia orgánica y la actividad de las raíces ligan a las partículas en unidades estructurales llamadas agregados. La condición granular del suelo favorece una buena aireación y permeabilidad.

Mejoras en la capacidad de retención de humedad: el incremento de materia orgánica en el suelo le permite a las plantas tolerar mejor la falta de agua en temporadas secas.

Deposito de nutrientes: la materia orgánica, esencial para la planta, contiene la mayor parte de nitrógeno, así como el fósforo y el azufre que tienen su mineralización en la misma.

Fuente de energía y alimento para microorganismos: la materia orgánica fresca proporciona alimento para lombrices, hormiga y roedores. Los microorganismos que fijan nitrógeno, requieren que la materia orgánica se descomponga con facilidad y para de esta poder obtener el carbono.

Mejoras en la capacidad de intercambio catiónico (CIC): se estima que cada 1% de materia orgánica representa 2 meq/100g de CIC. Al mejorar la materia orgánica mejorara la CIC, se hacen menos lavables las bases del suelo y aumenta la eficiencia de la fertilización (CASTRO, 1998).

2.3.3.4 La capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Es una propiedad química que designa los procesos de:

- a) adsorción de cationes por el complejo de cambio desde la solución del suelo y
- b) liberación de cationes, desde el complejo de cambio hacia la solución del suelo (SÁNCHEZ, 2007).

Es una propiedad atribuida a la arcilla (coloide mineral) y al humus (coloide orgánico). Las partículas de arcilla son los componentes de carga negativa del suelo, dichas partículas atraen, retienen y desprenden nutrientes con carga positiva. Las partículas de materia orgánica poseen una carga negativa (COOH^- y OH^-) también atraen cationes. La arena no tiene reactividad (CHACÓN, 1998). La fuerza de la carga positiva de un catión varia permitiendo que un catión reemplace a otro en una partícula del suelo con carga negativa.

Como regla general suelos con grandes cantidades de arcilla y materia orgánica tendrán una alta capacidad de intercambio catiónico y los suelos arenosos con baja concentración de materia orgánica tendrán una baja capacidad. Cuando la capacidad es baja indica baja fertilidad y es necesario fraccionar las aplicaciones de fertilizantes para no perder nutrientes por lavado.

2.3.4 Nutrientes Minerales

Del 100% total que toma la planta para sus procesos vitales, el 44% es oxígeno, 42% es carbono y 7% es hidrógeno. Estos son tomados de la atmosfera y son fundamentales para procesos de respiración y fotosíntesis. El 7 % son elementos nutritivos (primarios, secundarios y microelementos). Los toma a nivel del suelo y aunque representan solo el 7%, son determinantes en procesos vegetativos y reproductivos

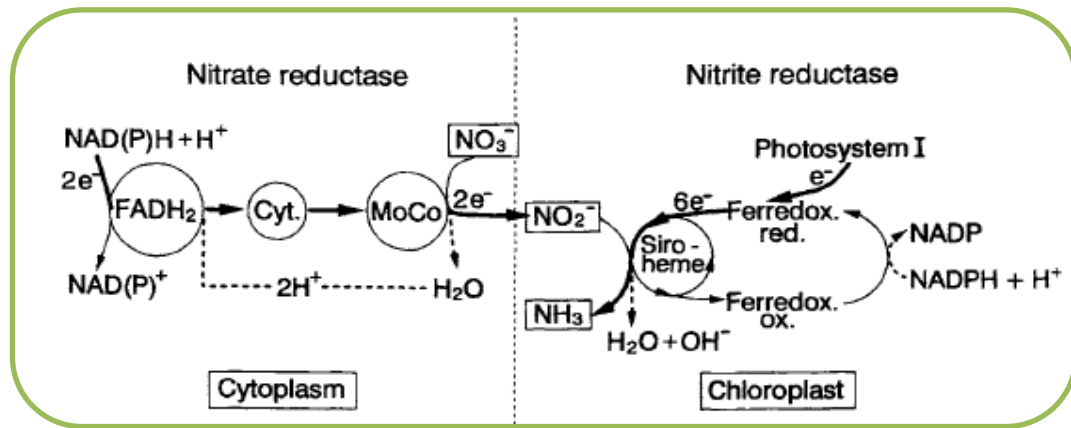
2.3.4.1 Elementos mayores o macroelementos:

Nitrógeno (N)

Cerca del 80% de la atmosfera contiene N, sin embargo la forma estable (N_2) no es tomado por las plantas. Los microorganismos son capaces de transformar el N_2 en amonio (NH_4^+) el cual puede ser tomado directamente por la planta o convertido en NO_3^- por nitrificación bacteriana. La planta absorbe las dos formas iónicas básicas del nitrógeno; nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) (Figura 5), según las condiciones del suelo dependerá cual de ellas tome. (MILLER, 2008)

La asimilación y funciones biológicas: El N necesita ser reducido al estado de valencia -3. La nitrato reductasa (Figura 4) asegura que la forma de N tomado como (NO_3^-) sea convertido a amonio. La reducción del nitrato puede tener lugar en raíces y brotes pero es espacialmente separada entre los cloroplastos, donde la reducción del nitrato tiene lugar, y los plástidios de los cloroplastos donde ocurre la reducción del nitrito (MAATHUIS, 2009; ORSEL ,2002)

Figura 4. Representación esquemática de la secuencia de asimilación de Nitrato en las células de las hojas.

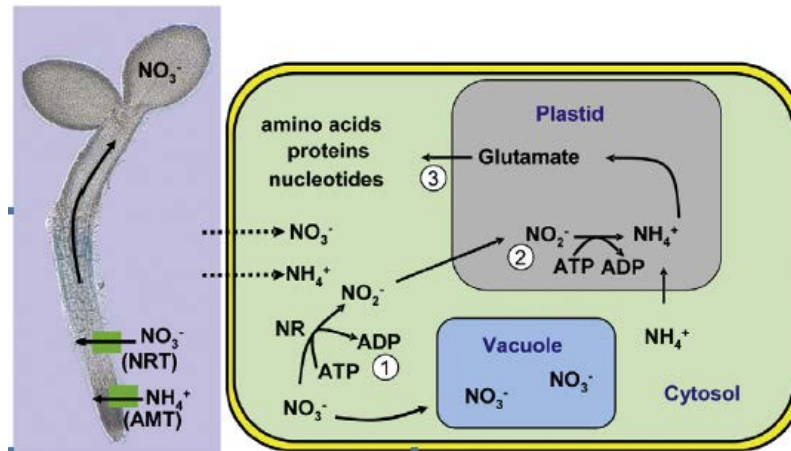


Fuente: MARSCHNER, 1995.

La función principal del nitrógeno es la de proveer grupos aminos como en los aminoácidos (Figura 5). El N también es requerido en nucleótidos, donde ocurre su incorporación en la estructura del anillo de las bases nitrogenadas como la de purina y pirimidina. Adicionalmente a los nucleótidos, en los ácidos nucleicos también tiene gran importancia en la señalización y regulación de proteínas en la homeostasis.

También es esencial en la bioquímica de muchos compuestos no proteínicos tales como las coenzimas, pigmentos fotosintéticos, metabolitos secundarios y poliaminas. (MAATHUIS, 2009).

Figura 5. Funciones y distribución del Nitrógeno en la planta.



Fuente:MAATHUIS, 2009

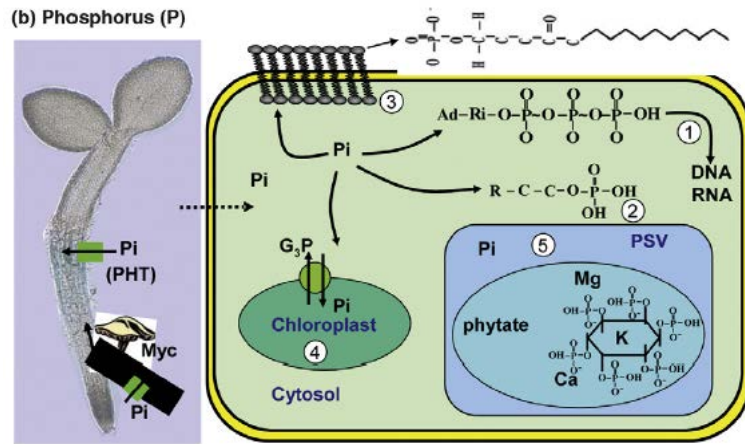
El nitrógeno es constituyente y activador de todas las enzimas e interviene en procesos de absorción iónica, fotosíntesis, respiración, síntesis, multiplicación, diferenciación celular y herencia (MARSCHNER, 1995). Las plantas con cantidades limitadas de N muestran síntomas de deficiencia en las hojas más antiguas. Las plantas que tienen exceso de N suelen tener hojas con un color verde oscuro y presentan abundante follaje, lo cual disminuye la absorción de K y retarda la maduración (SALISBURY Y ROSS, 2000).

Fósforo (P):

Tras el N, el fósforo es el elemento que con mayor frecuencia resulta limitante en los suelos. Se absorbe principalmente en forma de anión fosfato monovalente (H_2PO_4^-) (Figura 6), más lentamente como el anión divalente ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$). El pH del suelo controla la abundancia relativa de estas dos formas; el (H_2PO_4^-) se ve favorecido por un pH menor a 7, mientras que el ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) lo estará por encima de este valor. Gran parte del fosfato se convierte en una forma orgánica al entrar en la raíz, o después de que sea transportado por el xilema hasta el tallo o las hojas. A diferencia de lo que sucede en el caso del nitrógeno y el azufre, el fósforo nunca es reducido en las plantas, y por ello permanece en forma de fosfato, ya sea libre o, bien unido a formas orgánicas del tipo ésteres (MARSCHNER, 1995).

Cerca del 90% de las plantas constituyen una simbiosis que mejora la adquisición de este escaso mineral. Las hifas del hongo pueden entregar hasta 80% del P a la planta aunque a un costo considerable para la planta ya que reduce carbono. (MAATHUIS, 2009; BUCHER, 2007) .

Figura 6. Funciones y distribución del fósforo en las plantas.



Fuente:MAATHUIS, 2009.

El fosfato se redistribuye fácilmente en la mayor parte de las plantas pasando de un órgano a otro. Mientras se pierde en las hojas antiguas, se acumula en las hojas jóvenes y en las flores, y en las semillas que se encuentran en desarrollo da un secuestro vacuolar, especialmente importante durante este estadio, cuando grandes cantidades de P y otros minerales se almacenan en la semilla; lo hace típicamente en vacuolas de almacenamiento de proteínas como el inositol-hexa-fosfato (IP6). IP6 o ácido fático es un quelante de cationes excelente y por lo tanto contiene la mayor parte de los minerales catiónicos que se encuentran en las semillas tales como Ca^{+2} , Mg^{2+} y K^{+} (MITSUHASHI, 2005). Los fitatos también secuestran micronutrientes como Fe^{2+} y Zn^{2+} .

Asimilación y funciones biológicas: A diferencia de N y S, el P permanece en su forma oxidada, como P inorgánico (Pi) o bien se encuentran como Pi soluble

(ortofosfato) o como PP (pirofosfato). El fósforo orgánico es mantenido unido a grupos hidroxilo de azúcares y alcoholes por esterificación. (Figura 6) (MAATHUIS, 2009) Alternativamente, Pi se une a otros grupos fosfato a través de la formación de enlaces pirofosfato y la interrupción del enlace pirofosfato es uno de los mecanismos centrales en la homeostasis de la energía celular. El ATP también es la base de muchas de las rutas, tales como la síntesis de ácidos nucleicos. Otros fosfo-nucleotidos similares ricos en energía son UDP (uridina difosfato), CTP (citidina trifosfato) y GTP(guanosin trifosfato) y todos tienen un papel importante en el metabolismo del ácido nucleico. El UDP es también un elemento de síntesis de sacarosa, almidón y formación de celulosa mientras que CTP actúa como energía rica (acumulando energía para reacción de transferencia de fosfato). (MAATHUIS, 2009; MARSCHNER, 1995)

La función de fósforo como componente de estructuras macromoleculares es más prominente en los ácidos nucleicos, los cuales, como unidades de la molécula de ADN, son los portadores de la información genética y, como unidades de ARN son los responsables de la traducción de la información genética (MARSCHNER, 1995). En estas macromoléculas el Pi actúa como un puente entre cada base de nucleótido por acoplamiento C3 y C5 de dos ribosas adyacentes a través de esterificación. Otra función importante del Pi es su papel estructural en las membranas celulares (MAATHUIS, 2009). Estas están en su mayoría constituidas por fosfolípidos.

La deficiencia de P causa una rápida disminución en la fotosíntesis. Quizás porque muchos de los pasos en la fijación del carbono requieren azúcar fosfatos.

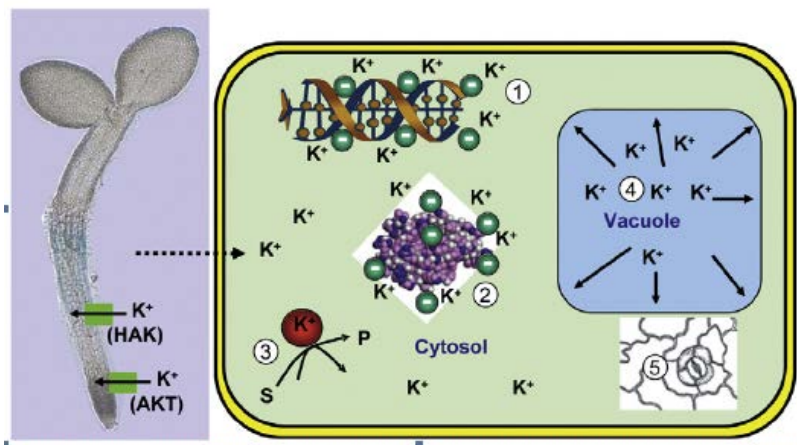
Potasio (K):

Es uno de los elementos más deficientes en los suelos. El ion potasio K^+ se redistribuye fácilmente desde los órganos maduros hacia los jóvenes, por ello los síntomas de deficiencia aparecen antes en las hojas más antiguas. En las

monocotiledóneas (palma), mueren primero las células de las puntas y los bordes de las hojas y la necrosis se va expandiendo.

Es un elemento esencial para la síntesis de proteínas, almidón, y celulosa en las plantas (Figura 7). La celulosa es una componente primario de la pared celular, y la deficiencia de K causa que se inicie rompimiento de la pared, resultando en el aumento de azúcares y aminoácidos en el apoplasto de las hojas (SPANN&SCHUMANN, 2010). La deficiencia de K ocasiona la reducción de azúcares y el agotamiento de los ácidos orgánicos (AMTMANN et al, 2009).

Figura 7. Funciones y distribución del potasio en las plantas.



Fuente: MAATHUIS, 2009

El potasio es un activador de muchas enzimas esenciales para la fotosíntesis y la respiración, y también activa enzimas que son necesarias para la formación almidón y proteínas. (MAATHUIS, 2009, SALISBURY & ROSS, 2000) Es un constituyente de la quinasa pirúvica, síntesis de glutatona, síntesis de succinil CoA, síntesis de glutamilsteina, síntesis de NAD⁺, deshidrogenasa aldehído, etc. Interviene en procesos osmóticos, apertura y cierre de estomas. Un aumento en la concentración de K⁺ en las células aumenta su potencial osmótico y genera efectos en la captación de agua de las células adyacentes y un aumento correspondiente en la turgencia en la células de reserva y por lo tanto la apertura

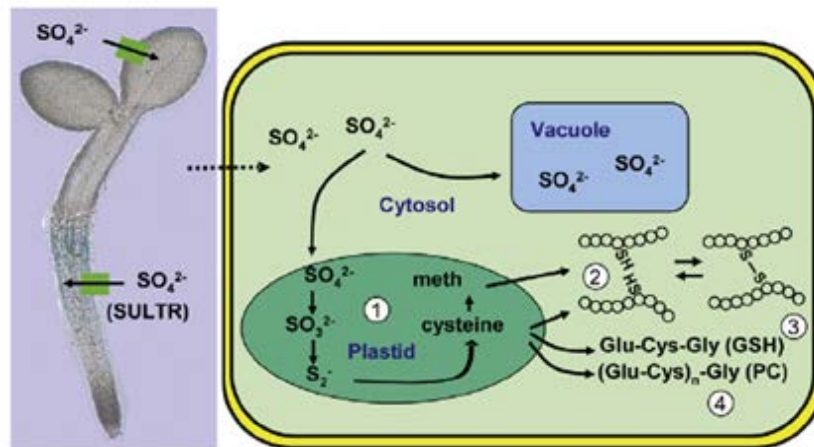
de estomas (MARSCHER, 1995). Interviene en el transporte de carbohidratos y fijación simbiótica de nitrógeno. (SÁNCHEZ, 2007) El papel dominante de K^+ en el suministro de agua y turgencia para la homeostasis es evidente en procesos tales como transporte de solutos en el xilema y floema (MAATHUIS, 2009).

2.3.4.2 Elementos Secundarios

Azufre (S):

Se absorbe del suelo en forma de aniones de sulfato divalente (SO_4^{2-}), el cual es bastante móvil y rápidamente transportado a través del xilema hacia los tejidos donde la mayoría de azufre es reducido. El excedente de S se deposita en vacuolas como SO_4^{2-} . (Figura 8). Aunque algo del SO_4^{2-} podría reducirse en los plástidos de la raíz, se cree que la mayor parte de la reducción de S se produce en los cloroplastos. La asimilación de S implica la reducción del SO_4^{2-} a SO_3^{2-} posteriormente a S^{2-} , el cual es incorporado al aminoácido cisteína.

Figura 8. Funciones y distribución del azufre en las plantas.



Fuente: MAATHUIS, 2009

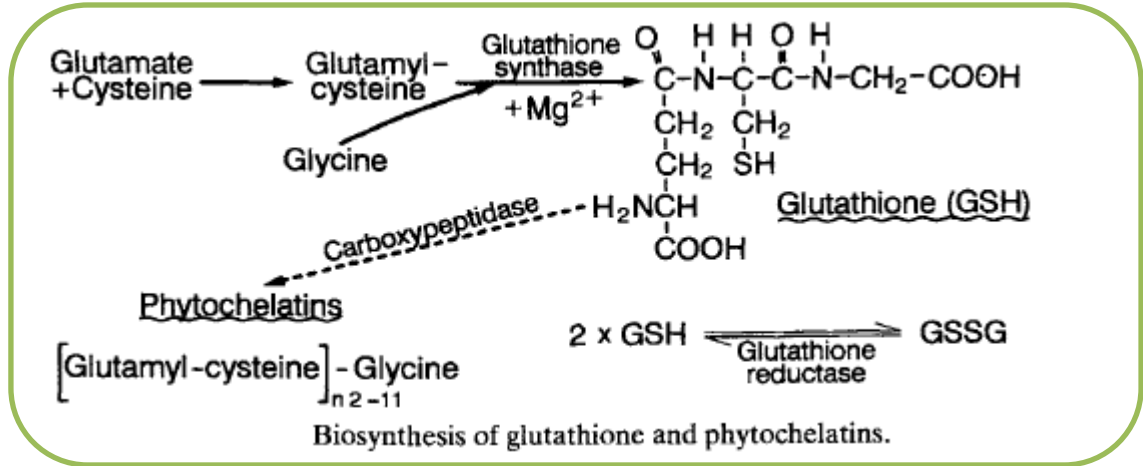
Esto significa que la mayoría del S reducido va a través del floema, principalmente en la forma del tripéptido glutatióna (Glu-Cys-Gly) tanto el transporte intracelular

como en el de larga distancia (MAATHUIS, 2009). En algunas especies vegetales el azufre no se redistribuye con facilidad desde los tejidos maduros, así que la deficiencia casi siempre es notoria en las hojas jóvenes.

Funciones Biológicas: la mayoría del azufre es encontrado en sus formas reducidas haciendo parte estructural de los aminoácidos (cisteína, cistina, metionina, taurina); la cisteína, un aminoácido que hace parte de la ruta del metabolismo primario, la síntesis de proteínas y la formación compuesto de defensa que contiene azufre como los compuestos (SDC) (Figura 8). Todas las proteínas y las vitaminas como tiamina y biotina, también hacen parte de la coenzima A (compuesto esencial en la respiración y para la síntesis y degradación de ácidos grasos), y forma esterres con polisacáridos (SALISBURY &ROSS , 2000).

La producción de glutatona (Figura 9) sirve como un transporte móvil de S reducido pero la glutatona también actúa como un amortiguador redox, por ejemplo, como agente reductor en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno. La glutatona es la base de las fitoquelatinas (MARSCHNER, 1995), en general tienen la estructura de (Glut-Cys)_n-Gly. Se conoce la afinidad de las fitoquelatinas por los metales pesados. El tercer rol de S inorgánico se encuentra en sulfolípidos. Estos son normalmente encontrados en pequeñas proporciones en las tilacoides de los cloroplastos. Se cree que son esenciales para la estabilización de componentes del fotosistema (MAATHUIS, 2009)

Figura 9. Síntesis de la glutatona (GSH).

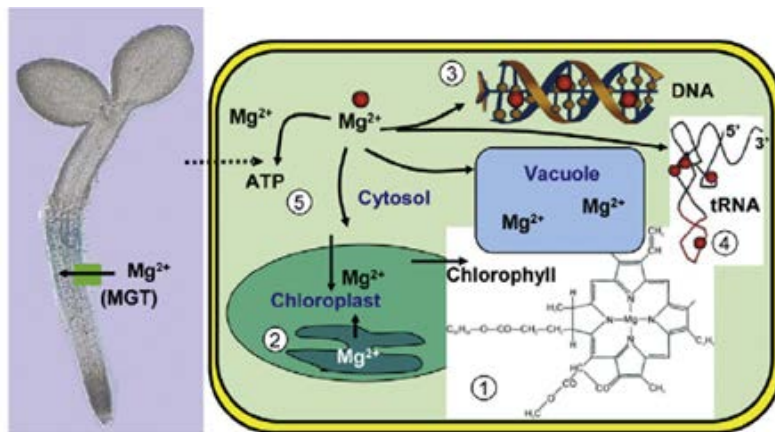


Fuente: MARSCHER, 1995

Magnesio (Mg)

Se absorbe en forma de ion Mg^{2+} divalente (Figura 10). En su ausencia, el primer síntoma que se produce es la clorosis intervenal de las hojas más antiguas, ya que las células del mesófilo situadas cerca de los haces vasculares retienen clorofila durante mas tiempo. Las funciones del Mg^{2+} en las plantas estan relacionadas principalmente con su capacidad de actuar fuertemente con ligandos nucleofílicos (ejemplo, grupos fosforilo) a través de enlaces iónicos, y actúa como un elemento puente formando diferentes complejos estables (MARSCHER, 1995)

Figura 10. Funciones y distribución del Magnesio



Fuente:MAATHUIS, 2009

Funciones Biológicas: El magnesio es mas conocido por su presencia en la clorofila, el Mg^{2+} se encuentra coordinado covalentemente con cuatro átomos de nitrógeno de un anillo porfirinico. La inserción del Mg^{2+} dentro de la fotoporfirina es realizado por la enzima Mg-quelatasa, que consta de varias subunidades que pertenecen a la superfamilia de proteínas AAA (las ATPasas están asociadas con diversas actividades celulares). Recientemente se han realizado considerables progresos para desentrañar la bioquímica de estos importantes procesos (SIRIJOVSKI et al, 2008); resulta ser un elemento esencial porque se combina con el ATP (permitiéndole participar en diversas reacciones) y porque además activa enzimas necesarias para procesos de fotosíntesis, respiración y formación de ADN y ARN (SIRIJOVSKI et al, 2008). Hay una larga lista de enzimas y reacciones enzimáticas que requieren o son fuertemente promovidas por el magnesio, por ejemplo, el glutatión sintasa o PEP carboxilasa. Para esta última enzima en presencia de magnesio, el sustrato fosfoenolpiruvato (PEP) se ligada en mayor cantidad y con más fuerza. (MARSCHER, 1995)

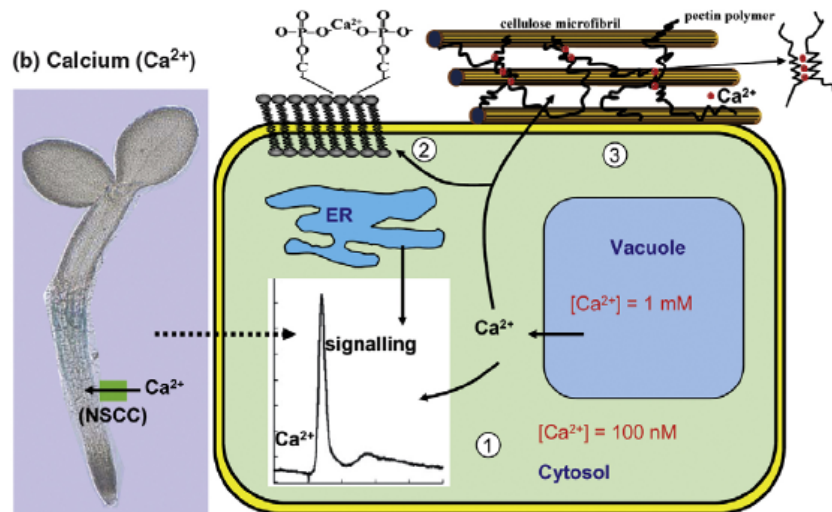
Es constituyente de la tioquinasa acética, quinasa pirúvica, hexoquinasa, enolasa y piruvato descarboxilasa,ayuda al balance electrolítico y da estabilidad a los ribosomas (MARSCHNER, 1995). Actúa como transportador de fosforo en la planta, regula la absorción de otros elementos como el K, P y el Ca. (SALISBURY & ROSS, 2000; SÁNCHEZ, 2007). La acumulación de carbohidratos no estructurales (almidón, azúcares) es una característica típica en las hojas en plantas con deficiencia de magnesio.

Calcio (Ca):

Se absorbe en forma de ion Ca^{2+} divalente. La absorción de Ca por las plantas está influenciada por su estado redox, además de estar relacionada con sus funciones en la pared celular, respiración, fotosíntesis, transpiración y/o sinergismo de otros iones. Las plantas lo absorben únicamente en forma iónica, y es transportado hacia la parte aérea de la planta por el flujo de transpiración a

través del xilema. A diferencia de K y Mg, iones que como el nitrógeno y los compuestos de fosforo, que son fácilmente transportados en el floema (TAGLIAVINI, 2000). Los iones Ca y B, son transportados exclusivamente a través de los vasos del xilema (BERGMANN, 1992) bien en forma iónica o complejado con los ácidos málico o cítrico (VANG-PETERSEN, 1980). El transporte del Ca a las hojas parece estar más relacionado con la tasa de crecimiento de la raíces que con la de los brotes (SCAIFE Y CLARKSON, 1978). A diferencia de lo que sucede con el Mg, parece que el Ca no puede cargarse en las células transportadoras del floema.

Figura 11. Funciones y distribución del calcio en la planta.



Fuente: MAATHUIS, 2009

El calcio es poco móvil ya que se observa que una vez ha llegado a las hojas tiende a acumularse. Se encuentra en mayor concentración en los órganos más viejos de la planta, mientras que los órganos de mayor actividad metabólica (hojas en crecimiento, flores, frutos y meristemos apicales) pueden presentar niveles por debajo de la normalidad, (CHIU & BOULD, 1977) por lo que la deficiencia de este macro nutriente en la fertilización afecta en primer lugar a las partes en formación y meristemos en crecimiento. El resultado es que los síntomas de deficiencia

siempre son más remarcado en los tejidos jóvenes, las zonas meristemáticas de las raíces, los tallos y las hojas, donde existen divisiones celulares, son las más susceptibles quizás porque se necesita calcio para que se forme una nueva lámina media en la placa celular que aparece entre las células hijas. Los tejidos retorcidos y deformados se producen por la deficiencia de calcio. Por lo que las zonas meristemáticas suelen morir en etapas tempranas. (SALISBURY & ROSS, 2000)

Funciones del Calcio.

Estabilizador de la pared celular: en la lámina media el Ca^{2+} se encuentra unido a los grupos R-COO^- de los ácidos poligalacturónicos presentes en las pectinas, permitiendo la unión de varias cadenas formando la conocida estructura denominada “caja de huevo” (REDONDO, 2002); actuando como agente cementante, manteniendo unidas las cadenas de polisacáridos que forman la estructura protopéctina. La protopéctina está localizada en la lámina media y en la pared primaria celular; de la cual hacen parte los homogalacturonano (formados por un polímero lineal de ácido (1→4)- α -galacturónico), el ramnogalacturonano I (RG I) (formado por un disacárido de ramnosa y ácido galacturónico que se repite), y cadenas laterales largas de arabinanos, galactanos, arabinogalactanos y homogalacturonano (BUSTAMANTE, 2009). El Ca^{2+} se acumula en la pared celular, dándole estabilidad e integridad a las pectinas (WISNIEWSKI, 1995; BIGGS, 1997).

Además, el Ca^{2+} , inhibe la acción de poligalacturonasa que degrada las pectinas (KONNO et al., 1984), de hecho, en deficiencia de Ca^{2+} la pared se desorganiza y desestabiliza, colapsándose los tejidos afectados. El Ca^{2+} aumenta la resistencia a la invasión por ciertos patógenos, y mejora la tolerancia a desórdenes abióticos (YUEN, 1993), la actividad de este elemento contra la pudrición de la raíz en cítricos y aguacate por *Phytophthora* es bien conocida (CHAPMAN, 1965; ZENTMYER, 1995). Inhibe drásticamente la acción de la enzima poligalacturonasa, debido a que niveles de Ca^{2+} altos en el apoplasto de las

células generan mayor proporción de pectatos y mayor resistencia a la desintegración de las paredes.

Crecimiento Celular: en ausencia de Ca^{2+} toda actividad de crecimiento en la raíz cesa a las pocas horas. La causa se encuentra en el mecanismo de estimulación de crecimiento promovido por la acción de auxinas. La acidificación de la pared provoca una liberación de Ca^{2+} unido a las pectinas, el cual pasa al citoplasma a activar las auxinas los canales de Ca^{2+} (FELLE H, 1988). Este aumento del Ca^{2+} citoplasmático induce la síntesis de componentes de la pared celular y su secreción al apoplasto (REDONDO, M, 2002).

Secreción: El proceso de secreción requiere Ca^{2+} ya que la presencia de este elemento promueve la formación de vesículas de secreción y su fusión con la membrana plasmática. La acumulación de Ca en determinadas zonas adyacentes a la membrana celular puede dirigir la actividad secretora a dichas regiones, estableciéndose una polaridad celular, necesaria para determinados procesos como el crecimiento del pelo radical o la formación del tubo polínico (REDONDO et al, 2002)

Estabilización Membrana: el Calcio estabiliza las membranas biológicas estableciendo puentes entre los grupos fosfato y carboxilo de los fosfolípidos y las proteínas de membrana (SIMÓN, 1978). La deficiencia de Ca^{2+} provoca un aumento en la tasa de respiración al producirse una filtración de metabolitos desde la vacuola hacia el citoplasma, en donde se encuentran las enzimas respiratorias. La deficiencia de Ca^{2+} origina la peroxidación de los lípidos de membrana, fenómeno que se previene añadiendo calcio o citoquininas. La presencia de calcio es necesaria para la acción de ciertas proteínas de membrana como la ATPasas (REDONDO, M et al, 2002). Su deficiencia o ausencia provoca entre otros efectos despolarización del potencial transmembrana en mitocondrias (GIL-MARTÍNEZ, 1995).

Mensajero secundario en rutas de transducción de señal: como se ha mencionado anteriormente, en el citoplasma se mantienen concentraciones reducidas de Ca^{2+} , mientras que en compartimientos adyacentes se encuentran reservorios del catión, como la vacuola, el retículo endoplasmático y la pared celular, de los cuales por estímulos externos, es liberado al citoplasma (REDONDO, M., 2002). En el citoplasma, los principales sensores de Ca^{2+} son proteínas que lo unen, como las calmodulinas y las proteínas-quinasa independientes de calmodulina. Estas proteínas son capaces de estimular la actividad ATPasa y otras protein-quinasa que culminan en un cambio en la expresión genética (REDONDO, M., 2002). Influye en la compartimentación de la célula, modula la acción de hormonas y señales de respuesta al estrés (MARSCHNER, 1986, DÍAZ, 2007, WHITE, 2003).

Transducción de señales: para que el calcio pueda ser considerado como mensajero capaz de regular los procesos fisiológicos provocados por estímulos primarios deberían cumplirse cuatro criterios (HEPLER & WAYNE, 1985; GILROY et al 1987, POVAIAH et al, 1987):

- 1) El Ca^{2+} citosólico debe cambiar en respuesta a estímulos primarios y tales cambios precederán a la respuesta fisiológica.
- 2) La inducción artificial de Ca^{2+} citosólico evocará una respuesta fisiológica en ausencia de estímulos primarios.
- 3) Las células deben poseer el mecanismo para percibir los cambios en Ca^{2+} citosólico y transformarlo en una respuesta fisiológica.
- 4) El bloqueo de los cambios en el Ca^{2+} citosólico o el sistema de precepción de Ca^{2+} debe prevenir la respuesta fisiológica a estímulos externos.

El calcio es importante para el desarrollo de las raíces, ejerciendo una triple función: multiplicación, crecimiento celular y neutralización de hidrogeniones

(NAVARRO Y NAVARRO, 2000). Adicionalmente el calcio tiende a reducir la permeabilidad de las raíces jóvenes, provocando la expansión de éstas y también la de sus pelillos radiculares, lo que potencia una mayor eficacia en la exploración del suelo (SANZ et al, 2000).

Desde el punto de vista químico, se podría destacar que es el encargado de neutralizar la acidez del suelo aumentando el pH, incrementa el porcentaje de saturación de bases, y participa en los mecanismos de intercambio catiónico entre la solución y el complejo de intercambio catiónico, además de mantener el potencial redox. Él es antagonista de algunos elementos, como K, Fe, Mn, B y Zn dificultando su asimilación y reduciendo la toxicidad generada por Mn, B y Zn (AZNAR, 2001).

Alteraciones de las plantas inducidas por la deficiencia de calcio: con frecuencia, se encuentran frutos, tejidos y meristemos apicales con síntomas de enfermedad (como sucede con la palma) al tener un contenido de calcio mas bajo que en las hojas de las plantas que no presentan la enfermedad (MANSCHER, 1986). La cual puede estar relacionada con los mecanismos implicados en el movimiento dentro de la planta, mencionados anteriormente, que acumula el calcio en las hojas maduras.

Inhibición del crecimiento: la deficiencia de calcio afecta a las regiones meristemáticas del tallo, las hojas y las raíces que, con facilidad, mueren tempranamente; se detiene la mitosis, por lo que las hojas jóvenes presentan malformaciones. Mas tarde, las hojas muestran clorosis marginales y estas áreas laterales inician un fenómeno de necrosis. Al final las hojas caen y se detiene el crecimiento del ápice. El síntoma más característico de la deficiencia del calcio consiste en la morfología de gancho que adquieren los limbos foliares, algo muy común en las palmas afectadas por PC (AZNAR, 2001).

Alteraciones fisiológicas: según análisis de SANZ *et al* (2001), encontraron que la deficiencia de calcio no induce alteraciones significativas en la estequiometría pigmentaria de estructuras de antena y centros de reacción del aparato fotosintético. Y, finalmente, el ligero descenso en la eficiencia del PSII de plantas de tomate deficientes en calcio, se agudiza conforme disminuye la concentración de calcio en el medio de cultivo. Estos datos sugieren que al restringirse el crecimiento de las plantas, ya no es necesaria la producción de los fotoasimilados que se dirigen en condiciones normales, a los sumideros de actividad fotosintética, es decir, a los órganos en crecimiento. Concluyen que ante la ausencia de Ca^{2+} , la planta interrumpe los procesos asociados al crecimiento tratando de mantener vivas el resto de las estructuras existentes (AZNAR, 2001).

2.3.4.3 Micronutrientes

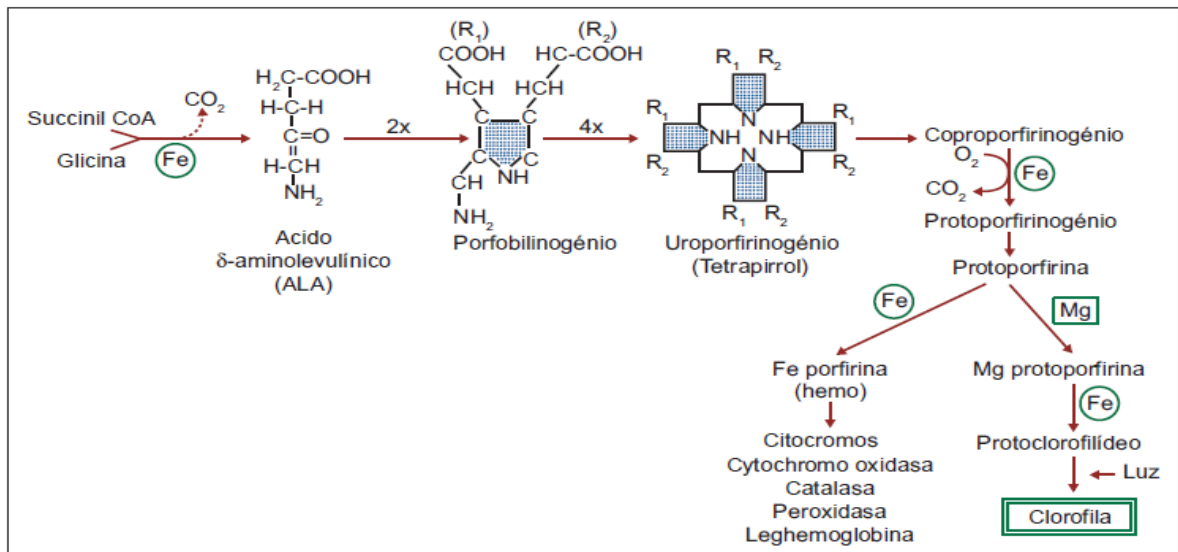
Los micronutrientes son nutrientes que la planta necesita en cantidades mucho más pequeñas (CASTRO, 1998). Los micronutrientes están implicados en prácticamente todas las funciones metabólicas y celulares, como metabolismo energético, metabolismo primario y secundario, protección celular, regulación de genes, señales de transducción y reproducción entre otras (HÄNSCH & MENDEL, 2009). Investigaciones recientes sobre fisiología vegetal han demostrado que los micronutrientes desempeñan un importante papel en la resistencia a enfermedades y plagas (KYRKBY & RÖMHELD, 2008).

Hierro (Fe):

Como metal redox activo este está envuelto en procesos de fotosíntesis, respiración mitocondrial, asimilación de nitrógeno, biosíntesis de hormonas (etileno, ácido giberélico, ácido jasmónico), producción y recolección de especies reactivas de oxígeno, osmoprotección y defensa a patógenos. Más del 80% del Fe celular es encontrado en los cloroplastos lo cual es consistente con su mayor función en fotosíntesis (HÄNSCH & MENDEL, 2009).

Los dos principales grupos de proteínas que contienen hierro son las proteínas hemo y las proteínas Fe-S. Las proteínas hemo se caracterizan por la presencia de un complejo Fe hemo-porfirina, el cual puede actuar, como grupo prostético de citocromo que facilitan el transporte de los electores en la respiración. Otras proteínas hemo incluyen la citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa y leghemoglobina (hemoproteína presente en nódulos radiculaes que fijan nitrógeno en leguminosas). La biosíntesis de la clorofila comparte la misma biosíntesis de las proteínas hemo y a pesar de que la clorofila es una molécula que no contiene Fe, necesita de este micronutriente en tres periodos de su biosíntesis (Figura 12)

Figura 12. Biosíntesis de la clorofila y proteínas hemo.

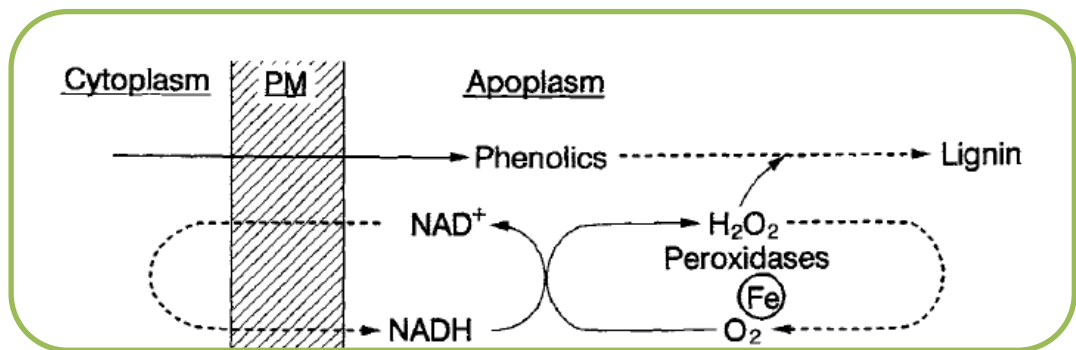


Fuente: KYRKBY & RÖMHELD, 2007

Las actividades de las enzimas hemo disminuyen bajo las condiciones de deficiencia de Fe, caso particular de la catalasa, y peroxidasa. La catalasa facilita la disminución de peróxido de hidrógeno en el agua. Las enzimas hemo desempeñan un importante papel en la asociación con la superóxido dismutasa (SOD). Las peroxidasas ligadas a la pared celular catalizan un segundo tipo de reacción, la polimerización de fenoles para la formación de lignina, requiere como sustrato tanto compuestos fenólicos como H₂O₂. La formación de H₂O₂ es

catalizada por la oxidación de NADH en el plasma de la membrana / interface pared celular (MARSCHNER, 1995). Los principios de estas reacciones se muestran en la figura 13.

Figura 13. Las peroxidasas y la formación de lignina.

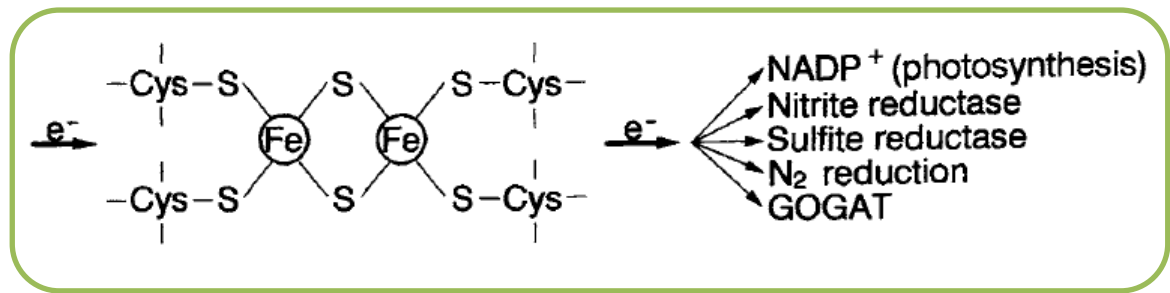


Fuente: MARSCHNER, 1995.

La cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis de las membranas tilacoides de los cloroplastos tiene varios grupos hemo que contiene Fe y combinaciones Fe-S. La deficiencia de Fe genera reducción en el contenido de clorofila al igual que otros pigmentos que captan luz (KIRSKBY & RÖMHELD, 2007).

Otra forma de Fe ligado son las proteínas Fe-S: en estas no hemo proteínas, el hierro se coordina con el grupo tiol de la cisteína o con grupos de S inorgánico, o ambos. La más conocida es la ferredoxina que tienen una función esencial en la transferencia de electrones, mediante una serie de procesos metabólicos básicos (Figura 14), también están envueltas en regulación transcripcional y translacional. La ferredoxina (proteína Fe-S) es el primer compuesto redox estable en la cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis (HÄNSCH & MENDEL, 2009). Los primeros síntomas visibles de deficiencia de Fe aparecen como clorosis en las hojas jóvenes, porque es un elemento poco móvil.

Figura 14. La ferredoxina y la transferencia de electrones.



Fuente: MARSCHNER, 1995.

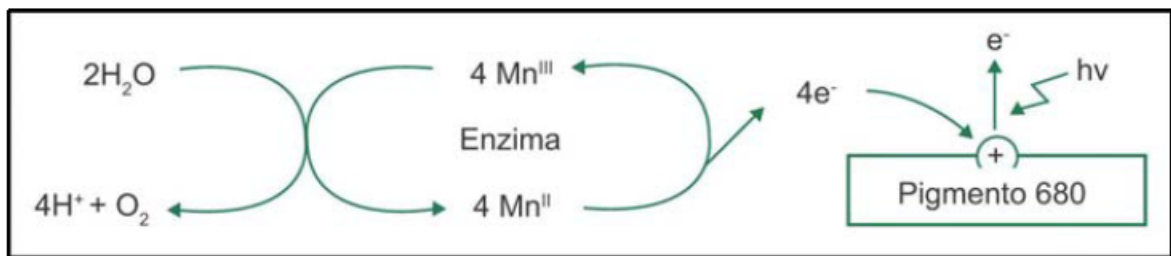
La caída en el nivel de ferredoxina está asociada a una menor actividad nitrato reductasa (NRA). Ambos, ferredoxina y contenido NRA se pueden restaurar con el reabastecimiento de hierro. Otro ejemplo de proteínas de hierro-azufre son aquellas isoenzimas de la superóxido dismutasa (SOD), que contienen hierro como un componente de metal del grupo prostético (FeSOD). La superóxido dismutasa desintoxica los radicales libres de anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) mediante la formación de H_2O_2 y puede contener Cu, Zn, Mn o Fe como componentes metálicos (MARSCHNER, 1995). En los cloroplastos FeSOD es la isoenzima típica de SOD, pero también puede ocurrir en la mitocondria y peroxisomas en el citoplasma (DROILLARD & PAULIN, 1990). La aconitasa también es una proteína hierro-azufre, que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, especialmente la deficiencia de hierro y por ende de la aconitasa afecta los ácidos orgánicos, especialmente el ácido cítrico y málico.

Manganeso (Mn):

Esta presente en las plantas principalmente en forma divalente Mn^{2+} . Se combina rápidamente con ligando orgánicos, en los cuales puede ser rápidamente oxidado a Mn^{3+} y Mn^{4+} . El Mn desempeña un importante papel en los procesos redox, tales como en el transporte de electrones en la fotosíntesis y en la desintoxicación de radicales de oxígeno libres (SALISBURY & ROSS, 2000).

El Mn forma metaloproteínas que son componentes de solo dos enzimas, la enzima que quiebra la molécula de H₂O en el FSII de la fotosíntesis y en la superóxido dismutasa que contienen Mn. La más documentada y exclusiva reacción del Mn en plantas verdes es aquella en la que disocia la molécula de agua y el sistema de evolución de O₂ de la fotosíntesis que se realiza en los cloroplastos, denominada reacción de Hill, (Figura 15) (KYRKBY & RÖMHELD, 2007).

Figura 15. La reacción de Hill



Fuente: KYRKBY & RÖMHELD, 2007.

Los electrones son liberados por la enzima que quiebra el agua, la cual contiene cuatro átomos de Mn y luego son transferidos hacia el FS II. En el proceso de fotólisis, dos moléculas de agua liberan una molécula de O₂ y cuatro de H⁺ con una donación simultánea de cuatro electrones. Una leve deficiencia de Mn afecta la fotosíntesis y reduce el nivel de carbohidratos solubles en plantas. (KYRKBY&RÖMHELD, 2007).

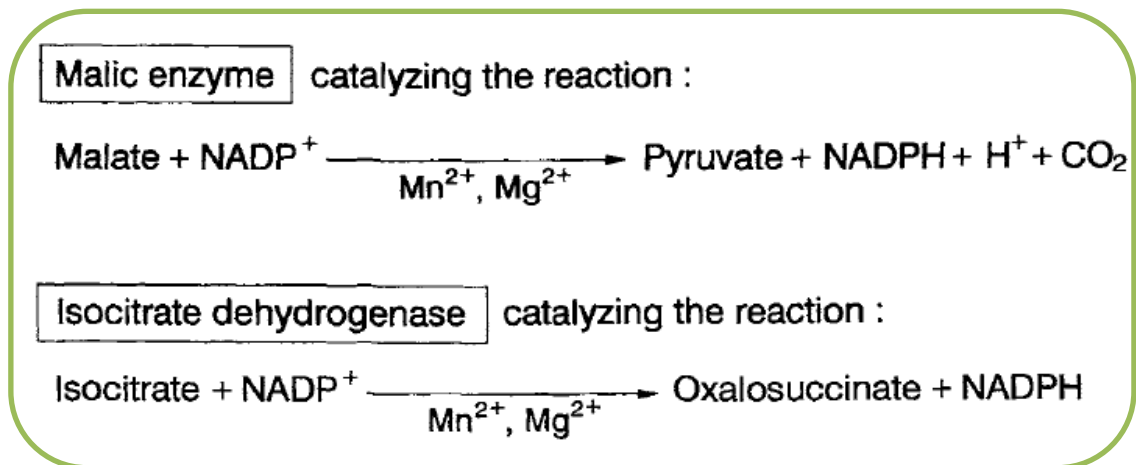
Funciones del Manganeso en las proteínas: sirve como metal catalíticamente activo. El Mn contenido en la superóxido dismutasa protege a la célula de daños efectuados por radicales libres y la oxalato oxidasa (HÄNSCH & MENDEL, 2009).

Ejerce un rol como activador de enzimas: activando las enzimas málico, isotrato deshidrogenasa, PEP carboxiquinasa y fenilalanina amonio liasa (HÄNSCH-& MENDEL). Es un importante cofactor para varias enzimas fundamentalmente en la

biosíntesis de los metabolitos secundarios de la planta asociados al ácido skiquímico, incluyendo aminoácidos, aromáticos fenólicos, cumarinas, ligninas y flavonoides (HÄNSCH & MENDEL,2009).

El Mn actúa como cofactor, en la activación de aproximadamente 35 enzimas diferentes. La mayoría de estas enzimas catalizan la oxidación-reducción, la descarboxilación y las reacciones hidrolíticas. El manganeso tiene un papel primordial en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en reacciones de descarboxilación oxidativa y no oxidativa, como por ejemplo, el NADPH específico en descarboxilar la malato deshidrogenasa, enzima málico, y la isocitrato deshidrogenasa (Figura 16).

Figura 16. El manganeso como cofactor en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.



Fuente: MARSCHER, 1995.

La deficiencia de Mn disminuye la producción de materia seca, la fotosíntesis neta, y acelera la disminución del contenido de clorofila, mientras que las tasas de respiración y la transpiración no se ven afectados.

En muchas especies de plantas síntomas de toxicidad de manganeso se caracterizan por manchas marrones en las hojas maduras, aunque estas manchas marrones contienen manganeso oxidado, el color marrón no se deriva del

manganeso (por ejemplo, MnO_2) se deriva de polifenoles oxidados (WISSEMEIER & HORST, 1992). La formación de manchas marrones es precedida por la formación de calosa en la misma área, las células reaccionan auto necrosándose, lo que indica los efectos tóxicos de Mn^{2+} en la membrana plasmática y podrían mejorarse al suministrar Ca^{2+} (WISSEMEIER & HORST, 1987). La toxicidad de Mn induce deficiencia de otros nutrientes minerales como el Fe, Mg y el Ca. La deficiencia inducida en hierro y magnesio es causada tanto por competencia como por desbalance. La deficiencia de calcio, es uno de los síntomas inducidos por la toxicidad del manganeso, ya que este interviene directamente en la absorción y transporte de calcio, al estimular la actividad de la (AIA)-oxidasa y la polifenol oxidasas que degradan la auxina ácido Indolo-acética (AIA), encargada del transporte de calcio (HORST, 1988).

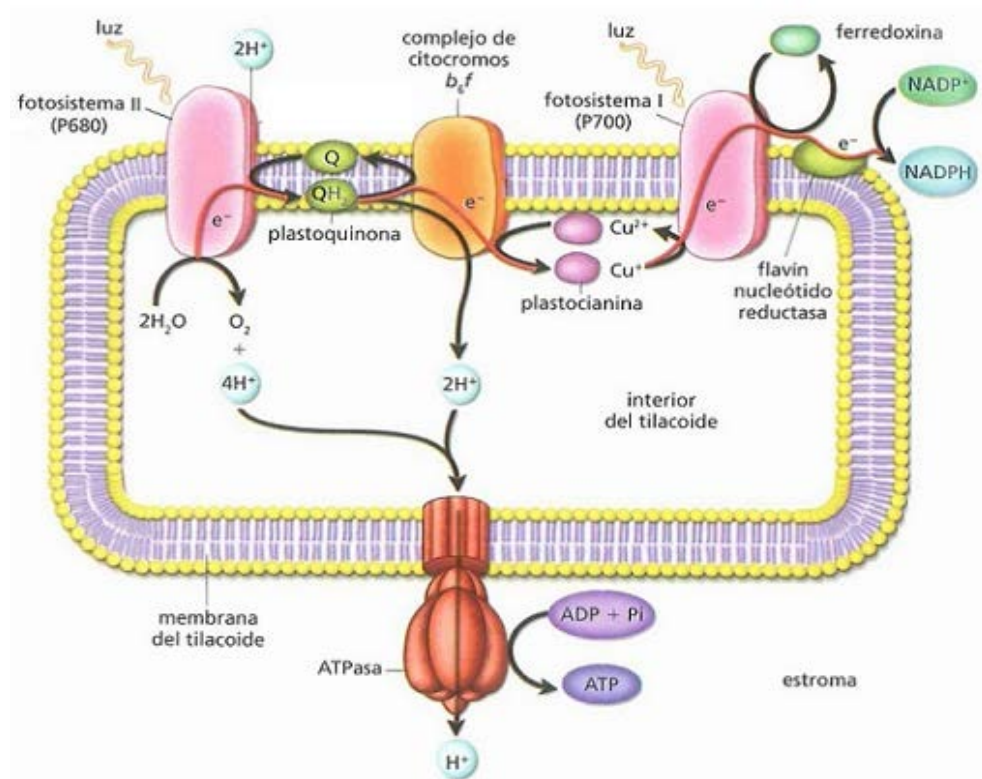
Cobre (Cu):

El cobre es absorbido en forma de ion cúprico (Cu^{2+}) divalente en suelos que estén bien aireados o bien como ion cuproso monovalente en suelos que estén húmedos y con poco oxígeno (SALISBURY & ROSS, 2000). El cobre se parece en algo al Fe, ya que forma quelatos altamente estables que permiten la transferencia de electrones ($\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+$). Adicionalmente participa en los procesos redox de la fisiología de las plantas. A diferencia del Fe, las enzimas que contienen Cu pueden reaccionar con oxígeno molecular y catalizan, preferentemente procesos terminales de oxidación (KYRKBY & RÖMHELD, 2007).

Más de la mitad del cobre en las plantas se encuentra en los cloroplastos participando en las reacciones de fotosíntesis y de respiración mitocondrial, en el metabolismo de carbono y del nitrógeno, en la protección por estrés oxidativo (participando en la desintoxicación de radicales superóxido) y además es requerido para la síntesis de la pared celular (HÄNSCH & MENDEL, 2009). La reducción del transporte fotosintético de electrones, como consecuencia de menores contenidos de plastocianina (Figura 17), una de las proteínas de cobre

mas abundantes en las plantas que transfiere electrones desde el complejo de citocromo b6f al fotosistema I (PALMER & GUERINOT, 2009), disminuye la tasa de fijación de CO₂, de modo que el contenido de almidón y carbohidrato soluble (especialmente sacarosa) también se reduce (KYRKBY & RÖMHELD, 2007).

Figura 17. Flujo electrónico fotosintético (función plastocianina)



Fuente: Cienciestella.com

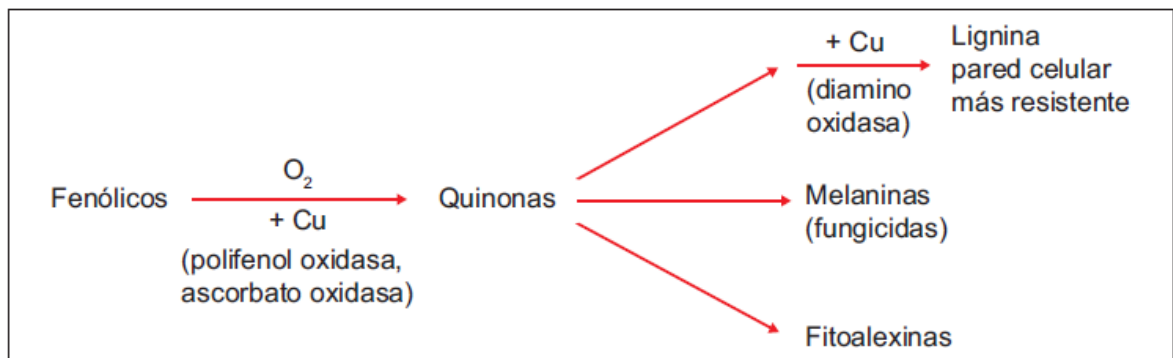
El cobre tiene una gran afinidad por moléculas de dioxígeno, lo cual explica porque el cobre es el metal catalítico en muchas oxidasas. Una de los miembros mas importante de este grupo es la mitocondrial citromo c oxidasa como principal catalizador de la oxidación terminal (PILON et al, 2006)

Por otro lado, las enzimas superóxido dismutasa (SOD) han atraído la atención por el papel que desempeñan en la desintoxicación de radicales superóxido, los cuales pueden causar severos daños a las células por varios mecanismos. La Cu-

Zn-SOD está localizada en los estromas de los cloroplastos, sitio donde el átomo de Cu está directamente involucrado en la desintoxicación de O_2^- generado durante la fotosíntesis. La deficiencia de cobre disminuye la actividad de estas enzimas.

Otro rol importante que desempeña el Cu está en el metabolismo secundario, especialmente cuando existe deficiencia, ya que disminuye la actividad de las enzimas polifenol oxidasa, ascorbato oxidasa y diamino oxidasa, enzimas que están presentes en las paredes celulares desempeñando un papel importante en las reacciones del fenol, vía quinona, a sustancias melanólicas y a lignina; provocando en su ausencia la acumulación de fenoles y la reducción de la lignificación y de sustancias fenólicas.(Figura 18)

Figura 18. Función del Cu en la transformación de fenol



Fuente: KIRKBY & RÖMHELD, 2008

Razón por la cual la presencia de cobre en el metabolismo secundario es importante para incrementar la resistencia a enfermedades, debido a que la formación de lignina interpone una barrera mecánica contra la entrada de organismos patógenos y la producción de sustancias melanólicas también aumenta la resistencia, ya que compuestos de estos, como la fitoalexinas, inhiben la germinación de esporas y el crecimiento de hongos.

Los síntomas típicos de la deficiencia de cobre son clorosis, necrosis, distrofia foliar y muerte descendente (muy similar a los vistos en palma). Los síntomas generalmente aparecen en los tejidos de los brotes, lo que indica una pobre distribución de Cu en las plantas. Otros síntomas son la reducción de la lignificación, que se asocia con brotaciones caídas (KYRKBY & RÖMHELD, 2007).

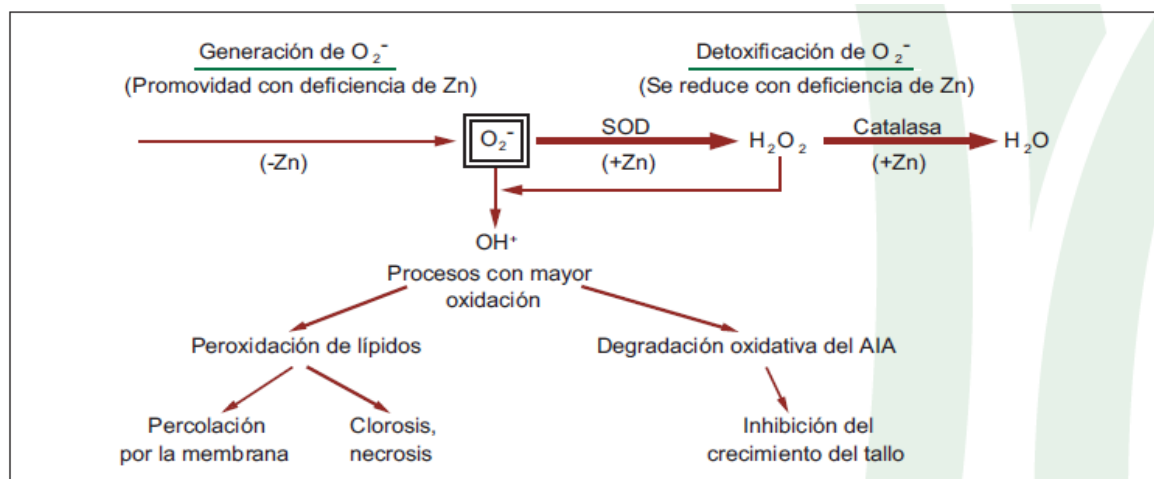
Zinc (Zn):

El zinc se absorbe en forma de Zn^{2+} divalente y probablemente a partir de quelatos de Zn; funciona principalmente como catión divalente en metaloenzimas, algunas de las cuales ligan la enzimas y sus correspondientes sustratos y en otros casos el Zn forma complejos tetraédricos con el N y el O, y particularmente ligado al S en compuestos orgánicos (Kyrkby y Römheld, 2007). Es un elemento importante como componente de enzimas para la síntesis de proteínas, y producción de energía y manteniendo la integridad estructural de biomembranas (HÄNSCH & MENDEL, 2009).

Las deficiencias de zinc causan el retraso del crecimiento del tallo que se debe en parte a que el zinc es necesario para la producción de la hormona de crecimiento llamada ácido indol acético (AIA-Auxina). La deficiencia de zinc también reduce la fotosíntesis en plantas porque genera disturbios en la actividad de hidratos de carbono, causando que la actividad de la anhidrasa carbónica disminuya acentuadamente, ya que esta enzima ubicada en los cloroplastos facilita la fijación fotosintética de CO_2 en plantas C4 y posiblemente también C3.

La isoenzima superóxido dismutasa (SOD) o Cu-Zn-SOD, la cual contiene Zn desempeña un papel muy importante en la remoción de los radicales súper oxidados (O_2^-) y por lo tanto en la protección de membranas y proteínas contra la oxidación (Figura 19). Este control lo hace interfiriendo en la oxidación del NADPH por su función en SOD (CAKMAK, 2000).

Figura 19. Intervención del Zinc en la detoxificación de los radicales superóxido y los efectos de los radicales libres en la función de la membrana y el metabolismo del AIA



Fuente: KIRKBY & RÖMHELD, 2008

Al haber deficiencia de Zn, aumenta la generación de O_2^- y se produce permeabilidad de la membrana plasmática. A medida que los radicales O_2^- tóxicos libres rompen los dobles enlaces de los ácidos grasos polinsaturados y los fosfolípidos de la membrana (causando la pérdida de azúcares, aminoácidos y K^+); aumentan la oxidación de lípidos en las hojas, lo que lleva a la destrucción de la clorofila, necrosis y crecimiento atrofiado producto de la oxidación del AIA, particularmente bajo una alta intensidad luminosa (CAKMAK, 2000; KIRKBY & RÖMHELD, 2008).

Existe cada vez más evidencia de que el Zn, al mantener la estructura e integridad de la membrana y el control de la permeabilidad; también protege a la planta contra varios agentes patógenos. En plantas con deficiencia de este micronutriente, las membranas pierden sus características de permeabilidad de tal modo que los carbohidratos y los aminoácidos son liberados, atrayendo agentes patógenos e insectos hacia las raíces y nuevos brotes (CAKMAK, 2000).

Boro (B):

Se absorbe del suelo casi siempre en forma de ácido bórico sin disociar (H_3BO_3) y es el menos entendido de todos los nutrientes. El boro esta envuelto en numerosos procesos importantes, incluyendo síntesis de proteínas, transporte de azúcares, respiración, metabolismo RNA y carbohidratos, metabolismo hormonas (AIA-ácido indolacético), metabolismo de fenoles, metabolismo del ascorbato y disminución de la toxicidad del aluminio. Por otra parte, tiene funciones relacionadas con la síntesis de la pared celular, lignificación y estructura de la pared celular por reticulación con polisacáridos (HÄNSCH & MENDEL, 2009).

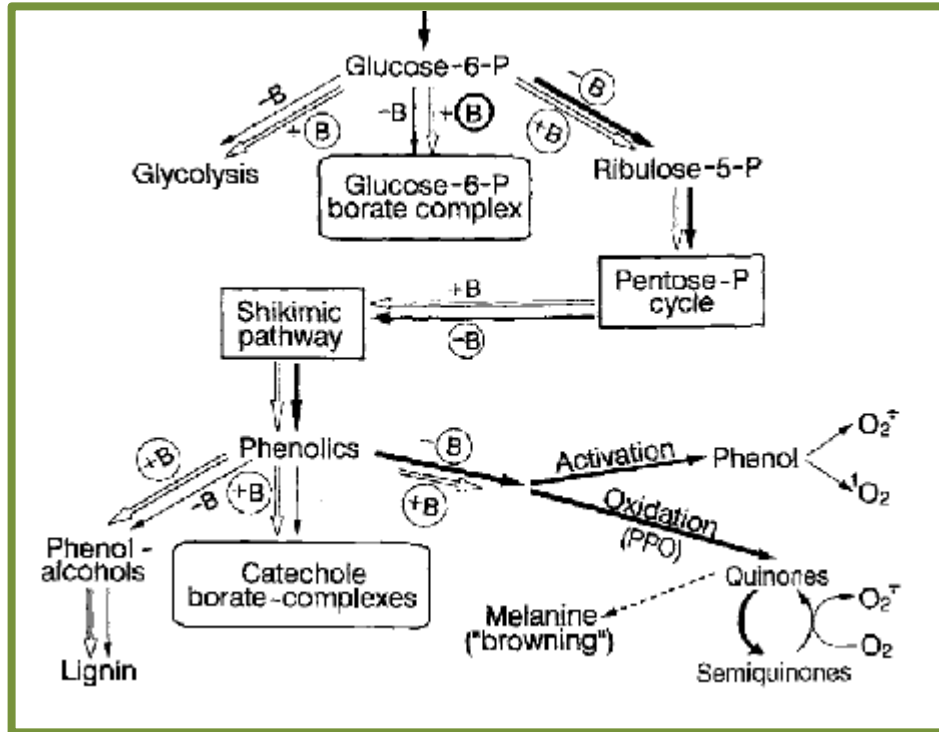
Otras investigaciones han mostrado que el boro puede estimular el bombeo de protones lo que causa hiperpolarización del potencial de la membrana. Mas del 90% de el boro en plantas se encuentra en la pared celular, formando un complejo polisacárido péptico compuesto por ácido bórico y dos cadenas de polisacáridos péptidicos en las paredes celulares (HÄNSCH & MENDEL, 2009).

En deficiencia de boro se afectan las hojas jóvenes dada la bajamovilidad de los oligoelementos, por lo que se ven rápidamente afectadas y aparecen deformadas, quebradizas y pequeñas. Aunque no exhiben clorosis si se pueden encontrar una coloración verde oscura o necrótica en casos severos. La deficiencia de boro afecta dañando órganos en crecimiento como yemas, puntas de raíces y puntos de crecimiento meristematicos, que en deficiencia del elemento enferman y mueren (KYRKBY & RÖMHELD, 2008).

La deficiencia severa de boro afecta la actividad de la enzima ATPasa, ligada a la membrana plasmática y la tasa de absorción de iones disminuyen. La ruta de la pentosa fosfato, y no la de la glicolisis en condiciones de deficiencia, lleva a la degradación de carbohidratos, formando compuestos fenólicos por la vía del ácido skiquímico (Figura 20). La acumulación de los compuestos fenólicos y actividad de la polifenil oxidasa conduce a la formación de compuestos como las quinonas,

produciendo radicales libres superoxidados, que dañan la membrana mediante peroxidación de lípidos

Figura 20. Rol del boro en el metabolismo del fenol y la biosíntesis de lignina.



Fuente: MARCHNER, 1995

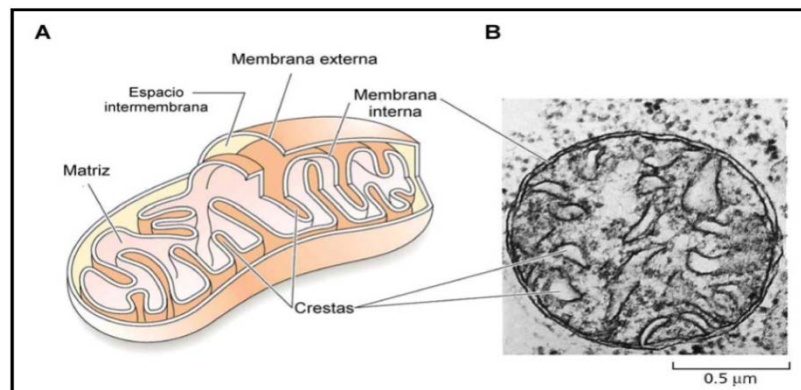
2.4 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

La respiración celular es una de las piedras angulares en la vida de las plantas debido a su función crucial en el metabolismo del carbono y la energía, en organismos heterótrofos la respiración es la ruta para proveer la mayor parte de la energía celular. En todas las células la respiración tiene un amplio rango en las funciones fisiológicas, incluyendo la formación de ATP, la disposición de esqueletos carbonados para biosíntesis, la fotorespiración, la regulación redox de la célula, y un rol muy importante en las respuestas adaptativas ante el estrés abiótico minimizando la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

El metabolismo respiratorio en plantas esta compuesto por una combinación de diferentes rutas; la glicolisis (que esta, al menos parcialmente, presente en el citosol y los plastidios), el ciclo mitocondrial de los ácidos tricarbóxicos (CAT) (el cual se da en la matriz mitocondrial) y la fosforilación oxidativa (que ocurre en el interior de la membrana mitocondrial) (VAN DONGEN et al. 2011).

Las mitocondrias son organelas complejas, propias de organismos eucariotas, que poseen un sistema membranoso interno, con bastantes plegamientos, que se encuentra rodeado por una membrana lisa externa (Figura 21). La membrana lisa externa tiene una gran cantidad de lípidos y es muy permeable a los diferentes compuestos que ingresan a y se segregan desde las mitocondrias. La membrana rugosa interna tiene formas variadas, incluyendo protuberancias tubulares que reciben el nombre de crestas. La membrana interna rodea a una matriz, y muchas de las enzimas que controlan algunos pasos de la respiración celular y el metabolismo en general se encuentran en esta. Es probable que más de la mitad del metabolismo celular se realice en las mitocondrias (SALISBURY & ROSS, 2000a)

Figura 21. Estructura mitocondrial A-estructura tridimensional, B-micrografía electrónica.



Fuente: biologia20.blogspot.com

En las mitocondrias la formación de ATP a partir de ADP y Pi se impulsa directamente debido a la fuerte tendencia termodinámica del O₂ a reducirse, en un

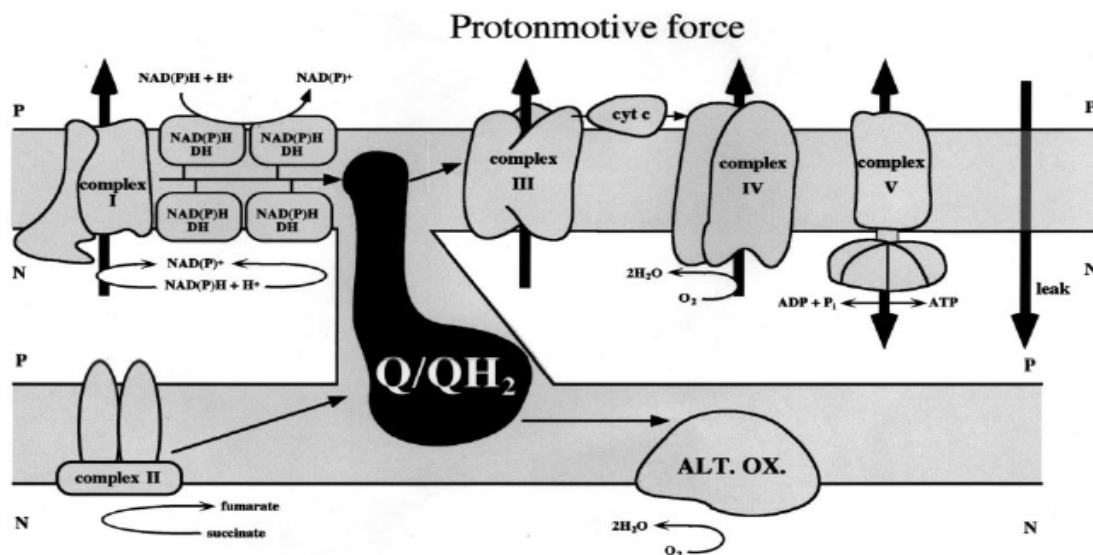
proceso que se conoce como fosforilación oxidativa (SALISBURY & ROSS, 2000). En la fosforilación oxidativa, se produce la reducción de $O_2 \rightarrow H_2O$ con electrones cedidos por el NADH y el $FADH_2$ que captan los electrones de las reacciones oxidativas del complejo de la piruvato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, de la ruta de la β -oxidación de ácidos grasos y de reacciones del catabolismo de aminoácidos. Estos electrones son canalizados en forma de pares electrónicos hacia los complejos proteícos que forman la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones mitocondrial (NELSON & COX, 2008).

2.4.1 Transporte de electrones en la mitocondria.

El transporte de electrones va desde los portadores termodinámicamente difíciles de reducir (con potenciales de reducción negativos) hacia los que presentan mayor tendencia a aceptar electrones (y que tienen potenciales de reducción superiores, incluso positivos). Cada portador en el sistema, habitualmente solo acepta electrones provenientes del transportador previo cercano a él. Los portadores se sitúan en cuatro grandes complejos proteínicos de la membrana mitocondrial interna.

En cada mitocondria existen varios miles de sistemas de transporte de e^- . Estos cuatro complejos están representados en la figura 22: complejo I, NADH-deshidrogenasa; complejo II, succinato deshidrogenasa; complejo III, bc_1 ; y el complejo IV, citocromo oxidasa. La mitocondria produce dióxido de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) así como sustratos celulares biosintéticos. (MACKENZIE & MCLINTOSH, 1999)

Figura 22. Complejos proteínicos de la cadena respiratoria mitocondrial.



Fuente: AFFOURTIT et al. 2001

NOTA: Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial en plantas. Las flechas delgadas y gruesas representan la transferencia de electrones y protones, respectivamente, a lo largo y a través del interior membrana mitocondrial. DH deshidrogenasa; Cyt c, citocromo C; ALT. OX., oxidasa alternativa; P y N se refieren a la carga positiva y negativa sitios al interior de la membrana mitocondrial, respectivamente.

Complejo I o NADH deshidrogenasa: transfiere los electrones desde el NADH hacia la ubiquinona. Vía varios centros redox (FMN y centros Fe-S). Se cree que aproximadamente 40 unidades componen el CI.

Complejo II – Succinato deshidrogenasa: cataliza la reacción de oxidación de succinato a fumarato y la reducción de ubiquinona a ubiquinol.

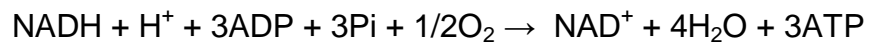
Complejo III - Ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa (bc1): transporta los electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo C.

Complejo IV-Citocromo C oxidasa: transfiere los electrones del citocromo C al oxígeno molecular (STRYER, 1995)

El transporte de electrones en los complejos I, III y IV induce a la translocación de H^+ hacia el espacio intermembrana en contra de su gradiente de concentración, generando un potencial electroquímico que luego será utilizado por el complejo V (F_1F_0 -ATP sintasa) para catalizar la conversión de ADP en ATP. Este complejo consiste en una porción hidrofílica (F_1), sitio de unión a nucleótidos, y un canal de protones (F_0), sitio de ingreso de éstos desde el espacio intermembrana a la matriz a favor del gradiente de concentración (LODISH et al. 2002).

Control de la velocidad del transporte electrónico por el aceptor o control respiratorio:

De la ecuación global para la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria:



Se observa como el P_i y ADP son necesarios para el proceso de transporte electrónico desde el NADH hasta el oxígeno. Modificaciones en la concentración de estos sustratos permite evaluar la respiración mitocondrial en los estados tres y cuatro, los cuales se presentan a continuación.

Estado 3 o respiración activa. En este estado se observa un alto contenido de ADP y sustrato. Al añadir una cantidad conocida de ADP al sistema de transporte de electrones, el consumo de oxígeno experimenta un incremento brusco hasta un máximo; correlativamente se observa que el ADP añadido se fosforila y rinde ATP.

Estado 4. En este estado, por el contrario, se presenta un bajo contenido de ADP y un alto contenido de sustrato, es decir cuando se ha agotado el ADP.

Cuando se ha fosforilado todo el ADP añadido, la velocidad de consumo del oxígeno desciende bruscamente, y vuelve a la velocidad del estado 4, o de reposo.

Este fenómeno, en el que la velocidad de transporte se halla controlada por la concentración de ATP, se llama control respiratorio. La relación estado 3/estado 4, es la relación entre la velocidad de respiración de la mitocondria en presencia de abundante ADP y la velocidad de respiración en ausencia de ADP. Esta relación puede ser igual o mayor a 3 en mitocondrias intactas; sin embargo en mitocondrias lesionadas o envejecidas, estas pierden su capacidad de fosforilar ADP y la relación desciende hasta 1, además se pueden agregar distintos inhibidores o desacoplantes de la cadena respiratoria para evaluar el grado de inhibición de la misma (NELSON & COX, 2008).

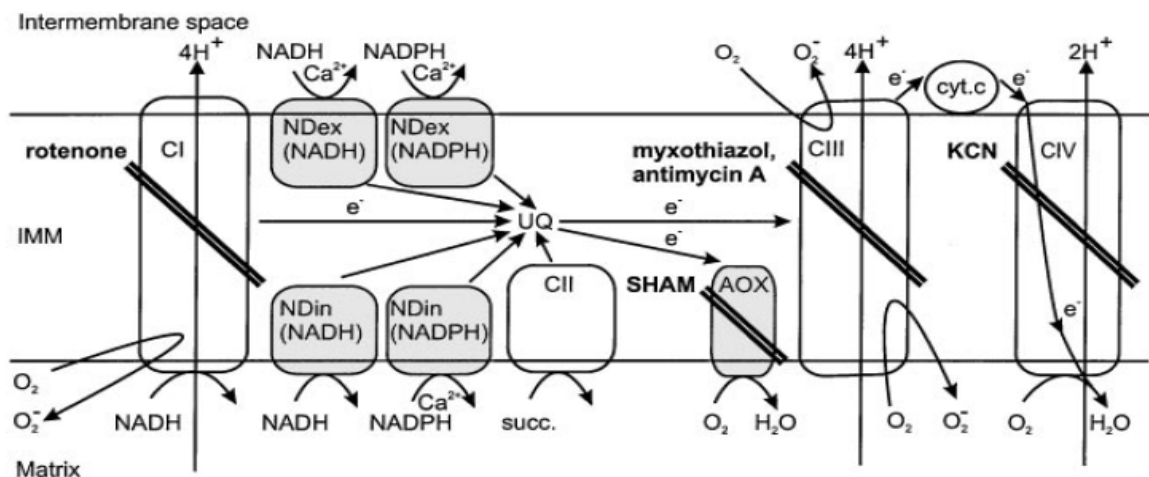
En plantas la cadena de transporte electrónico mitocondrial contiene los complejos I-IV y presentan las mismas propiedades de transporte electrónico que las mitocondrias de otros organismos. Adicionalmente también se conocen los inhibidores de algunos complejos; como por ejemplo la rotenona que puede inhibir el complejo I, la antimicina A y el mixotiazol que inhiben el complejo III y el KCN es capaz de bloquear el complejo IV.

En plantas esta cadena de transporte electrónico contiene cinco enzimas no presentes en animales: una oxidasa alternativa (AOX) que puede ser inhibida por SHAM, lo cual según el modelo de Krab's podría inducir un incremento en el nivel de Q-pool; y cuatro NAD(P)H deshidrogenasas (MACKENZIE & MCLINTOSH, 1999) que son flavoproteínas y sitios potenciales de síntesis de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Moller, 2001)(Figura 23). BAHR & BONNER fueron los primeros en estudiar el fraccionamiento (repartición) de electrones entre el citocromo y la ruta alternativa.

Las oxidasas alternativas son enzimas que permiten a las plantas respirar en presencia de compuestos tóxicos tales como cianuro y monóxido de carbono, funcionalmente es un ubiquinol:oxígeno oxidoreductasa no asociada a un gradiente de protones (AFFOURTIT, 2000). La ruta alternativa permite transportar

electrones hasta el oxígeno, tal vez del ubiquinol a una flavoproteína y desde ésta a la oxidasa. La oxidasa terminal tiene mucho menor afinidad por el O₂ que la citocromo oxidasa, y poca o prácticamente ninguna fosforilación oxidativa se encuentra acoplada al camino alternativo; es decir, conduce principalmente a la producción de calor, no de ATP (SALISBURY & ROSS, 2000b).

Figura 23. Cadena de transporte electrónico en plantas, Oxidasas alternativas



Fuente: MOLLER, 2001.

Nota: Cadena de transporte de electrones de mitocondria de plantas y el complejo ATP sintasa. Adicional a los complejos respiratorios CI al CIV encontrados en otros organismos, la mitocondria de plantas contiene una oxidasa alternativa (AOX) y NAD(P)H deshidrogenasa al lado interno y externo de la membrana interna mitocondrial.

Cuando el oxígeno interacciona con el complejo IV y AOX, dos oxidasa terminales en mitocondrias de plantas, cuatro electrones son transferidos y se produce agua. Se cree que AOX desempeña un papel para regular el estado redox y la relación con las vías metabólicas. Cuando la vía del citocromo de transporte de electrones mitocondrial se inhibe, la relación del NADH/NAD⁺ aumenta y como consecuencia, el ciclo de los CAT baja su velocidad y una cantidad considerablemente menor de esqueletos carbonados se hacen disponibles para las vías metabólicas que se derivan directamente de intermediarios del CAT. Bajo tales condiciones la vía alternativa podría ayudar a

controlar el ciclo CAT. Es concebible que AOX se active en estas circunstancias debido a un aumento de ERO. En efecto, la producción de ERO por la cadena de electrones mitocondrial es reducida por la expresión de AOX (MACKENZIE & MCLINTOSH, 1999; VAN DONGEN et al. 2011), con lo cual se espera disminuir el daño oxidativo causado por los cambios transitorios rápidos en el estado redox de la NAD(P)H y/o ubiquinol-pool por la disminución de un exceso de ubiquinol oxidado o reducido (VAN DONGEN et al. 2011). Las AOX ayudan a disminuir las ERO cuando estas no pasan al complejo III.

Anteriormente se ha mencionado que las AOX ayudan a disminuir las ERO, las cuales se generan principalmente en la cadena de transporte de electrones, por lo cual es pertinente hacer una pequeña revisión de por qué la planta genera ERO, como se generan y como la planta puede desintoxicarse de las mismas.

2.5 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las ERO se generan como respuesta al ataque de patógenos a nivel local. La resistencia inducida se caracteriza por una lesión necrótica que ocurre en el sitio de entrada del patógeno. Estas lesiones son el resultado de la muerte celular programada o reacción hipersensible (HR) que ocurre alrededor del sitio de infección, y se usa para confinar al patógeno y proteger a la planta (LAM et al, 2001). La HR consiste en un mecanismo con gran actividad oxidativa de NAD(P)H deshidrogenasa de la membrana celular ocasionando un estrés oxidativo, resultando en la muerte celular programada (JABS, 1999). El estrés oxidativo resulta del desequilibrio entre los sistemas pro-oxidantes y los mecanismos de defensa y son caracterizados por el efecto dañino de ERO sobre lípidos, proteínas y DNA ocasionando un aumento en la permeabilidad de la membrana, disminuyendo la actividad enzimática y aumentando la posibilidad de mutación.

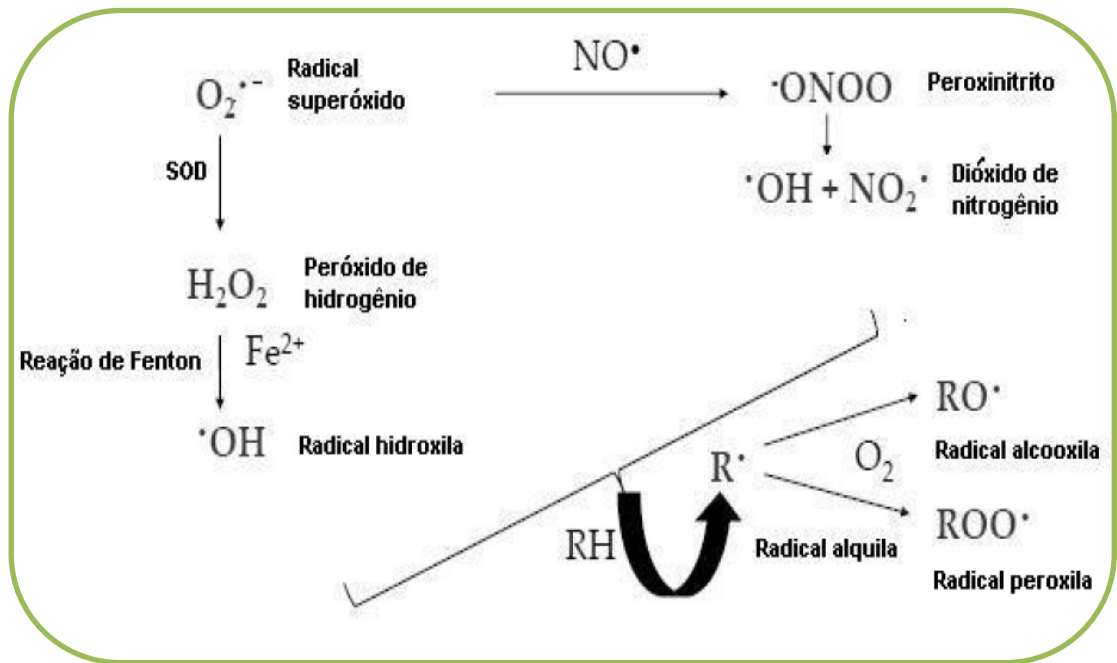
Esta respuesta HR y el estrés oxidativo se caracterizan por un aumento brusco del ion superóxido (O_2^-) y una acumulación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), fenómeno conocido como “burst oxidativo” y ocurre luego de horas de ataque por parte de los patógenos. (MAYER et al, 2001)

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

La mayoría de las ERO son generadas durante la respiración mitocondrial, cuando entre el 1-2% de oxígeno consumido durante la respiración fisiológicamente normal es reducido a radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (OTT et al., 2007). El $O_2^{\bullet-}$ reacciona principalmente con iones metálicos y centros hierro-azufre, facilitando las liberaciones de hierro (BARTOSZ, 2008; TURRENS, 2003). Por la acción de la enzima antioxidante, superóxido dismutasa (SOD), el $O_2^{\bullet-}$ es dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La reacción del H_2O_2 con metales de transición producen radical hidroxilo ($\bullet OH$), la especie más reactiva generada *in vivo*. El $\bullet OH$ reacciona rápida e indiscriminadamente con biomoléculas de todos los tipos, incluida ácidos nucleicos, nucleótidos libres, proteínas, lípidos y carbohidratos (BARTOSZ, 2008). Las reacciones entre $O_2^{\bullet-}$ y el óxido nítrico (NO^{\bullet}) genera el peroxinitrito ($\bullet ONOO^-$), una de las especies reactiva de nitrógeno, un poderoso oxidante que causa daños celulares por variados mecanismos, incluyendo la peroxidación lipídica (MORO et al., 2005; TURRENS, 2003). En la figura 24 están representadas las reacciones envueltas en la generación de radicales a partir de $O_2^{\bullet-}$, y a partir de especies reactivas de nitrógeno (MORO et al., 2005; TURRENS, 2003).

Figura 24. Reacciones de generación de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)



Las ERO son comúnmente vistas como tóxicas, pero actúan en bajas concentraciones como traductores de señales y en altas concentraciones pueden causar daños irreversibles a los ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas (GRIVENNIKOVA & VINOGRADOV, 2006; VALKO et al., 2006). Las ERO pueden reaccionar con proteínas, lípidos, y DNA causando disminución en la actividad enzimática, incrementando la permeabilidad de la membrana y las mutaciones respectivamente.

La producción de ERO podría ser evitada o minimizada y, si se produce, ERO puede ser eficientemente desintoxicada para finalmente poder detener cualquier avance dañino producido por estas. La tabla 2 muestra los mecanismos o estrategias que las mitocondrias de plantas tienen para minimizar la producción de ERO, tales como los que envuelven las AOX, así como variados sistemas para remover las ERO una vez formadas (MOLLER, 2001)

Tabla 2. Estrategia de defensa contra el estrés oxidativo en mitocondrias de plantas

ESTRATEGIAS PARA LA DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO EN MITOCONDRIAS DE PLANTAS	
Primera línea de defensa	Evitar la producción de ERO en la cadena de transporte de electrones manteniendo adecuadamente la oxidación por: <ol style="list-style-type: none"> a. Manteniendo el balance entre la disponibilidad de sustrato y los requerimientos de ATP b. Activación de Oxidasas Alternativas (AOX) c. Activación de proteínas desacopladoras (UCPs) d. Activación de NAD(P)H deshidrogenasas insensibles a rotenona.
Segunda línea de defensa	Desintoxicación de ROS La conversión de Superóxido a H ₂ O ₂ por MnSOD Desintoxicación de Peróxido de hidrógeno por: <ol style="list-style-type: none"> a. Catalasa b. El ciclo de la ascorbato/glutación c. El sistema glutatona peroxidasa d. El sistema tioredoxina
Tercera línea de defensa	Repara el daño causa por ROS: La hidroperoxidación de ácido grasos, por glutatona peroxidasa A las proteínas, por reducción de enlaces disulfuro

Fuente: MOLLER, 2001.

Por otra parte, se ha descubierto una serie de proteínas denominadas desacopladoras, presentes en mitocondrias vegetales, cuya activación por ácidos grasos disminuye la producción de ERO en las mitocondrias (CASOLO et al, 2000).

2.6 PROTEÍNAS DE DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL EN PLANTAS (UCP)

Se ha vuelto mas claro que las mitocondrias de plantas poseen, adicionalmente a la respiración enzimática no dependiente de protones, una extra proteína (UCP)

que también desacopla efectivamente electrones transferidos desde la fosforilación. Estas UCP han sido identificadas en muchas especies de plantas (AFFOURTIT, 2000). Las proteínas desacopladoras (UCPs) forman una subfamilia dentro de la familia de proteínas portadoras de aniones mitocondriales. Las UCPs residen en la membrana mitocondrial interna y catalizan una conductancia de protones que disipa el gradiente electroquímico de protones construido por la cadena respiratoria. Las UCPs son capaces de distribuir la fuerza protón motriz con la ATP sintasa (H^+ fraccionamiento) durante la respiración fosforilativa (estado 3) y parcialmente desacoplar el transporte de electrones de la síntesis de ATP. Como consecuencia de la disipación de energía, un rol consecuente de los homólogos UCP puede ser la protección frente a especies reactivas de oxígeno.

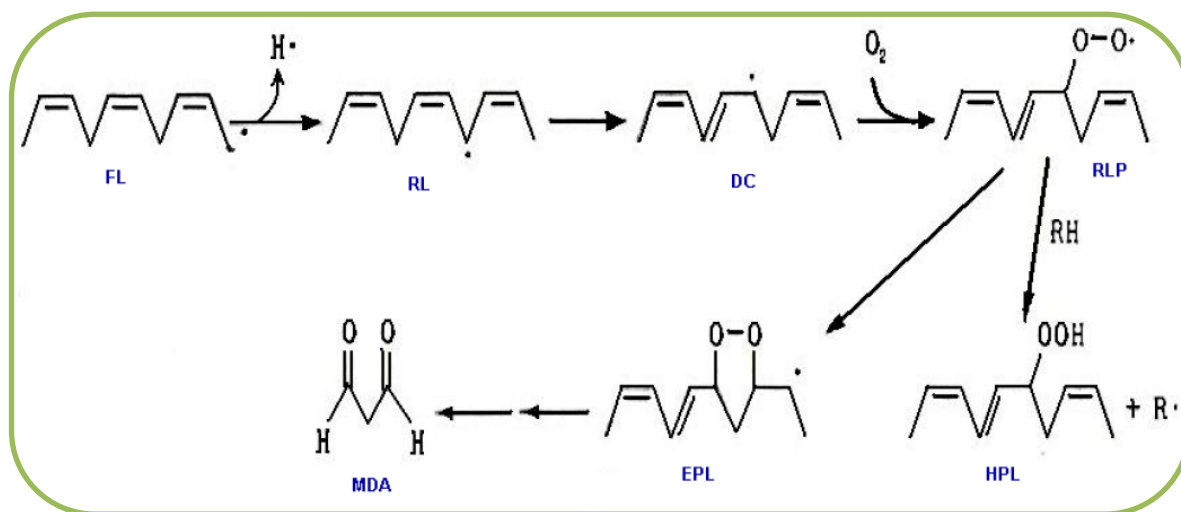
La activación de homólogos de las UCP1 por ácidos grasos libres es frecuentemente debatida aunque el efecto directo de los ácidos grasos libres está bien documentado. Por otra parte parece que el anión superóxido puede activar las UCPs a través de productos de lipoperoxidación de lípidos, tales como 4-hidroxi-2-nonenal (CONSIDINE et al, 2003). Recientemente se ha mostrado que en la fosforilación mitocondrial en los mamíferos, protista y las plantas, las UCPs son capaces de disminuir la eficiencia de la fosforilación oxidativa (ejemplo, la cantidad de ADP fosforilado por consumo de oxígeno) en presencia de ácidos grasos libres. Esto indica que los homólogos de UCP1 pueden ser activados cuando las mitocondrias están en un estado de fosforilación y que ellas pueden competir con la ATP sintasa por la fuerza protón motriz (H^+ fraccionamiento) (SLUSE et al, 2006).

2.7. DAÑOS EN FOSFOLÍPIDOS Y PROTEÍNAS POR ESTRÉS OXIDATIVO.

Los fosfolípidos también son extremadamente sensibles a la oxidación. Las membranas celulares son ricas en ácidos grasos polinsaturados que en presencia de ERO generan radicales peróxido y radicales alcoxido que sufren una serie de reacciones que llevan a un re-arreglo (nueva disposición) con el compromiso de la integridad de las membranas, un proceso conocido como lipoperoxidación. La lipoperoxidación envuelve la formación y la propagación de radicales lipídicos, la captación de oxígeno, la nueva disposición de dobles enlaces en lípidos insaturados y la eventual destrucción de membranas lipídicas. Las membranas biológicas son ricas en ácidos grasos insaturados que si encuentran un medio rico en oxígeno que contiene metales, como el hierro presente en algunas proteínas, se tornan susceptibles a los ataques peroxidativos .

En la figura 25 se presentan las diferentes reacciones que sufren los fosfolípidos (FL) durante la lipoperoxidación. El inicio se da con la abstracción de un átomo de hidrógeno generando un radical lipídico (RL) que tiende a sufrir un reordenamiento, lo que resulta en la formación de dienos conjugados (DC). El ataque por oxígeno molecular produce un radical lipoperoxil (RLP), el cual puede tanto quitar un átomo de hidrógeno a partir de un lípido adyacente, para formar un hidroperóxido lipídico (HPL), como formar un endoperóxido lipídico (EPL). La formación de EPL en ácidos grasos insaturados, que contienen por lo menos tres dobles enlaces, puede llevar a la formación de malondialdeído (MDA) como un producto de degradación (BUEGE & AUST, 1978).

Figura 25.Reacción en el proceso de lipoperoxidación.



Fuente: BUEGE & AUST (1978).

NOTA: FL, fosfolípido; RL, radical lipídico; DC, Dienos conjugados; RLP, radical lipoperóxido; HPL, hidropéroxido lipídico; EPL, endoperoxido lipídico; MD, malondialdehído.

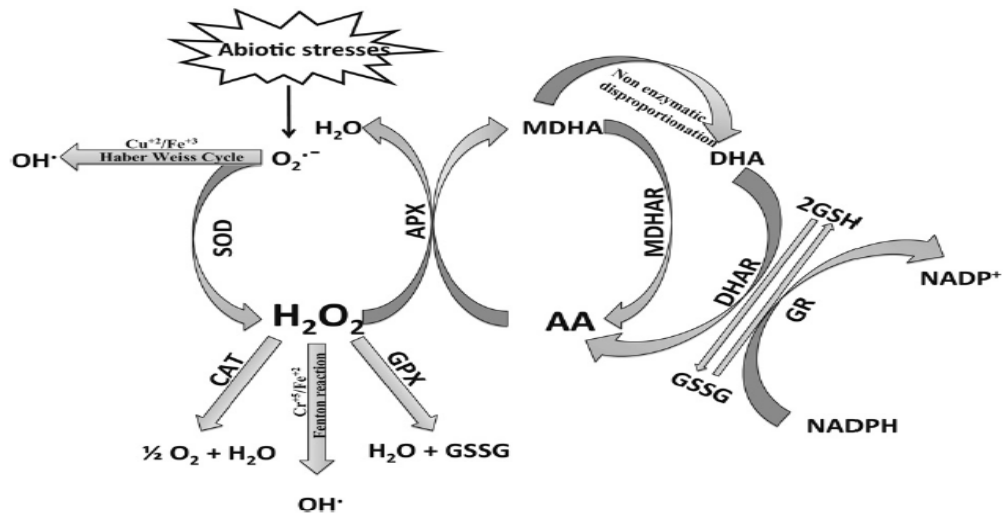
La oxidación de proteínas por ERO está asociada con la formación de diferentes clases de enlaces cruzados, inter e intra proteícos. Un importante mecanismo de toxicidad de $O_2^{\cdot-}$ está relacionado con la oxidación directa de proteínas que poseen grupos hierro-azufre. La aconitasa es un ejemplo de este tipo de proteína, que al sufrir el ataque de $O_2^{\cdot-}$ se inactiva debido a la oxidación del hierro del grupo Fe-S (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994). Los efectos perjudiciales resultantes de la formación de ERO en la mitocondria son prevenidos por varios sistemas antioxidantes. Como se mencionó anteriormente las AOX son activadas por la planta para controlar la formación de las ERO, pero cuando las AOX son suprimidas, gran cantidad de especies reactivas de oxígeno son producidas. Para mantener bajos los niveles de ERO, existen en las células vegetales mecanismos enzimáticos y no enzimáticos responsables de esta función.

2.8 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Entre los mecanismos no enzimáticos se incluyen el ascorbato y glutatona (GSH), los flavonoides, alcaloides, tocofenoles y carotenoides. Estos eliminan directamente el anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca. En cuanto al GSH este es oxidado por ERO, formando glutatona oxidada (GSSG), cuando el ascorbato es oxidado se obtiene el monodehidroascorbato (MDA) y deihidroascorbato (DHA) (KOWALCZYK et al, 2006). Una alta tasa de ascorbato y GSH reducidos son necesarios para una buena defensa oxidante de las células.

Los mecanismos enzimáticos de defensa de ERO en plantas incluyen superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatona peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT). SOD actúa como la primera defensa contra ERO, dismutando el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (GILL & TUTEJA, 2010) (Figura 26).

Figura 26. ERO y mecanismos de defensa antioxidantes.



Fuente: GILL & TUTEJA, 2010.

Nota: APX, ascorbato peroxidasa; AA, ascorbato; CAT, catalasa; GSH, glutatona reducida; GSSG, glutatona oxidada; OH, radical hidroxil; HO_2 , radical perhidroxil; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; MDA, malondialdehído; O_2 , oxígeno singulete; SOD, superóxido dismutasa; $O_2^{\cdot-}$, radical superóxido; monodehidroascorbato reductasa, MDHAR; deihidroascorbato reductasa, DHAR; glutatona peroxidasa, glutatona-S- transferasa, GST)

El radical superóxido es enzimáticamente convertido a H_2O_2 por la MnSOD (en la matriz) y por la Cu y ZnSOD (en el espacio intermembrana y en el citosol). Esta reacción también puede ocurrir espontáneamente en el espacio intermembranal, en cuyo caso, el citocromo c actúa como sistema de defensa para secuestrar el $O_2^{\bullet-}$. De esta forma, su liberación al citosol, debido al aumento de permeabilidad de la membrana externa, contribuye al aumento de la concentración de este radical. El H_2O_2 proveniente de la reacción catalizada por la SOD es descompuesto por las enzimas glutatona peroxidasa, tioredoxina peroxidasa (en la mitocondria) y por la catalasa (en los peroxisomas e interior mitocondrial) (BARTOSZ, 2008; OTT et al., 2007; VALKO et al., 2006; TURRENS, 2003).

2.8.1 Superóxido dismutasa (SOD):

La metaloenzima SOD es la más efectiva enzima antioxidante, se encuentra en todos los organismos aeróbicos y en los compartimientos subcelulares propensos a producir ERO por estrés oxidativo. SOD ha sido propuesta como la enzima antioxidante más importante de la planta frente al estrés y provee la primera línea de defensa frente a efectos tóxicos por elevadas concentraciones de ERO. SOD remueve el $O_2^{\bullet-}$, por catalización y dismutación, un $O_2^{\bullet-}$ es reducido a H_2O_2 y otro oxidado a O_2 . Al eliminar el $O_2^{\bullet-}$ se elimina el riesgo de formación de OH^{\bullet} por la catalización, según la reacción de Haber-Weiss (GILL & TUTEJA, 2010). Las SOD son clasificadas por sus cofactores metálicos dentro de tres tipos conocidos: la Cobre/Zinc (Cu/Zn-SOD), el manganeso (Mn-SOD) y el hierro (Fe-SOD). Mn-SOD esta localizada en las mitocondrias, Fe-SOD en cloroplastos, y Cu/Zn-SOD en el citosol y cloroplastos (CAKMAK, 2000).

Cuando hay un suplemento deficiente de Zn decrece la actividad total de SOD y, mas específicamente la CuZn –SOD, mientras que Mn-SOD no se afecta por esta deficiencia (CAKMAK, 2000). El radical OH^{\bullet} fue sugerido por HODSON & FRIDOVICH (1975) como el responsable de la inactivación de CuZn-SOD. La

inactivación de SOD puede ocurrir en plantas con alta sensibilidad a bajas temperatura.

2.8.2 Catalasa (CAT):

Las catalasas son enzimas tetraméricas que contienen grupos hemo con el potencial para dismutar directamente H_2O_2 y O_2 , estas son indispensables para la desintoxicación de ERO durante condiciones de estrés. La CAT puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de H_2O_2 a H_2O y O_2 por minuto (GILL & TUTEJA, 2010)

2.8.3. Glutaciona reductasa (GR):

Es una flavoproteína oxidoreductasa, encontrada en procariotas y eucariotas. Es una enzima potencial del ciclo de ASH-GSH y presenta un papel esencial en los sistemas de defensa frente a ERO porque mantiene el estado reducido de GSH. Está localizada principalmente en los cloroplastos, pero en pequeñas cantidades también se encuentran en la mitocondria y el citosol. GR cataliza la reducción de GSH, una molécula presente en muchos procesos metabólicos regulatorios y antioxidantes en plantas, donde GR cataliza la reacción dependiente de NADPH de enlace disulfuro de GSSH y es también importante para mantener el GSH pool (GILL & TUTEJA, 2010).

2.8.4 Glutaciona Peroxidasa (GPX):

Son una gran familia de diversas isoenzimas que usan GSH para reducir H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos y lípidos y por lo tanto ayuda a las células de las plantas frente al estrés oxidativo. Presentes en cloroplastos, citosol, mitocondrias y retículo endoplasmático (MILLER, 2002)

2.9 TRANSPORTE DE CALCIO EN PLANTAS.

Los canales permeables al Ca^{2+} son puntos de entrada claves en el citosol. La elevación de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) puede darse por el incremento del flujo de entrada o la disminución del flujo de salida (eflujo), aunque generalmente las señales de Ca^{2+} se inician por el aumento en la actividad de los canales (HETHERINGTON & BROWNLEE, 2004). Las bajas concentraciones de calcio en el citosol se dan porque las membranas tienen baja permeabilidad a este elemento, lo cual es muy importante ya que actúa como mensajero secundario reaccionando a estímulos externos (patógenos, estrés abiótico, etc.), induciendo respuestas fisiológicas y por ende, activando el flujo de Ca^{2+} hacia todas las células de la planta (WHITE & BROADLEY, 2003).

Cuando la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumenta, las membranas remueven este elemento hacia el apoplasto o hacia los organelos intracelulares, lo que presupone un transporte de energía. Esta es catalizada por Ca^{2+} -ATPasas y por el antiporter $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Debido a la remoción de Ca^{2+} desde el citosol estas enzimas desempeñan varias funciones importantes: 1-Mantienen una baja $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en la célula en reposo (no estimulada). 2-restaurar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a los niveles de reposo después de una perturbación, de este modo controla la magnitud, cinética y localización de las señales intracelulares de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. 3-Restaura o responde al abastecimiento de Ca^{2+} intra y extracelular para futuras señales de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y permite la generación de oscilaciones locales de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a través de su interacción con los canales de Ca^{2+} . 4-Proporciona Ca^{2+} al retículo endoplasmático para las funciones del sistema de secreción. 5- Remueven cationes divalentes, tales como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+} , desde el citosol, dando soporte a la bioquímica especializada de organelos particulares para prevenir la toxicidad mineral (White & Broadley, 2003).

Eventos dependientes de calcio tienen lugar en cloroplastos, mitocondrias y núcleo y, consecuentemente, las concentraciones de calcio libre podrían ser

también reguladas por estas organelas y de alguna manera contribuir a especificar la señalización del calcio celular (XIONG et al, 2006). En mitocondrias aisladas de diferentes plantas se comprobó que son capaces de tomar calcio de un medio en presencia de un sustrato de respiración (CHEN & LEHNINGER, 1973). Datos obtenidos con mitocondrias de avena sugieren fuertemente que los fotoreceptores, fitocromos de plantas, pueden regular el flujo de calcio de una manera foto-reversible.

En presencia del rojo de rutenio (un inhibidor de la toma activa de Ca^{2+}) en el medio de reacción, la irradiación luz roja provoca la liberación de Ca^{2+} en el citosol. También se ha comprobado que planta expuestas a Pi y Ca^{2+} en concentraciones mM induce rápidamente la contracción seguida por una alta amplitud de hinchamiento (Arpagaus et al, 2002). Ambos, el Pi y el Ca^{2+} son requeridos y remplazan el Ca^{2+} por una equivalente concentración de Mg^{2+} lo que promueve la contracción pero no el hinchamiento, demostrando que el proceso es específico del ion. El hinchamiento de la mitocondria refleja una expansión de la matriz que termina con la ruptura de la membrana externa y la liberación de las proteínas y especialmente de citocromo c (VIROLAINENE et al, 2002)

Adicionalmente se ha demostrado en plantas que las mitocondrias con sobrecarga de calcio activan los poros de transición de permeabilidad (PTP) resultando en una transitoria despolarización mitocondrial y disminución de la producción de ATP. El PTP puede también causar liberación de proteínas mitocondriales (en especial citocromo c) que activa vías apoptóticas. Interesantemente, bajo anoxia conduce al acelerado agotamiento de ATP e incrementa los niveles de Pi . El inicio del hinchamiento por la inducción de Ca^{2+} así como la velocidad del proceso son acelerados y esto indica, que las mitocondrias se someten a una rápida transición de permeabilidad mitocondrial. (VIROLAINENE et al, 2002; XIONG et al, 2006). Se ha demostrado que en respuesta a estrés oxidativo, el aumento en el transporte de electrones mitocondrial dispara la producción de H_2O_2 , el agotamiento de ATP,

apertura de poro de transición de permeabilidad y muerte celular (XIONG et al, 2006).

La cooperación entre la mitocondria y el citosol esta claramente demostrada cuando la planta experimente anoxia. En esta condición, el Ca^{2+} mitocondrial varía rápida e reversiblemente en respuesta a cambios en la disponibilidad de O_2 . El $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ esta inversamente relacionado con $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Interesantemente el $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ depende de la naturaleza del estrés y genera respuestas diferentes (LOGAN&KNIGHT,2003).

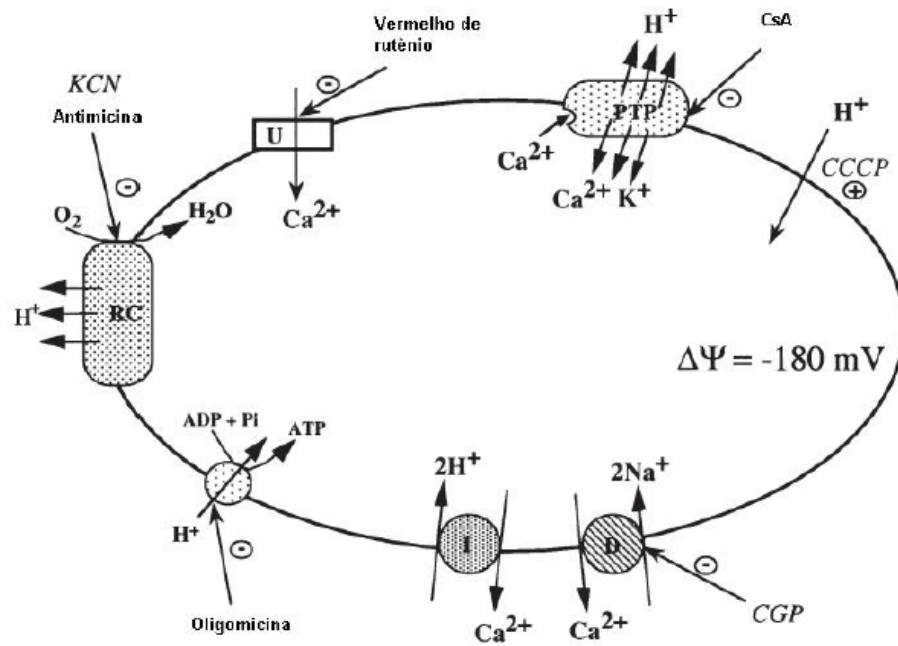
Friel y Tsien han estudiado el rol del FCCP, un desacoplador mitocondrial, en medidas del calcio libre intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generando respuestas suscitadas por otro despolarizador. El FCCP es sensible a frenar tanto el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la estimulación (aparentemente por acumulación de Ca^{2+} desde el citosol) como la recuperación después de la estimulación (liberando la acumulación de Ca^{2+} en el citosol).

La entrada de calcio es realizada por un uniporter específico que permite su rápida acumulación en el interior de la matriz mitocondrial, dependiente de su concentración externa y de su potencial de membrana. Un uniporter puede ser inhibido competitivamente por otros cationes divalentes (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+}), que también son transportados por esta vía, por policationes como el rojo de rutenio (RR) y hexamina cobalto, por anestésicos, guanidinas y diuréticos; y pueden ser activados por los iones transportadores, como Ca^{2+} , y por poliaminas específicas, particularmente la espermina, que promueve la acumulación de calcio cuando el ion está presente en bajas concentraciones (JOUAVILLE et al., 1998, SALVI & TONINELLO, 2004).

Además a este uniporter, otra vía descrita como RaM ("rapid mode of uptake) es capaz de responder a pulsos de calcio semejantes a los que ocurren en 25 en

condiciones fisiológicas (SPARAGNA et al. 1995, GUNTER & SHEU, 2009; SAOTOME et al., 2005; JOUAVILLE et al., 1998). La salida de calcio es realizado por transportadores catiónicos, ($\text{Ca}^{2+} / 2\text{H}^+$). En la figura 27 están resumidas las vías de transporte mitocondrial de calcio y sus inhibidores específicos (GUNTER & SHEU, 2009; SAOTOME et al., 2004; JOUAVILLE et al., 1998).

Figura 27. Vías de flujo de calcio la mitocondria y sus inhibidores específicos.



Tomado de: JOUAVILLE et al. (1998).

NOTA: U- Ca^{2+} , uniporter; RC, cadena respiratoria; PTP, poro de transición de permeabilidad mitocondrial; I - $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, transportador de calcio independiente de sodio; D - $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$, transportador de calcio dependiente de sodio; CsA, ciclosporina A; CGP, benzodiazepina CGP-37157; Ψ , potencial de membrana.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El cultivo de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. es un cultivo con creciente importancia en Colombia. Es el cuarto cultivo del país con una proyección de crecimiento hacia el 2020 del 125% de hectáreas sembradas. De sus frutos es extraído aceite para uso comestible y como biocombustible. Su producción ha sido menguada por la enfermedad conocida como pudrición de cogollo (PC). Esta enfermedad se ha presentado desde hace más de 30 años, pero aun hoy no está claro si su causa es de origen biótica (toma en cuenta el papel de insectos, hongos y bacterias y en ocasiones complicaciones por virus) o abiótica (generalmente relacionada con un complejo de factores climáticos y edáficos como causa de un desorden nutricional muy complejo).

En este trabajo se propone que las dos teorías son relevantes y complementares, que la presencia del patógeno *Phytophthora palmivora* es esencial para el inicio de la enfermedad pero este ataque solo puede ocurrir si la palma ha sufrido pobre fertilización, que se ve reflejada en la baja rigidez de las paredes celulares del meristemo, de donde surgen las hojas jóvenes.

Para comprobar esta hipótesis es necesario realizar una serie de estudios en los que se integre la química analítica del estudio de suelos y tejidos vegetales y la bioquímica de la interacción planta-patógeno (palma-*Phytophthora*) para caracterizar la enfermedad, explicar cómo ocurre, como inicia y así, en un futuro próximo, poder plantear estrategias para controlar la pudrición de cogollo en palma de aceite.

4. HIPOTESIS

Producto del análisis de la información encontrada en la literatura científica y de las diferentes hipótesis planteadas desde hace mas de 30 años, en este trabajo se considera que la enfermedad pudrición de cogollo PC surge como consecuencia de la presencia de un agente causal como los patógenos y del déficit de nutrientes esenciales para la activación de mecanismos de defensa preexistentes en la planta.

Bajo la anterior consideración se plantea que la evaluación de los nutrientes en suelos y tejido vegetal, el estudio de la bioenergética mitocondrial, el transporte de calcio mitocondrial y la cuantificación de las enzimas antioxidantes permitirá comprobar que la interaccion de la planta y el patógeno desencadena una serie de mecanismos de defensa o respuesta por parte de la planta que pueden detener la acción del patógeno cuando esta cuenta con un balance de nutrientes y con una adecuada regulación de sus procesos bioquímicos, evitando así el desarrollo de la enfermedad estudiada.

5.OBJETIVOS

Establecida la anterior hipótesis y teniendo en cuenta la información recopilada y presentada, se proponen los siguientes objetivos para su desarrollo:

5.1 GENERAL

Contribuir al conocimiento de la enfermedad “pudrición de cogollo” en palma de aceite, relacionando fertilización, asimilación de nutrientes y respuestas de la planta al patógeno.

5.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar en palmas sanas, con pudrición de cogollo en estado inicial y avanzado lo siguiente:

- Analizar pH, textura, materia orgánica, composición de azufre, calcio, magnesio, sodio, aluminio, potasio, hierro, manganeso, cobre, boro y zinc en suelo.
- Evaluar en tejido vegetal de cogollo y meristemo de las palmas el contenido total de calcio, magnesio, potasio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y azufre.
- Estudiar respuestas bioquímicas en célula vegetal de las palmas como actividad de enzimas antioxidantes, velocidad de consumo de oxígeno en mitocondrias y el transporte mitocondrial de calcio.

6. METODOLOGÍA

La caracterización de la PC en palma de aceite se realizó desde tres enfoques diferentes:

- I. En suelo se analizó acidez (pH y aluminio), materia orgánica, micro y macronutrientes
- II. En el cogollo y meristemo se evaluó la concentración de micro y macronutrientes y se tomaron imágenes usando microscopia electrónica (SEM)
- III. En las mitocondrias del cogollo y meristemo de palmas de aceite se evaluaron la respiración mitocondrial, el transporte de calcio mitocondrial y la actividad de enzimas relacionadas con estrés oxidativo.

A continuación se describirán cada una de las metodologías usadas.

6.1 SUELO:

La muestra de suelo se tomó en el área de influencia de las raíces de la palma (plato), se retiró la hierba de la superficie y posteriormente se introdujo el palin a una profundidad de aproximadamente 20cm y se tomó una sección cúbica de suelo, se le retiraron los extremos y se tomó la fracción central como muestra. Se introdujo en una bolsa plástica y se rotuló.

Preparación de la muestra de suelo para análisis:

Las muestras de suelo se secaron en bandejas plásticas al ambiente de laboratorio por aproximadamente 24h, dependiendo de la humedad de la muestra y la clase de suelo. Los terrones y agregados grandes se redujeron de tamaño en

un mortero de porcelana. Posteriormente se tamizaron (tamiz 2mm diámetro de partícula). Se rotularon y guardaron para análisis posterior.

6.1.1 pH: Método potenciométrico. Relación suelo: agua(1:1)

- Se tomaron 20g de suelo y se depositaron en el recipiente de muestra. A continuación se adicionó un volumen de 20mL de agua destilada equivalente al peso de la muestra para mantener una relación 1:1 (peso: volumen).
- Se agitó la suspensión usando un agitador magnético durante 10 minutos y se dejó en reposo por aproximadamente 30 minutos.
- Se introdujo el electrodo, agitando la suspensión previamente, asegurándose de que el electrodo quedara inmerso en la suspensión.
- Se tomó la lectura del pH inmediatamente después de introducido el electrodo, cuando mostró una respuesta estable.

NOTA:

Se calibró el pHmetro antes de analizar un grupo de muestras, usando dos soluciones certificadas de Merck de 4 y 7. Se utilizó un pHmetro WTW 301

6.1.2 Acidez intercambiable:

Se realizó la determinación de la acidez intercambiable de los suelos, en el laboratorio, a través de un método titrimétrico. Utilizando un solución KCL 1N. Se realizó utilizando como solución extractora una solución de KCl 1N

Procedimiento:

- Se pesaron 5.0 g de suelo seco
- Se adicionaron 50.mL de solución de KCl 1N.
- Se agitó durante 30 minutos y se filtró la suspensión y se vació el filtrado en un erlenmeyer.

- Se adicionaron 3 gotas de indicador fenolftaleína (10%) y se procedió a titular con solución de NaOH (0.100 N) hasta aparición de un color rosa tenue.
- A la solución previamente titulada con NaOH, se le adicionó gotas de HCl(0.1N) para decolorar
- Se adicionó una solución de NaF (4%). y se agitó
- Las soluciones que contenían aluminio retornó el color rosa
- La solución coloreadas se titularon con una solución de HCl (0.1 N) hasta que desapareció el color

6.1.3 Bases (calcio, magnesio, potasio y sodio):

Se realizó utilizando una solución extractora para bases intercambiables de acetato de amonio 1N y el método de determinación fue absorción atómica, el equipo utilizado fue Thermo Electron modelo S4, con lamparas de Catodo hueco.

Se prepararon patrones de cada elemento de 100 ppm, partiendo de patrones certificados de 1000 ppm y de estas se prepararon los diferentes patrones para la curva de calibración para cada elemento.

Procedimiento:

- Se pesaron 2,5g de suelo y se adicionaron 25mL de acetato de amonio (1N), se dejaron reposar durante la noche.
- Se filtraron y se tomó 1mL del filtrado en un erlenmeyer.
- Se adicionó 1mL de oxido de lantano (10%) y 48mL de agua destilada
- Se realizaron las determinaciones de cada muestra y de sus patrones correspondientes por absorcion atómica.
- Para minimizar cálculos se realizaron las conversiones de los patrones de ppm a meq/100g suelo.

6.1.4. Elementos menores (hierro, manganeso, zinc y cobre):

Se empleó como método el DTPA o Lindsay y Norwel, la técnica de determinación fue absorción atómica, el equipo utilizado fue Thermo Electron modelo S4, con lámparas de cátodo hueco.

Se preparó una solución extractora de DTPA y TEA: En 600mL de agua destilada se agregaron 16,5mL de trietanolamina(TEA), se agitó y se agregaron 1,97g de DTPA, se agitó y se adicionaron 1,47g de (CaCl₂.2H₂O). Se agitó hasta disolución completa, se llevó la solución hasta 900mL y se ajustó el pH a 7 con HCl. Finalmente se aforó a 1L.

Se prepararon patrones de 100 ppm a partir de soluciones patrones certificadas de 1000 ppm de Fe, Mn, Cu y Zn ppm y de estas se prepararon los diferentes patrones para la curva de calibración para cada elemento.

Procedimiento:

- Se pesaron 5g de suelo y se adicionaron 20mL de la solución extractora.
- Se agitó con agitador magnético por un espacio de 20 minutos.
- Se filtraron y se tomaron 2mL del filtrado en un Erlenmeyer, se adicionaron 18mL de solución extractora para tomar las lecturas de Fe presente en las muestras, el filtrado restante se utilizó para la determinación de los demás elementos.
- Se realizaron las determinaciones en un equipo de absorción atómica

6.1.5 Capacidad de intercambio catiónico (CIC):

NTC 5268 - Se realizó utilizando una solución extractora para bases intercambiables de acetato de amonio 1N y el método de determinación fue Titrimétrico

Procedimiento

- Se tomaron 5g de suelo. Se adicionaron 25mL de la solución extractora de Acetato de Amonio (1N). Se dejó reposar durante la noche.
- Se filtró la solución. Se desechó el filtrado y se lavó el exceso de sal amónica con 5 porciones de alcohol solución farmacéutica (97%) de 10mL, sin dejar secar.
- Se desechó el filtrado y se agregaron 5 porciones de 10mL de NaCl (10%) en un erlenmeyer, sin dejar secar entre cada porción.
- Al filtrado obtenido se le agregaron 10ml de formaldehído (37%), 3 gotas de indicador Fenolftaleína y se procedió a titular con NaOH (1N) hasta coloración rosado.
- La capacidad de intercambio catiónico se expresa en meq/100g suelo.

6.1.6 Fosforo (P):

Se determinó el fósforo disponible mediante el método conocido como Bray utilizando una solución extractora compuesta de HCl(0,1N) más NH₄F(0,003N), se determinaron los fosfatos colorimétricamente, aprovechando que los fosfatos con molibdato de amonio y tartrato de antimonio, desarrollan un color azul al reducirse con ácido ascórbico.

Se preparó la solución extractora de P: 1,11g de NH₄F, se adicionaron 8,33mL de HCl y se aforó a 1L

Se preparó la solución A de la siguiente manera: se disolvieron 15g de molibdato de amonio en 50mL + 0,36375g de tartrato de antimonio y potasio, se disolvieron y posteriormente se agregaron 175mL de H₂SO₄, se dejó enfriar y se afora a 250mL. Se preparó la solución B así: se disolvieron 30,5g de ácido ascórbico en 100mL de agua destilada y luego se llevó a un volumen de 250mL.

Con las soluciones anteriores A y B, se preparó la solución de trabajo: se tomaron 6,25mL de la sln A y se disuolvieron, posteriormente se añadieron 2,5mL de la sln B y se llevaron a un volumen de 250mL.

Se prepararon patrones para la curva de calibración partiendo de una solución certificada de 1000 ppm de P.

Procedimiento

- Se pesaron 2,85g de suelo y se agregaron 20mL de solución extractora
- Se agitó por 40seg y se filtro inmediatamente
- Se tomó 1mL del filtrado y se adicionaron 9mL de la solución trabajo
- Se agitó y se dejan reposar por 10 Min.
- Se tomaron las respuestas colorimétricas en un espectrofotómetro Génesis a una longitud de 660nm
- El contenido de fosforo en suelos se expresó en mg/Kg de fosforo.

6.1.7 Azufre .

Se siguió el método fosfato monocálcico 0.008 M, turbimétrico. Se preparó la solución extractora para azufre y boro, pesando 2,03g de fosfato monocálcico monohidratado. Se agregó 1mL de ácido acético glacial y se llevo a 1L.

Se preparó la solución acida: agregando 16,25mL de HNO₃ concentrado y 62,5mL de ácido acético glacial a 125mL de agua. A esta solución se le agregaron 0,5mL de la solución estándar de 1000 ppm de azufre y se llevo 250mL.

Se preparó el reactivo turbimétrico: se disolvieron 2,5g de polivinilpirrolidona(PVP) en 75mL de agua . Se disolvieron 37,5g de BaCl₂ en 125ml de agua. Finalmente se mezclaron la PVP y BaCl₂.Se prepararon los patrones de la curva de calibración de una solución estándar de azufre de 1000 ppm.

Procedimiento:

- Se pesaron 10g de suelo y se agregaron 25mL de la solución extractora
- Se agitó la solución anterior durante 10 minutos utilizando un agitador magnético
- Se filtró la solución.
- Se tomaron 5ml del filtrado y se adicionaron 5mL de la sln acida, se agitó y se adicionaron 2mL del reactivo turbimétrico.
- Se dejó reposar por 20 minutos y se realizaron las determinaciones en un espectrofotómetro Génesis a una longitud de onda de 420nm.
- El azufre se expresa en ppm de suelo o mg/Kg.

6.1.8 Boro:

Método colorimétrico-Azometina H. La solución buffer fue obtenida como sigue: se pesaron 100g de acetato de amonio, se agregaron 50mL de ácido acético y 2,68g de EDTA. Se agregaron 2,4mL de ácidotioglúcolico del 98% y se llevó a 160mL. Solución de color: Se pesaron 0,9g de Azometina H y 2g de ácido ascórbico y se disolvieron en 100mL de agua.

Se preparó una solución patrón de 50 ppm, a partir de una solución estándar de 1000 ppm. De esta se hicieron soluciones patrones par la curva de calibración (0,4-0,8-1,2 ppm B).

Procedimiento:

- De la solución anterior de Azufre se toman 2mL, se adicionan en tubos plásticos (evitar interferencias con los borosilicatos del vidrio).
- Se adicionan 4mL de la solución buffer y se adicionan 2mL de la solución de color.
- Se agitó y se esperó por 45 min.
- Se realizaron las determinaciones en un espectrómetroGénesis, a una longitud de onda de 430nm.
- El boro se expresó en ppm de suelo o mg/Kg.

6.2 Tejido vegetal, cogollo y meristemo de palma (*Elaeis guineensis*)

Muestra biológica.

El material vegetal empleado consiste en tejido de cogollos y meristemas de palma de aceite *Elaeis guineensis* de cultivos comerciales, se analizaron palmas sanas y en estado intermedio colectadas de Cenipalma (Sabana de Torres), las cuales fueron derrivadas con motosierra.

6.2.1 Determinación de micro y macronutrientes en tejido vegetal.

Las muestras de tejidos vegetales se dividieron en hoja 1, hoja 9 o 17, flecha, cogollo y meristemo. Respecto a la hoja 1, 9 y 17 se tomaron según las reglamentaciones existentes para la misma, es decir la parte central de la hoja, donde el raquis es ancho y plano (se dobla la punta de la hoja hacia adentro y se toma la sección central con tijera). La sección se guardó en sobre de manila, previamente rotulado y se mantuvieron refrigeradas para no afectar los tejidos. Las muestras de flecha, cogollo y meristemas se tomaron al siguiente día, luego de exponer al ambiente los tejidos para estos análisis como para los análisis celulares.

Procedimiento:

- Las muestras de tejido, fueron secadas a una temperatura de 70°C durante 48 horas. Posteriormente se pulverizaron los tejidos y se guardaron en bolsas plásticas para análisis.
- De cada muestra se tomó 1g y se adicionó en crisoles de porcelana; las muestras se introdujeron en una mufla a 450°C por un espacio de 4 horas hasta llevar a cenizas.
- Se dejaron enfriar y posteriormente se adicionaron 4mL de HCl (1:1) y se calentó hasta sequedad, teniendo cuidado de no perder material de muestra por salpicadura.

- Cuando la muestra llegó a casi sequedad, se adicionaron 2mL de HCl (1:1) + 2mL de agua destilada. Después de frío se llevó a un volumen de 50mL y se transfirió a recipientes plásticos para sus análisis posteriores.
- En las soluciones anteriores se determinaron directamente por absorción atómica el Fe, Mn, Cu, Zn, utilizando un equipo Thermo Electrón y lámparas de cátodo hueco.
- Para la determinación de las bases (Ca, Mg y K) se tomó 1mL de las solución producto de digestión, se adicionaron 4mL de oxido de lantano y se llevo a 100mL. Las determinaciones se realizaron por absorción atómica en un equipo Thermo Electrón y lámparas de cátodo hueco.
- La determinación de B, S y P se realizaron utilizando la solución de digestión y con los mismos procedimientos espectrofotométricos descritos anteriormente.

6.2.2 Determinación por microscopia Electrónica (SEM)

Para el análisis se tomaron secciones muy pequeñas y delgadas de tejido de hoja necrosada, hoja sin necrosis aparente, meristemo sano y enfermo. Los análisis se realizaron en el laboratorio de Microscopia de la Universidad industrial de Santander utilizando un microscopio de barrido electrónico (FE-SEM) Quanta 650 FEG.

6.3 CÉLULAS DE COGOLLO Y MERISTEMO DE PALMA DE ACEITE

6.3.1 Aislamiento de mitocondrias de cogollo y meristemo de palma de aceite.

Los tejidos colectados se analizaron el día posterior a su recolección. Las mitocondrias fueron aisladas como descrito por Voss et al (1961) con algunas modificaciones. Las células de cogollo y meristemo fueron suavemente homogenizadas en un homogenizador tipo van Potter Elvehjem, utilizándose como medio de aislamiento: Sacarosa 250 mM, Cisteína 3 mM, HEPES-Na 10 mM, pH 7,2, EGTA 2 mM y BSA 0,2 g%. El extracto fue filtrado y la suspensión obtenida fue centrifugada a 1000 x g a 4°C durante 10 minutos, para eliminación de células intactas, membranas y núcleos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante centrifugado a 13000 x g durante 12 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, fue resuspendido y centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante de éste último proceso fue nuevamente centrifugado a 13000xg durante 12 minutos. Las mitocondrias obtenidas fueron resuspendidas en medio de extracción (sin BSA y sin EGTA) y mantenidas a 4°C hasta su utilización.

Para los experimentos de lipoperoxidación las mitocondrias fueron resuspendidas en un medio conteniendo Manitol 250mM, HEPES 10mM, pH 7,2 y EGTA 2mM.

6.3.2 Determinación del consumo de oxígeno

Fueron usadas mitocondrias de cogollo y meristemo de palma de aceite (1mg) aisladas como descrito anteriormente y el medio de incubación compuesto de: HEPES 10 mM (pH 7.4), Sacarosa 250 mM, KCl 2 mM y suplementadas con glutamato de sodio 5 mM o succinato de sodio 3 mM, Pi 1.6 mM y ADP 0.6 mM. Usando un oxígrafo con electrodo tipo Clarck, de Hansatech.

6.3.3 Determinación de la captación y liberación de calcio por las mitocondrias.

Los movimientos de calcio a través de la membrana mitocondrial interna fueron monitoreados con un Fluorímetro marca Photon Technology Inc (PTI), modelo QM40, lámpara de Xenon de 75W usando Fura2AM siguiendo el procedimiento descrito por SCARPA (1979). En este ensayo las mitocondrias (3,5mg/mL) fueron incubadas durante 20 minutos, en oscuridad a 28°C, posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 8100xg.

Las mitocondrias con la sonda fura 2, fueron tratadas con CaCl₂ 35mM siendo que la entrada de calcio fue activada por la adición de sustratos oxidables y la salida por la adición de FCCP.

6.4 DETERMINACIÓN ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.

Todos los ensayos para evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes fueron realizados usando mitocondrias de cogollo y meristemo de palma de aceite como fuente enzimática y se analizaron por espectrofotometría.

6.4.1 Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD fue evaluada de acuerdo al método descrito por NISHIMIKI et al. (1972), con algunas modificaciones, usando como sistemas de reacción TRIS-HCl 10 mM (pH 8,0), NADH 340 μM, NBT 72 μM, PMS 30 μM y mitocondrias 250 μg proteína/mL, seguido a 560 nm.

6.4.2 Catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa fue acompañada por la disminución de la absorbancia a 240 nm (AEBY, 1984) en un sistema de reacción constituido por tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), H₂O₂ 10 mM y mitocondria 130 μg de proteína/mL.

6.4.3 Glutaciona Peroxidasa (Gpx)

La actividad de la Gpx fue evaluada de acuerdo a la técnica propuesta por FLOHE & GUNZLER (1984). En un sistema de reacción compuesto por tampón fosfato 100mM (pH 7,0) EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0,15 mM, Gred purificada 0,2 U, t-butil hidroperóxido 0,5 mM y mitocondria de cogollo y meristemo de palma 50 µg de prot/mL. La reacción fue analizada a 340nm.

6.4.4 Glutaciona Reductasa (Gred)

La actividad de la Gred fue evaluada de acuerdo a los descrito por Sies et al, 1979, en un sistema de reacción constituido por tampón fosfato 100mM (pH 7), EDTA 1 mM, GSSG 0,66 mM, NADPH 0,075 mM y mitocondria de cogollo y meristemo de palma 50 µg de proteína/mL. La reacción fue monitoreada a 340 nm.

6.5 MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA

En pruebas con mitocondrias aisladas de cogollo y meristemo de palma se utilizó para cuantificar proteína el método de BRADFORD (1956).

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (media \pm DE) y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y se uso el programa Prism GraphPad 6.0, y el test de Tukey para la comparación de promedios. Se consideró estadísticamente significativo si se comparó el nivel de significación de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 NUTRICIÓN

En la determinación de la nutrición de las palmas analizadas se tomaron muestras de suelos y tejidos vegetales de las palmas descritas en la tabla 3.

Tabla3. Material Vegetal.

Estado de la palma	PALMAS ERRADICADAS EN LOTES DE CENIPALMA (FINCA LA VIZCAÍNA) SIEMBRAS 2003				
	LOTE	LÍNEA	PALMA	MATERIAL	CRUZAMIENTO
Enferma	L2B1	1	5	AAR	DELI X AVROS DUMPY
Sana	L2B1	8	12	AAR	DELI X AVROS DUMPY
Enferma	L7 B1	67	10	UNITED PLANTETION	DELI X AVROS X YANGAMBI
Sana	L4B2	13	7	AAR	DELI X AVROS DUMPY
Enferma	L3B2	75	11	UNITED PLANTETION	DELI X AVROS X YANGAMBI
Enferma	L3B2	42	27	UNITED PLANTETION	DELI X AVROS X YANGAMBI

Teniendo en cuenta la dificultad para la colecta de palmas, especialmente las palmas sanas, debido a la incidencia de la enfermedad en la zona central, los palmeros no permiten el corte o erradicación de palmas sanas. Se tomaron palmas en lotes diferentes, pero se aclara que en las palmas colectadas vienen recibiendo condiciones iguales de mantenimiento, fertilización, entre otros (Tabla 4).

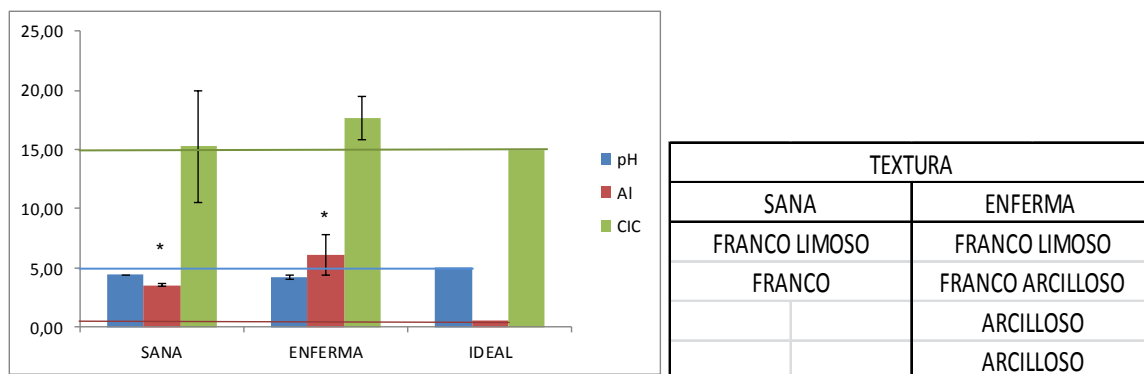
Tabla 4. Fertilización.

FERTILIZACIÓN									
Primer fraccionamiento		Segundo fraccionamiento					Tercer fraccionamiento		
Compuesto 13-6-23-6-9-0,8	Bórax	NITRA SAM	DAP	KCl	Kieserita	Bórax	Borato 48	Compuesto 13-6-23-6-9-0,8	Agrimins
<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> Palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma	<u>Kg</u> palma
1	0,03	1,40	0,30	1,50	1,00	0,12	0,08	2,0	0,04
1	0,03	1,40	0,30	1,50	1,00	0,12	0,08	2,0	0,04
0,8	0,03	1,40	0,30	1,50	1,00	0,12	0,10	2,0	0,04
2	0,03	1,40	0,30	1,50	1,00	0,12	0,10	2,0	0,04
3,5	0,03	1,40	0,30	1,50	1,00	0,12	0,10	2,0	0,04
3,5	0,03	1,40	0,30	1,50	1,00	0,12	0,10	2,0	0,04

La fertilización incluye elementos mayores (N, P, K), elementos secundarios (S, Mg) y microelementos (Fe, Mn, Cu, Zn y Boro). No hay una fuente directa de corrección de pH y en el suelo hay aluminio tóxico para las plantas que se encuentra en altas cantidades.

Para los análisis de suelos se tomaron muestras alrededor de cada palma cortada, en caso de que hubiera fertilización reciente (enfermas últimas), la muestra se tomo en la calle.

Figura 28. Resultados análisis de suelos.



NOTA: La CIC y el Al están en Meq/100

* Nivel de significancia P <0,05

ELEMENTOS EN SUELOS										
	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Sana	9,87	0,013	4,90	2,29	10,8	156	43,6	3,57	2,19	0,60
Enferma	2,91	0,051	6,06	1,97	10,4	139	75,2	4,48	2,05	1,31
Ideal	4,50	0,200	2,00	1,20	10,0	15,0	5,00	1,00	0,50	0,25

El pH en los suelos tanto enfermas como sanas, presenta niveles por debajo del nivel ideal; mientras que el Al se encuentra en niveles superiores al ideal, como se mencionó anteriormente el pH menor a 5,5 limita la disponibilidad de nutrientes y aumenta las concentración de elementos tóxicos como el Al, Fe y el Mn, lo cual es claro en los resultados obtenidos en los análisis de suelos.

Aunque los análisis muestran contenidos por encima del valor considerado ideal en cuanto a Ca en suelos, donde incluso las palmas enfermas presentan un mayor contenido, se debe correlacionar este dato con los niveles de aluminio y pH ya que la acidez esta representada en la cantidad de Al el cual no debe ser mayor de 0,5meq/100g. Aunque existe buen contenido de Ca,este aún no ha regulado el contenido de Al, esta condición podría deberse a la textura del suelo, que en la mayoría son suelos arcillosos, los cuales se conocen como suelos pesados que impiden a las raíces explorar adecuadamente y generan en condiciones de alta humedad, asfisia de raíces. Por esto se debe hacer una fertilización con una fuente que permita una mejor efectividad frente a estos componentes negativos

como la acidez y también mejorar la aplicación de materia orgánica que ayude a mejorar la textura.

La concentración de Al, como se menciona en la literatura, forma Al(OH) tóxicos, adicionalmente su capacidad de unión a las pectinas, la cual es mayor que la del Ca en la paredes de las raíces, aumenta la rigidez de la paredes de la raíz impidiendo su expansión (Garzón, 2003), impidiendo a la raíz extenderse y explorar adecuadamente el suelo, lo cual limita la toma de nutrientes, especialmente cationes como el Ca^{2+} y el K^+ . La primera consecuencia de altos contenidos de Al es la reducción en la absorción del Ca^{2+} (RENGEL, 1992), bloqueando su acción como mensajero secundario, impidiendo a la planta realizar sus señales de transducción, que le permitan activar sus defensas frente a condiciones adversas (patógenos o medio que la rodea). Por esta razón aunque en el suelo aparentemente hay buen contenido de Ca, mas adelante se constata que los análisis de foliares no muestran buenos niveles de este elemento en la planta.

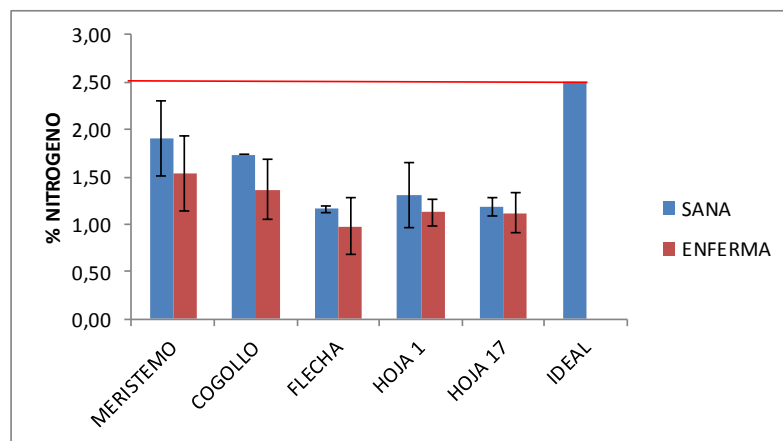
Según los análisis de suelos, la mayoría de elementos se encuentran por arriba del nivel ideal, exceptuando el fósforo y el potasio. Esto es bueno, pero también se debe a las fertilizaciones realizadas, es importante aclarar que se deben correlacionar los suelos y los análisis foliares, ya que en algunas ocasiones aún estando presentes los elementos en el suelo, por razones de acidez, textura y competencia entre ellos, no hay una toma adecuada de los mismos. Caso concreto el P y el Ca^{2+} que es capturado por el aluminio y no lo deja disponible a las plantas.

Las texturas de las palmas sanas son texturas francas y franco-limosas, estas, que son buenas texturas, permiten la retención de nutrientes, pero a su vez le permiten a las raíces expandirse y mejoran la efectividad de los fertilizantes. Por el contrario las palmas enfermas se encuentran en suelos arcillosos, que como se

menciona en la literatura posee buenas características químicas, pero pésimas condiciones físicas; se erosionan fácilmente porque el agua no penetra con efectividad, situación que no permite que los fertilizantes aplicados penetren, afecta a las raíces por falta de aire e intercambia constantemente aluminio al suelo, aumentando las condiciones de toxicidad de aluminio. Sumado a que las plantas toman la mayoría de sus nutrientes vía raíz, esta condición puede afectar directamente a la planta predisponiéndola para ataque de patógenos por déficit de nutrientes (CASTRO, 1998; LAING,2009).

La capacidad de intercambio de cationes en las palmas sanas y enfermas se encuentra en condiciones adecuadas, esta propiedad esta relacionada con la absorción de cationes y la liberación de los mismos, es afectada por la textura, la materia orgánica y el aluminio(CASTRO, 1998). Las palmas enfermas se encuentran en suelos arcillosos, las arcillas son grandes intercambiadores de nutrientes, esto es positivo en la mayoría de los casos, pero en suelos con alto contenido de aluminio, es negativo ya que ella estan contantemente liberando aluminio a la solución del suelo. En cuanto a la materia orgánica estos suelos presentan niveles bajos, la aplicación de fuentes de materia orgánica podría mejora las condiciones de fertilidad y también beneficia al mejorar la textura, haciendo que esta condición cambie (CASTRO,1998).

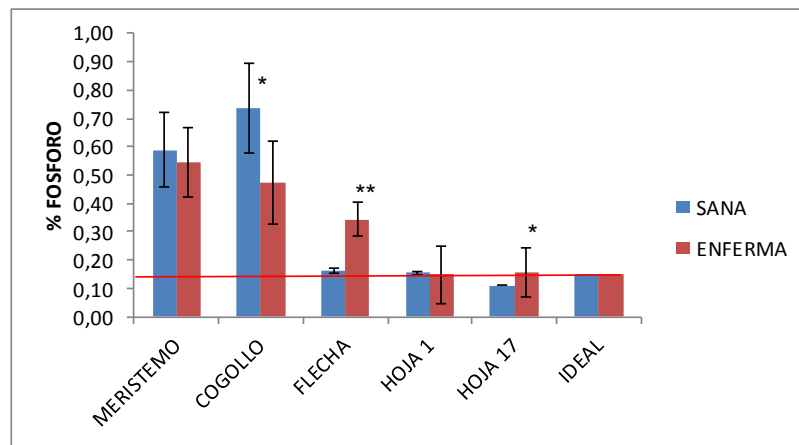
Figura 29. Contenido de nitrógeno en tejidos de *Palma Elaeis guineensis* Jacq.



El contenido de nitrógeno se encuentra en los tejidos por debajo del valor ideal, factor que esta relacionado con la regulación y señalización de proteínas, mantiene en la homeostasis (el equilibrio), hace parte de, metabolismo secundario o metabolismo de defensa(Maathius,2009) Sin embargo es claro que en la fertilización (ver tabla fertilización), se aplica constantemente, por lo cual aunque se encuentre aparentemente bajo, su aplicación constante permite la corrección del mismo y evita que la planta, independientemente si es sana o enferma, muestre la deficiencia.

Es un elemento muy móvil y se desplaza fácilmente a los lugares donde existe gran actividad metabólica (Aznar, 2001), lo cual se puede observar claramente según los datos obtenidos, porque se encuentra distribuido en toda la planta, pero adicionalmente hay mayor contenido en el meristemo, centro reproductivo de la planta.

Figura 30. Contenido de fósforo en tejidos de Palma *Elaeis guineensis* Jacq.



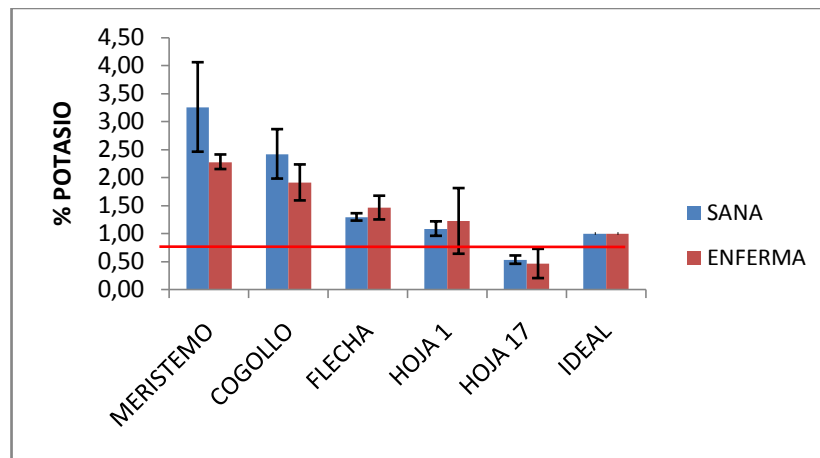
* Nivel de significancia P <0,05 ** P < 0,001

En los tejidos analizados los contenidos de fósforo se encuentran prácticamente en los valores ideales, no se puede determinar una tendencia clara entre palmas sanas vs enfermas; en la fertilización es un elemento que al igual que el K y N son aplicados constantemente (ver tabla de fertilización), por ello a pesar de la

presencia de aluminio alta en los suelos analizados, no logra ser completamente bloqueado y la palma logra absorberlo.

El P es controlado por el pH y el aluminio con el cual forma complejos que impiden su absorción por la planta, este elemento hace parte importante de procesos energéticos ya que hace parte del ATP, permite el sostenimiento de las membranas constituyendo los fosfolípidos, su deficiencia afecta estos procesos y la deficiencia afecta rápidamente la fotosíntesis y la fijación de carbono que requiere de Pi para llevarse a cabo. Teniendo presente este factor es pertinente mejorar las condiciones de acidez y aluminio que permitan que las cantidades aplicadas en la fertilización sean aprovechables por la planta, y que los procesos energéticos vitales para el desarrollo óptimo de la planta sigan su curso.

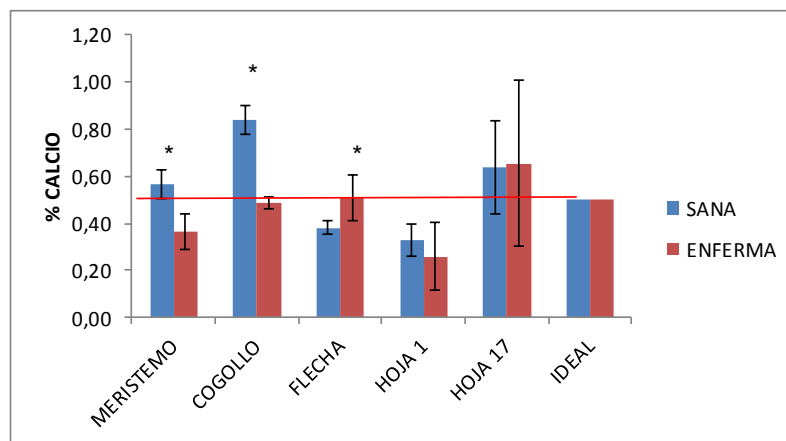
Figura 31. Contenido de potasio en tejidos de Palma *Elaeis guineensis* Jacq.



El potasio contrario al Calcio, se redistribuye fácilmente desde las hojas viejas, y los datos muestran claramente esto, muestran la movilización del K de las hojas adultas a las zonas jóvenes, aunque es un elemento bajo en los suelos, debido a los requerimientos para la producción es aplicado constantemente, razón por la cual no se encuentra deficiente y la hoja 17 permite su control y corrección adecuada en la fertilización tomando esta hoja guía.

El potasio es otro elemento que debe estar en equilibrio en la planta para que esta, tenga un buen contenido de celulosa y almidón que fortalezcan la pared y adicionalmente porque es necesario para la síntesis de proteínas; la deficiencia de potasio causa un rompimiento de la pared (Spann & Schaman,2010) aumentando el contenidos de azucares en apoplasto y también disminuye la síntesis de la glutatona, la cual le permite a la planta desintoxicarse de especies reactivas de oxígeno(Marschner, 1995) y otro aspecto fundamental del K es que participa en la apertura y cierre de estomas, impidiendo que los patógenos aprovechen las estomas para penetrar a la planta.

Figura 32. Contenido de Calcio en tejidos de Palma *Elaeis guineensis* Jacq.



* Nivel de significancia P < 0,05

Los resultados obtenidos en los tejidos evidencian la acumulación del calcio en las hojas viejas, como la hoja 17. La cual es comúnmente tomada como guía para los planes de fertilización, haciendo incorrecta la evaluación del contenido de este nutriente en la planta. Por el contrario las zonas más jóvenes y zonas meristemática presentan niveles por debajo del nivel ideal, especialmente en las enfermas. La literatura menciona que la deficiencia de este elemento afecta primero a las partes en formación, meristemas apicales; sitios comunes de inicio de la enfermedad pudrición de cogollo (PC) (hojas nuevas, flecha), la cual podría facilitarse debido a la falta de calcio para formar la placa celular entre células

hijas(SALISBUYR & ROSS, 2000a), por esta razón mueren zonas meristemáticas y tejidos en formación.

La deficiencia más notoria en los tejidos nuevos se debe a que el Ca^{2+} no puede ser movilizado desde los tejidos viejos y redistribuido a través del floema, obligando a los tejidos en desarrollo a contar con un suministro adecuado de calcio, el cual depende de la transpiración de la planta, transpiración que puede verse afectada cuando fenómenos como la niña, que disminuye las horas de sol, hace aún más difícil la absorción de calcio (Laing, 2011). Adicionalmente el transporte de calcio parece estar relacionado con la tasa de crecimiento de las raíces (Scaife y Clarkson, 1978) y la función que este ejerce sobre ellas en cuanto a multiplicación, crecimiento celular y neutralización, es claro que el suministro no es adecuado (no hay en la fertilización aplicada, correctivos Calcio), además hay presencia de aluminio en los suelos y especialmente en las palmas enfermas que presentan altos contenidos de aluminio y adicionalmente son suelos arcillosos que no permiten tampoco un buen desarrollo de raíz.

Laing, 2011 menciona que la ruta casi única para la absorción inicial de Ca^{2+} implica que las raíces de la planta deben continuar su crecimiento en forma densa, vigorosa y saludable (caso que no ocurre en suelos con alto contenido de aluminio) para asegurar la capacidad de absorción continua, especialmente de Ca, en respuesta a la demanda ocasionada por el rápido crecimiento de la palma. Este según Laing se ve afectado por fertilizaciones intensivas con altos niveles de N, P, K y Mg (ver tabla fertilización) los cuales aumentan la acidez del suelo agravando el problema (Laing, 2011).

La deficiencia de calcio en los tejidos enfermos, aumenta la tasa de respiración, por el aumento del Calcio en el citoplasma; provocando despolarización del potencial transmembrana, no produce fotoasimilados, interrumpe procesos asociados al crecimiento probablemente porque detiene la mitosis ya que se

requiere calcio para formar la placa celular entre células hijas; origina peroxidación de lípidos en la membrana, creando compuesto semi construidos, lo cual permite que los patógenos encuentren condiciones favorables para su desarrollo cuando la planta presenta desequilibrio en sus procesos fundamentales como la proteólisis y la proteosíntesis (teoría Trofobiosis),

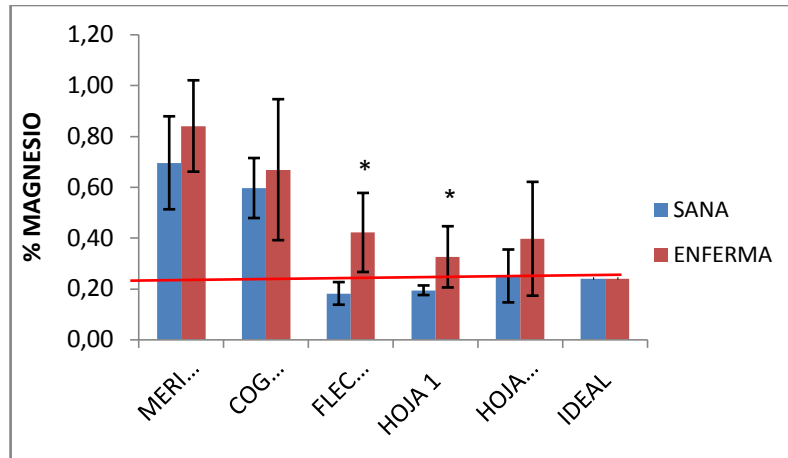
Otro aspecto importante en cuanto a un menor contenido de calcio en los tejidos enfermos y en formación, es la función que ejerce el calcio en el fortalecimiento de la pared celular, especialmente en la estructura protopectina, la cual adquiere estabilidad con la presencia de calcio; se ha encontrado como en otros cultivos como el cítricos y aguacate atacados por *Phytophthora* con sales de CaCl_2 , controlan el ataque del patógeno (CAMPANELLA et al., 2002), al inhibir la acción de las pectinesterasas (CHAPMAN, 1965; ZENMEYER, 1995) usados por estos para entrar a la planta. En los resultados se evidencia la existencia de mayor contenido de calcio en los tejidos sanos, exceptuando la flecha; estos tejidos al tener un mayor contenido de calcio, podrían permitir a la planta detener el avance de la enfermedad y dar a la planta un tiempo activar sus respuestas.

En los tejidos meristemáticos, se observa mayor contenido de calcio en la palma sana vs palma enferma, esto puede permitir el ataque de patógenos por el debilitamiento de las paredes celulares, adicionalmente las zonas meristemáticas suelen morir en etapas tempranas, generando tejidos retorcidos y deformados por la deficiencia de calcio (SALYSBURI & ROSS, 2000).

Según todos los aspectos mencionados anteriormente, asociados a la deficiencia del calcio, se hace necesaria la aplicación de correctivos al suelo, para disminuir la acidez y mejorar el suministro adecuado de este para que la planta pueda desarrollar todos los procesos asociados a este elemento, procesos tan importantes como desarrollo adecuado de raíces, fortificación de paredes

celulares, inhibición de pectinesterasas y actuar como mensajero secundario para activar metabolismos de defensa.

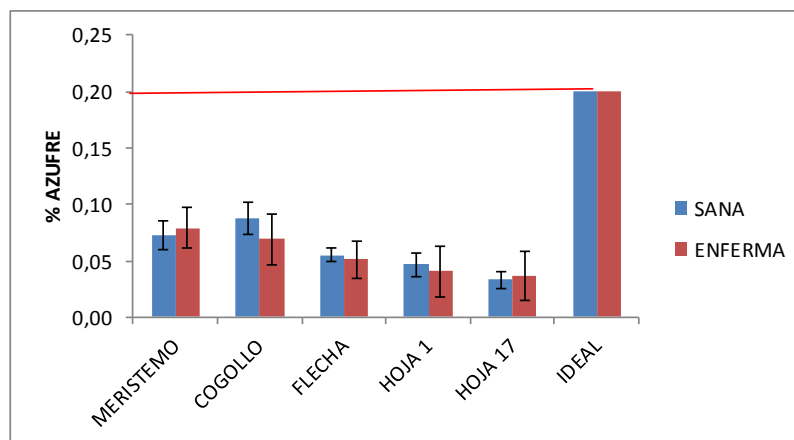
Figura 33. Contenido de Magnesio en tejidos de palma *Eleais guineensis* Jacq.



* Nivel de significancia P <0,05

El magnesio presenta variabilidad en los datos obtenidos, aparentemente se encuentra en mayor cantidad en las palmas enfermas respecto a las sanas, observaciones en campo permiten identificar deficiencias al encontrar en la zona marchitamiento de las hojas bajas en algunos lotes, razón que podría explicar la variación en los datos. Los datos encontrados no permiten determinar a ciencia cierta su presencia o ausencia según presencia o ausencia de enfermedad. Es un elemento que también debe ser controlado ya que regula la absorción de otros elementos como el P, K y Ca. En deficiencia de Mg se acumulan los carbohidratos y el transporte de Pi se disminuye, afectando la producción de ATP.

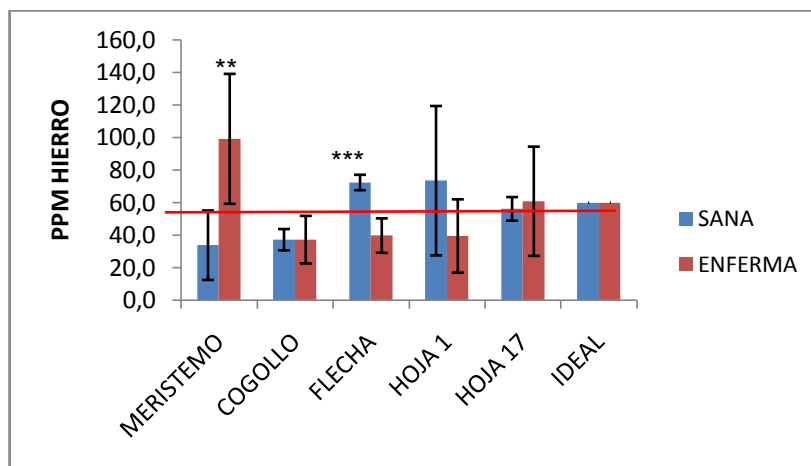
Figura 34. Contenido de azufre en tejidos de Palma *Eleais guineensis* Jacq.



El azufre en general es bajo en todos los tejidos, se ven pequeñas diferencias en el contenido de este entre palmas sanas vs las enfermas, siendo un poco mayor en la palma sana. Como se mencionó anteriormente es un elemento clave en la conformación estructural de aminoácidos como la cisteína, y en cuanto a la respuesta de la planta frente condiciones de estrés por patógenos u otras condiciones, muchos metabolitos implican metabolitos que derivan de la cisteína. Las plantas productoras de cisteína son menos susceptibles a la infección por organismos patogénicos como bacterias y hongos. La cisteína hace parte de la glutatióna es la base de las fitoquelatinas (MARSCHNER, 1995), en general tienen la estructura de (Glut-Cys) n -Gly. La Glutatióna, permite que la planta disminuya las especies reactivas de oxígeno que se generan como respuesta ante el ataque de patógenos (SALISBURY & ROSS, 2000).

Los cloroplastos de la planta también requieren de la cisteína para la adecuada función de los mismos. Cuando las condiciones lumínicas son variables (lo cual sucede en los fenómenos como el de la niña), una reducción en los procesos fotosintéticos afecta la función de los cloroplastos y puede afectar especialmente a las hojas jóvenes (MAATHUIS, 2009).

Figura 35. Contenido de hierro en tejidos de Palma *Eleais guineensis* Jacq.



* Nivel de significancia P <0,05 ** P < 0,001 *** P < 0,0015

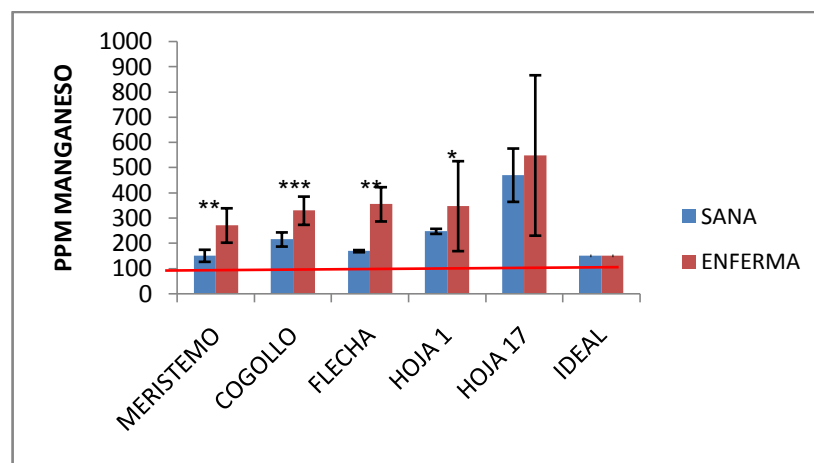
El hierro aparentemente se encuentra deficiente en la mayoría de tejidos, a diferencia del meristemo enfermo, pero solo muestra diferencias estadísticamente significativas en meristemo y flecha de los tejidos vegetales no permite sacar una conclusión acertada, se puede aclarar que en los suelos que se encuentran las palmas por ser suelos ácidos, el contenido de hierro va de adecuado a alto y la movilidad de este también. Cabe mencionar que el hierro es un elemento muy importante en la respiración mitocondrial y en la biosíntesis de hormonas importantes para la producción del etileno, ácido jasmónico y estos están relacionados con el metabolismo secundario, el cual hace parte de la defensa de las plantas (HÄNSCH AND MENDEL, 2009). La deficiencia de este elemento también puede causar clorosis porque es un elemento muy importante en la síntesis de la clorofila.

El exceso de hierro puede contribuir a aumentar la producción de radicales libre por reacciones de oxidación por la reacción de Fenton.



Estos radicales son bastante responsables de la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados de lípidos de membrana (MARSCHNER, 1995), causando necrosis en los tejidos. Adicionalmente el hierro hace parte de las proteínas hemo como la catalasa una proteína hemo que ayuda al control de las especies reactivas de oxígeno, que disminuye cuando la concentración de hierro disminuye en las peroxidasas de pared que catalizan las reacciones de polimerización que forman la ligninas que fortifican las paredes de la planta (KYRKBY & RÖMHELD, 2007)

Figura 36. Contenido de manganeso en tejidos de Palma *Eleais guineensis* Jacq.

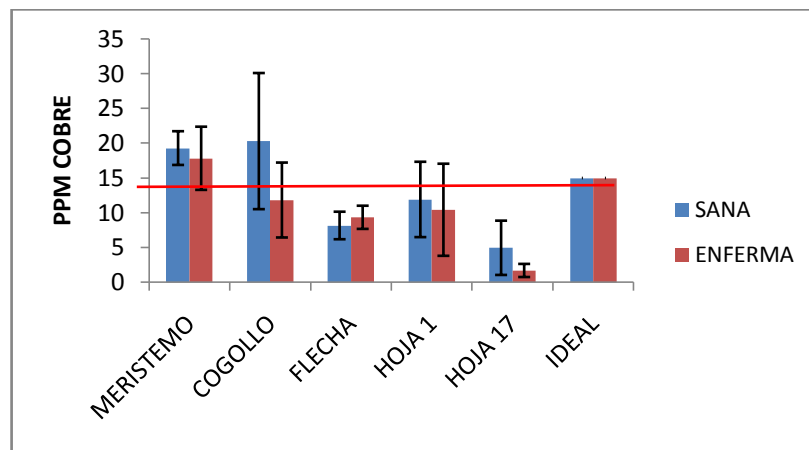


* Nivel de significancia P < 0,05 ** P < 0,001 *** P < 0,0015

En suelos ácidos, como los suelos de estudio, es común la toxicidad del manganeso, especialmente es notoria presencia de este en las palmas enfermas, especialmente en los tejidos meristemáticos, cogollo y la flecha, es un elemento fundamental en el transporte de electrones en la fotosíntesis y en la desintoxicación de la planta por radicales libres en estrés. El Mn es un cofactor la de SOD (supeóxido dismutasa), enzima que participa en la desintoxicación de radical superóxido (O_2^-), reduciéndolo a peróxido de hidrogeno, (H_2O_2); es posible que el aumento en la concentración de manganeso en los tejidos, este relacionado con el estrés que esta sufriendo la planta por el ataque del patógeno y aumente la toma de este cofactor para bajar los contenidos de O_2^- (Sarkar et al., 2004).

El exceso de Mn también puede producir manchas marrones en las hojas maduras por acumulación de polifenoles y por la acumulación de calosa y, adicionalmente causar la pérdida de la dominancia apical. Otro aspecto interesante del exceso de este micronutriente es que genera deficiencia de calcio al afectar su transporte estimulando la actividad de la AIA-oxidasa y la polifenol oxidasa lo que lleva a la degradación del ácido Indol Acético (AIA), encargado del transporte de calcio. Este aspecto se podría correlacionar con la deficiencia en las hojas de Ca aunque aparentemente en los suelos se encuentra presente. (Wissemeier and Horst, 1992).

Figura 37. Contenido de cobre en tejidos de Palma *Eleais guineensis* Jacq.



La presencia de cobre en los diferentes tejidos no muestra diferencias estadísticamente significativas en las palmas sanas vs las enfermas. Cabe resaltar que el contenido de cobre en los tejidos es menor que en el estado ideal en la mayoría de tejidos enfermos y especialmente en la hoja 1, la flecha y la hoja 17, ya que aunque es un elemento móvil, su contenido en suelos no se encuentra aún en el ideal.

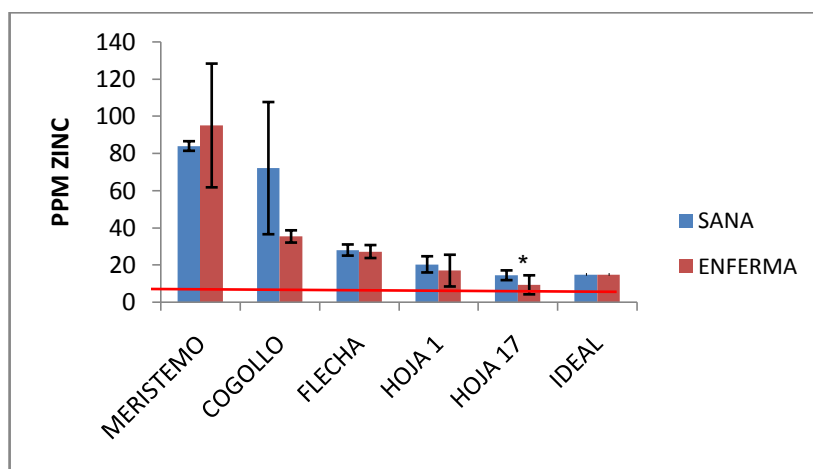
Este elemento al igual que el Mn es cofactor de la SOD, por lo cual permite a la planta protección frente al estrés oxidativo (participando en la desintoxicación de radicales superóxido), este estrés es generado cuando la planta activa sus mecanismos de defensa, produciendo especies reactivas de oxígeno para confinar

al patógeno y evitar su avance (HÄNSCH & MENDEL, 2009). Adicionalmente es requerido para la síntesis de la pared celular, tiene un papel importante en el metabolismo secundario (metabolismo de defensa) especialmente en la biosíntesis de fenol vía quinona para producir sustancias melanólicas y lignina. La deficiencia de cobre provoca la acumulación de fenoles y reduce la lignificación de las paredes, la lignina aumenta la defensa estructural de las plantas frente al ataque de patógenos y las sustancias melanólicas, como las fitoalexinas que inhiben la germinación de esporas y el crecimiento de hongos. (Kyrbky and Römheld, 2008).

La deficiencia de Cu disminuye la tasa de fijación de CO₂, ya que la plastocianina una proteína de cobre, es la encargada de transferir electrones desde el complejo de citocromo b6f al fotosistema I (Palmer & Guerinot, 2009).

Las deficiencias de cobre causan síntomas visuales como la clorosis, necrosis, distrofia foliar y muerte ascendente, lo cual es muy interesante al correlacionar estos síntomas con los causados por la enfermedad pudrición de cogollo (PC) porque son idénticos. La caída de las hojas también se asocia a la baja ligninación (KYRBKY & RÖMHELD, 2008).

Figura 38. Contenido de zinc en tejidos de Palma *Eleais guineensis* Jacq.

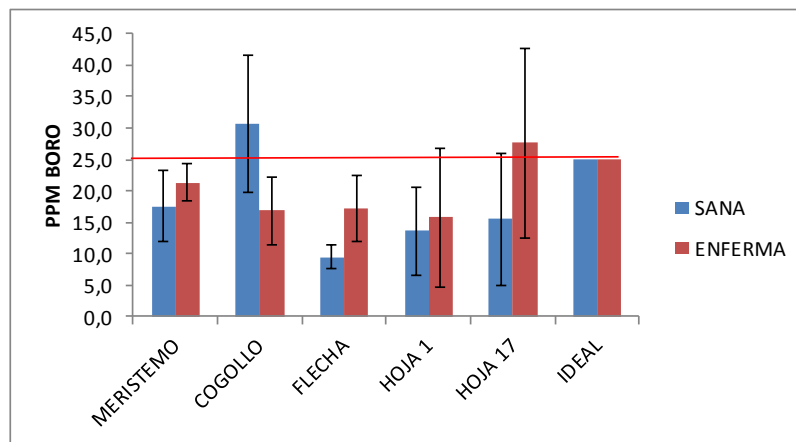


La presencia de zinc en los diferentes tejidos es mayor en las palmas sanas vs las enfermas; aunque en el cogollo de la palma enferma existen variaciones que podrían estar relacionadas con la aplicación de funguicidas y plaguicidas en las palmas enfermas luego de las cirugías, ya que algunos de estos compuestos usualmente llevan cobre y zinc en su composición, como ya se mencionó. En la figura 38 se observa como contenido de zinc en los tejidos se acerca al nivel ideal.

El Zn también es cofactor de la SOD, es importante en la remoción de radicales libres y protege a las membranas de exceso de radicales superoxidados. Cuando es deficiente, se rompen los dobles enlaces de los ácidos grasos y se genera lipoperoxidación y necrosis. Entre sus funciones también está la de mantener el control de la permeabilidad y proteger a la planta frente a los agentes patógenos (CAKMAK,2000).

La deficiencia de este elemento causa retraso en el crecimiento ya que su presencia en concentraciones ideales es necesaria para la producción del ácido indol acético.

Figura 39. Contenido de boro en tejidos de Palma *Eleais guineensis* Jacq.



Los resultados obtenidos para el boro no presentan diferencias estadísticamente significativas, no permiten formular conclusiones claras de la relación existente entre su contenido y la enfermedad, o si es mayor o menor en las sanas vs las enfermas. La razón podría deberse a dos aspectos, 1) la dificultad que presenta este elemento en su determinación; 2) que en la mayoría de los casos su fertilización se hace en la axila de la palma, razón por la cual en el caso de las enfermas que ya tiene muchas cirugías, la muestra se tomó posiblemente en zonas cercanas a los sitios de fertilización.

Se hace clara la deficiencia de este elemento en la hoja 1 y la flecha en palma enferma, situación observada en campo, en la cual la hoja 1 que se estaba emitiendo nuevamente, presentaba deformaciones típicas de la deficiencia de boro. Esta deficiencia al igual que la del calcio afecta directamente el fortalecimiento de las paredes celulares, los puntos meristemáticos enferman y mueren, las hojas se tornan deformes y quebradizas.

Es de resaltar la importancia de los micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn y B) en los procesos de defensa de la palma frente a plagas y enfermedades, procesos desarrollados por las enzimas antioxidantes como SOD en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno. Estos micronutrientes también permiten la síntesis de compuestos del metabolismo secundario o de defensa, y sus síntomas de deficiencia se pueden correlacionar con los síntomas tempranos de la enfermedad. También es clave resaltar que la aplicación de estos productos es muy deficiente o en algunas fincas nula, al no ser considerados como necesarios para la producción de la palma.

Los resultados obtenidos corroboran el papel fundamental de la nutrición mineral en el desarrollo de la planta ya que queda claro como cada nutriente tiene un rol fundamental en las respuestas de la planta ante la enfermedad. Cuando el patógeno interactúa con la planta y logra infectarla la planta altera su fisiología,

principalmente respecto a la absorción mineral, asimilación, transformación y utilización de nutrientes, pero adicionalmente es importante tener presente que plantas con adecuada nutrición, tienen gran resistencia a las plagas y enfermedades. La susceptibilidad se incrementa cuando la concentración de los nutrientes se desvía del estado óptimo (Spann y Schumann, 2010).

7.2 ANÁLISIS DE TEJIDOS VEGETALES DE PALMA *Elaeisguineensis* Jacq. UTILIZANDO MICROSCOPIA SEM

Los análisis obtenidos fueron realizados en el laboratorio de Microscopia de la Universidad Industrial de Santander.

Figura 40. Tejido de hoja sin necrosis aparente y con necrosis en palma enferma

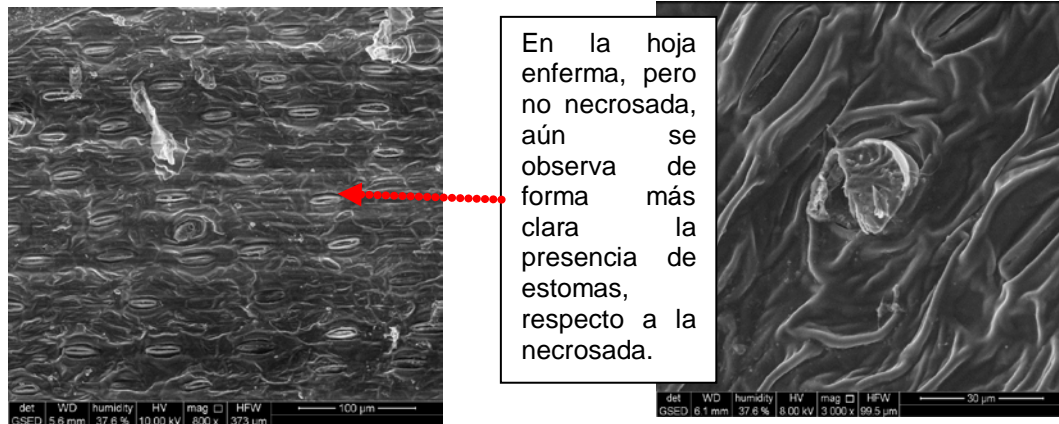


Figura41. Tejido de hoja con necrosis en palma enferma

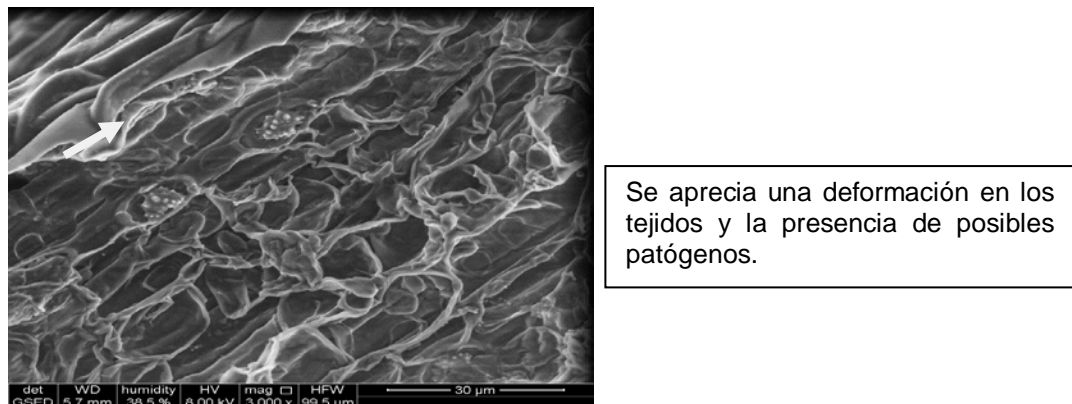
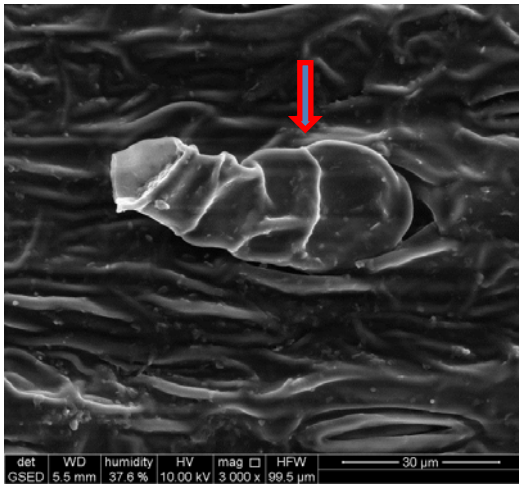


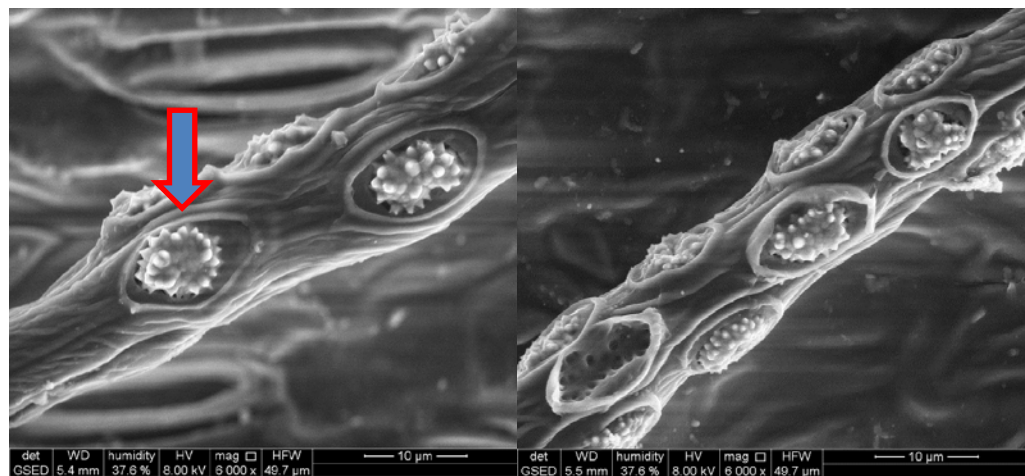
Figura 42. Tejido de hoja con necrosis en palma enferma con aparente entrada de patógeno



Esta micrografía de hoja con necrosis de palma enferma, muestra la entrada de un patógeno, aprovechando la estoma de la hoja abierta. Algo que podría evitar las barreras que interpone la planta para su entrada.

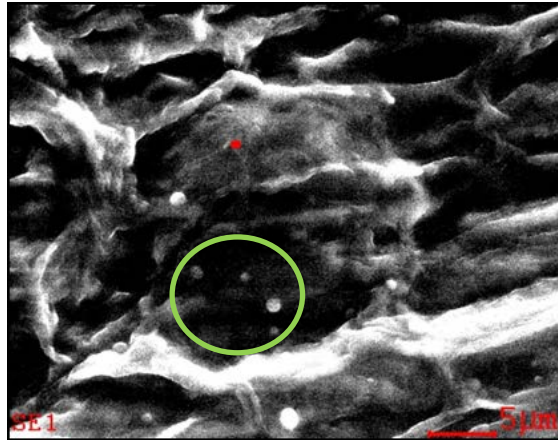
Debido a que no se tiene una vista completa de la cola, no se puede identificar el patógeno.

Figura 43. Tejido de hoja sin necrosis en palma enferma



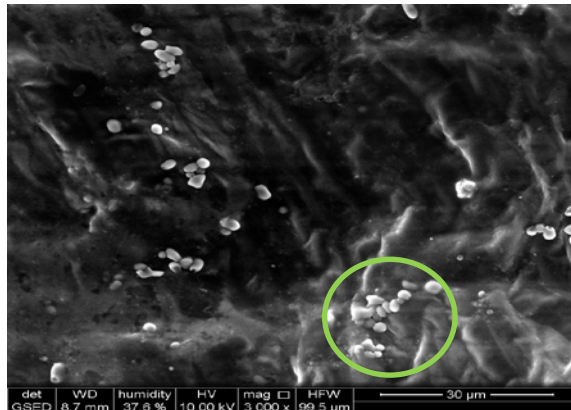
En esta micrografía se evidencia la presencia de patógenos degradando el tejido.

Figura 44.Meristemos sano con presencia aparente de Patógeno.



Micrografía de meristemo de palma sana. Al parecer se encuentra patógeno al interior del tejido. Se cree que esto indicaría que solo la deficiencia del nutriente hace que aún teniendo el patógeno, este pueda atacar a la planta y conviva con él.

Figura 45.Meristemo Palma enferma



Micrografía de meristemo de palma enferma. La forma ovoide al parecer nos permite indicar la presencia de patógenos al interior del tejido.

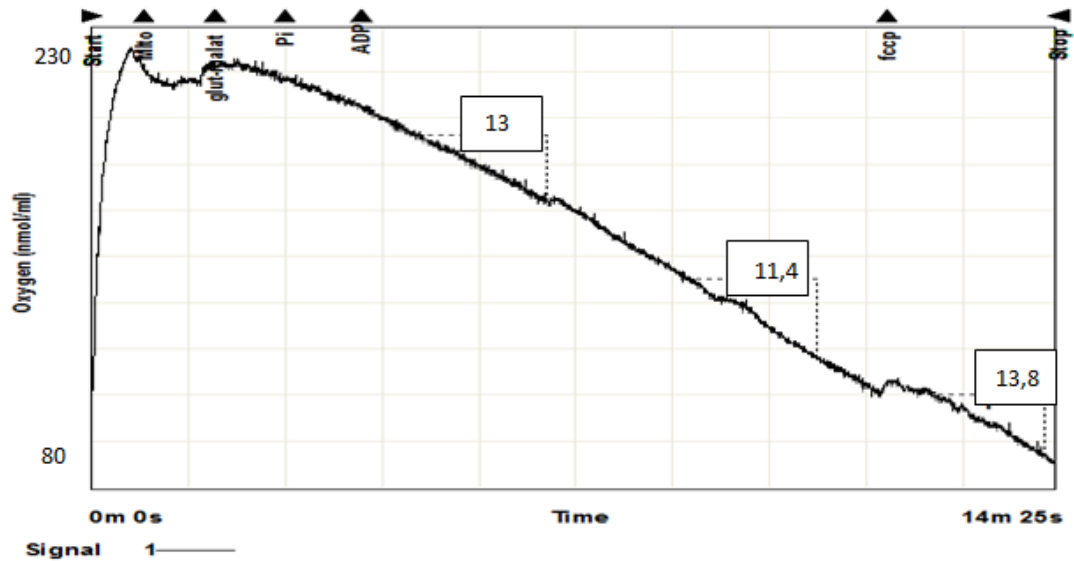
La presencia del patógeno en la palma sana ayudaría a entender porque desde los primeros estudios realizados por Duff en 1994 hasta hoy, no se ha podido demostrar que la enfermedad es causada por un patógeno específico, ya que después de inoculaciones en palmas sanas no se ha reproducido la enfermedad; adicionalmente no se han cumplido los postulados de Koch. Por lo cual aún se puede decir que la enfermedad se desarrolla con la presencia de los dos factores mencionados en la hipótesis de esta tesis, la presencia del patógeno y el déficit de nutrientes para la defensa, sea esta fortaleciendo de la pared celular (Ca y B) o

produciendo y eliminando de manera balanceada las especies reactivas de oxígeno o metabolismo secundario (S,Cu, Zn, Fe).

Referente al patógeno, la presencia de este o estos, esta siendo evaluada en el grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander. También se planea realizar otros análisis de imágenes, mejorando las mismas mediante secado previo de tejidos, lo cual por ahora no fue posible por la falta de un aditamento del microscopio electrónico.

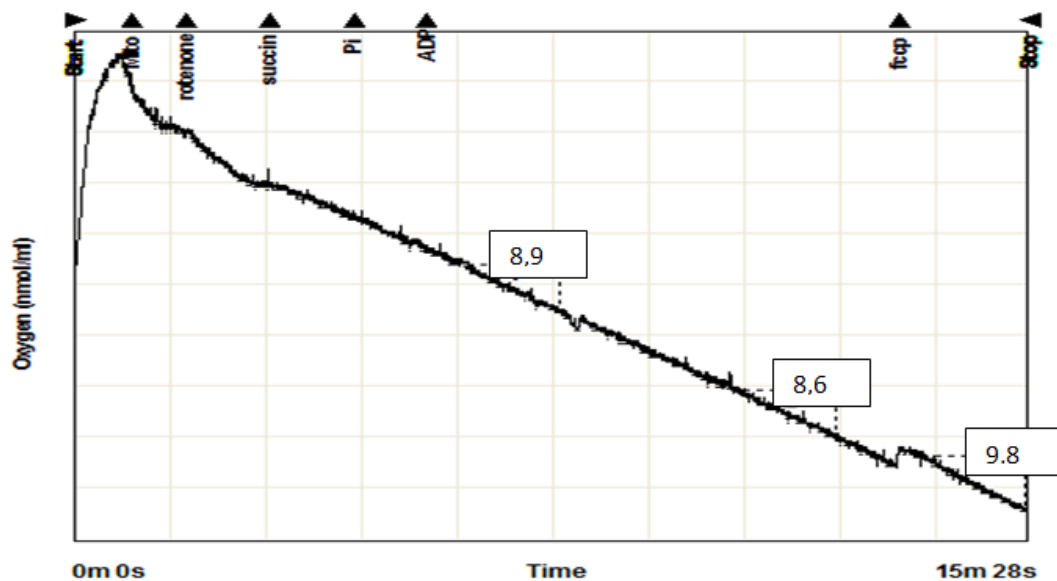
7.3 BIOENERGÉTICA EN PLANTAS

FIGURA 46. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma sana, energizadas con malato y glutamato.



Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con glutamato de sodio 3 mmol.L⁻¹, malato 2mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹ y ADP 0.6 mmol.L⁻¹. Resultado representativo de 2 palmas sanas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

FIGURA 47. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma sana, energizada con succinato.



Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹ y ADP 0.6 mmol.L⁻¹. Resultado representativo de 2 palmas sanas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

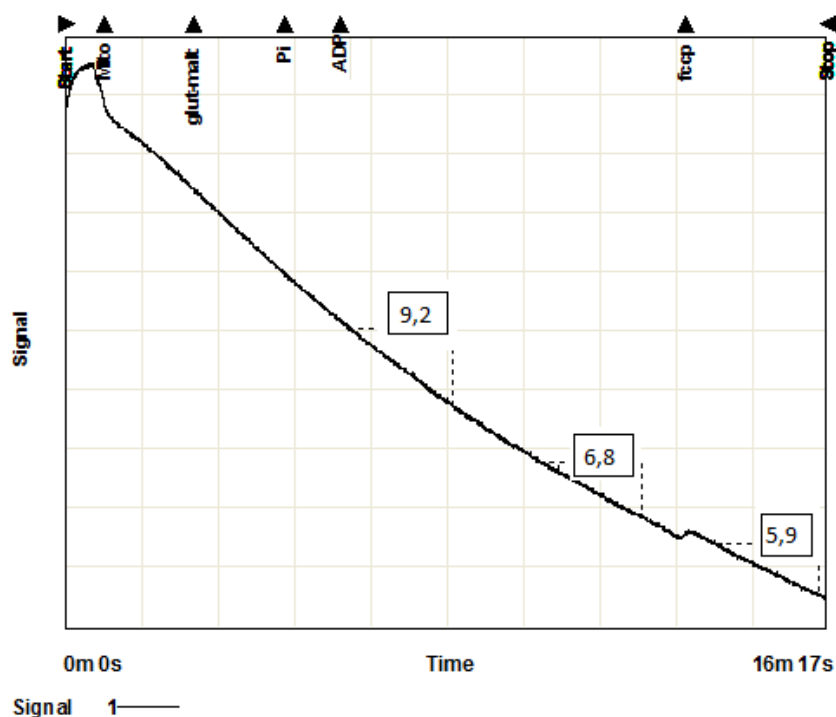
Se realizaron ensayos de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de los cogollos de cada una de las palmas colectadas, obteniendo mitocondrias no acopladas tanto para las palmas sanas (Figuras 46 y 47) como para las palmas en estado inicial de enfermedad (Figuras 48 y 49), como lo observado a partir de los valores de los controles respiratorios. Esto podría deberse a que las mitocondrias son aisladas un día después de la colecta, de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se espera que para procedimientos posteriores se pueda trabajar con células cultivadas y así obtener mitocondrias de forma más rápida y posiblemente con mejores controles respiratorios.

Aún con mitocondrias desacopladas, los resultados de la respiración mitocondrial, arrojaron algunos datos interesantes, por ejemplo, la velocidad de respiración de

las mitocondrias en presencia de FCCP, un protonoforo desacoplador de la fosforilación oxidativa, en palmas sanas es similar a la velocidad del estado 3 lo cual concuerda con lo descrito en la literatura, donde la velocidad de respiración en presencia de un desacoplador es tan alta como la velocidad de respiración en presencia de ADP. Sin embargo en las palmas enfermas se observó que la velocidad de respiración en presencia de FCCP fue igual al 60% de aquella presentada en el estado 3, lo que podría llevar a pensar que en vez de introducir protones a la matriz mitocondrial podría estar contribuyendo a expulsar protones hacia el espacio intermembrana.

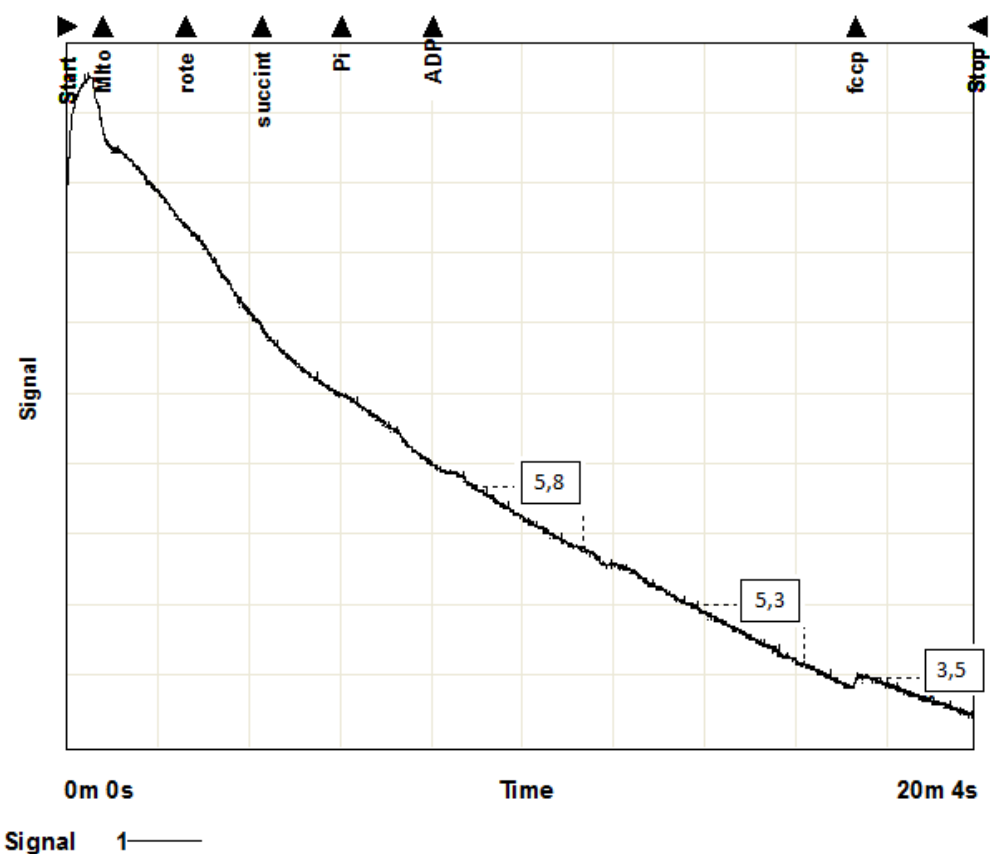
Es importante recalcar que las mitocondrias de células vegetales además de las proteínas de la fosforilación oxidativa presentan otras proteínas que pueden contribuir al consumo de oxígeno, como los son la oxidasa alternativa, quien se encarga de reducir oxígeno a agua, y proteínas desacopladoras que contribuyen al consumo del potencial de membrana y liberan energía en forma de calor (Affourtit, Krab y Moore, 2001), la presencia de estas proteínas desacopladoras podría explicar el efecto presentado por la adición de FCCP en las Figuras 46,47,48, y 49.

FIGURA 48. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma enferma, energizada con malato y glutamato.



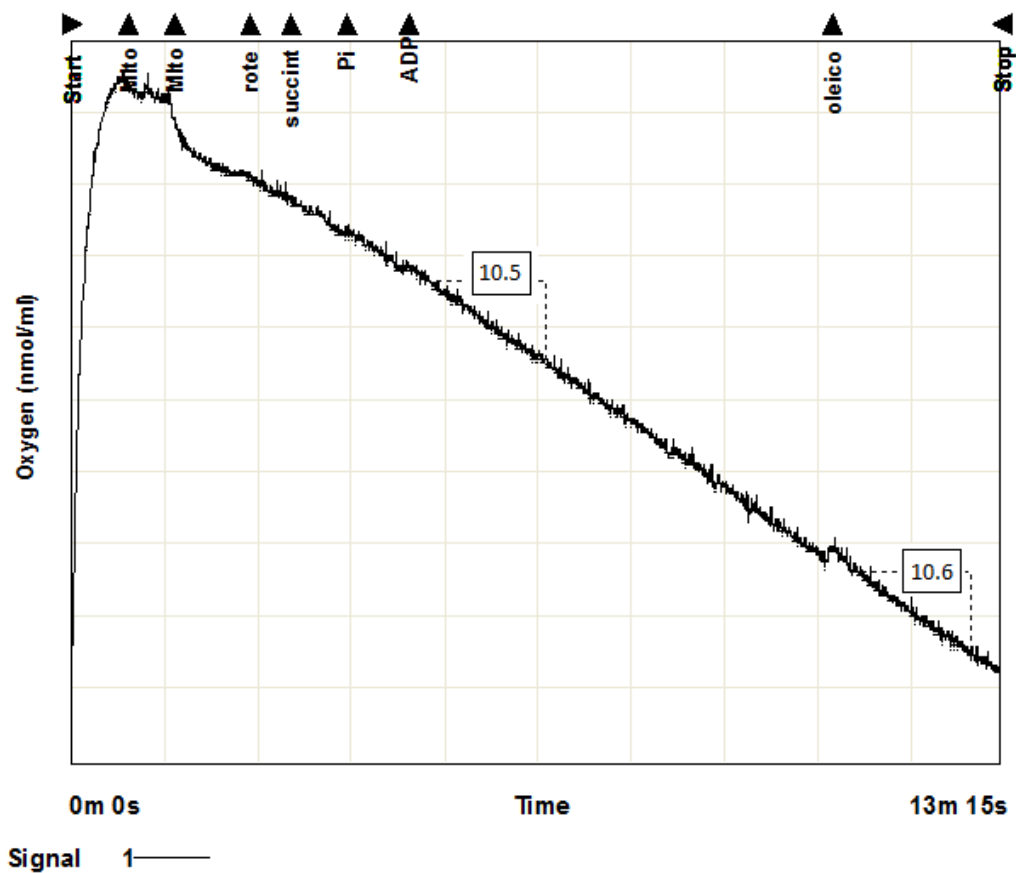
Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con glutamato de sodio 3 mmol.L⁻¹, malato 2mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹ y ADP 0.6 mmol.L⁻¹. Resultado representativo de 4 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

FIGURA 49. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma enferma, energizada con succinato.



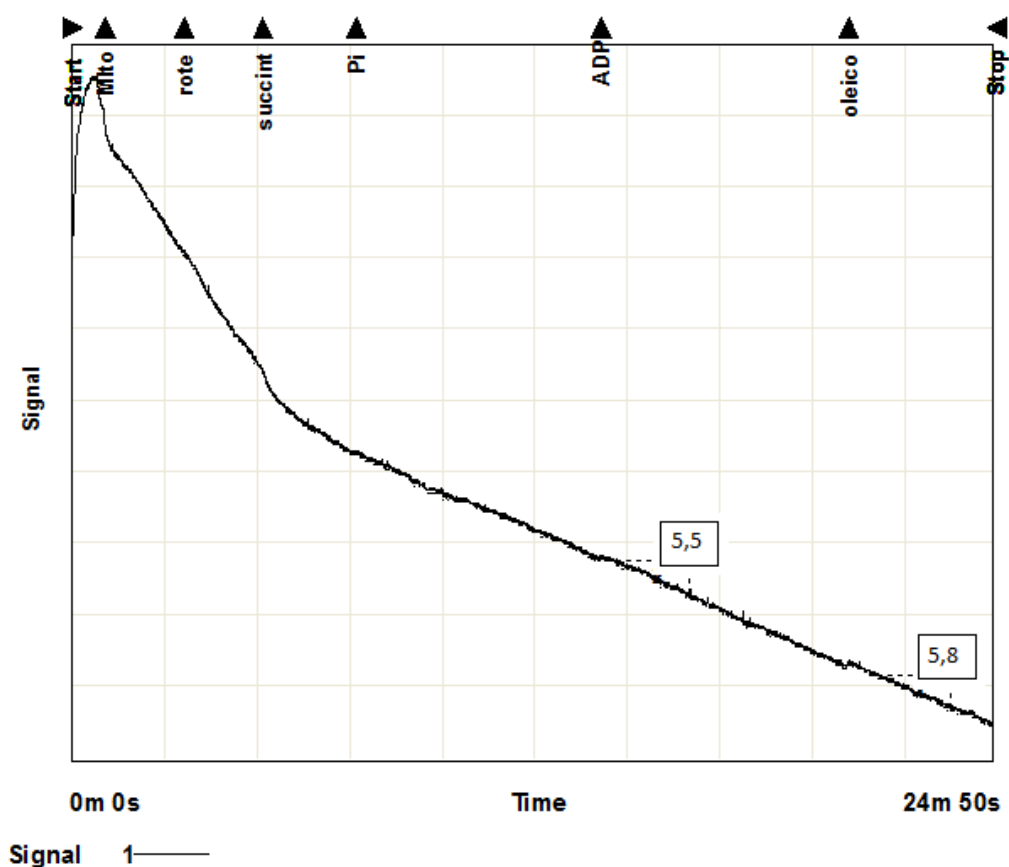
Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹ y ADP 0.6 mmol.L⁻¹. Resultado representativo de 4 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

FIGURA 50. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma sana y posterior adición de ácido oléico.



Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹, ADP 0.6 mmol.L⁻¹ y ácido oleico 10mM. Resultado representativo de 2 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

FIGURA 51. Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma enferma y posterior adición de ácido oléico.



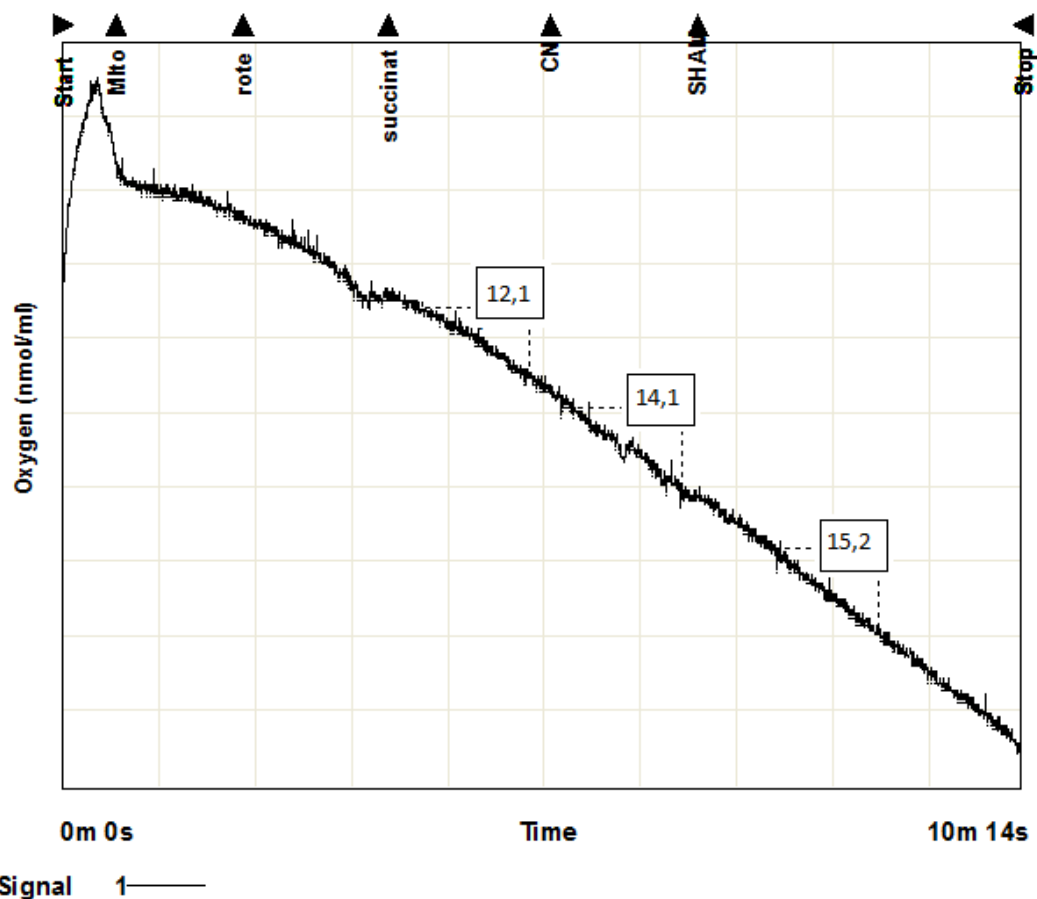
Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹, ADP 0.6 mmol.L⁻¹ y ácido oleico 10mM. Resultado representativo de cuatro palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

Al adicionar ácido oleico, un activador de proteínas desacopladoras, observamos que la velocidad de consumo de oxígeno es levemente mayor a la del estado 3, tanto en palmas sanas como enfermas (Figuras 50 y 51), lo que sumado a los resultados en presencia de FCCP, podría indicar que en las mitocondrias de palmas de aceite se encuentran proteínas desacopladoras altamente activas. Haciendo una analogía con las mitocondrias en células animales, específicamente mitocondrias presentes en tejido adiposo marrón con las presentes en cogollo de palma de aceite, se podría decir que las mitocondrias de cogollo, responden de

forma similar a las de tejido adiposo marrón, aumenta las proteínas desacopladoras por la presencia lipídica y liberan energía en forma de calor, esta teoría deberá ser confirmada en experimentos posteriores.

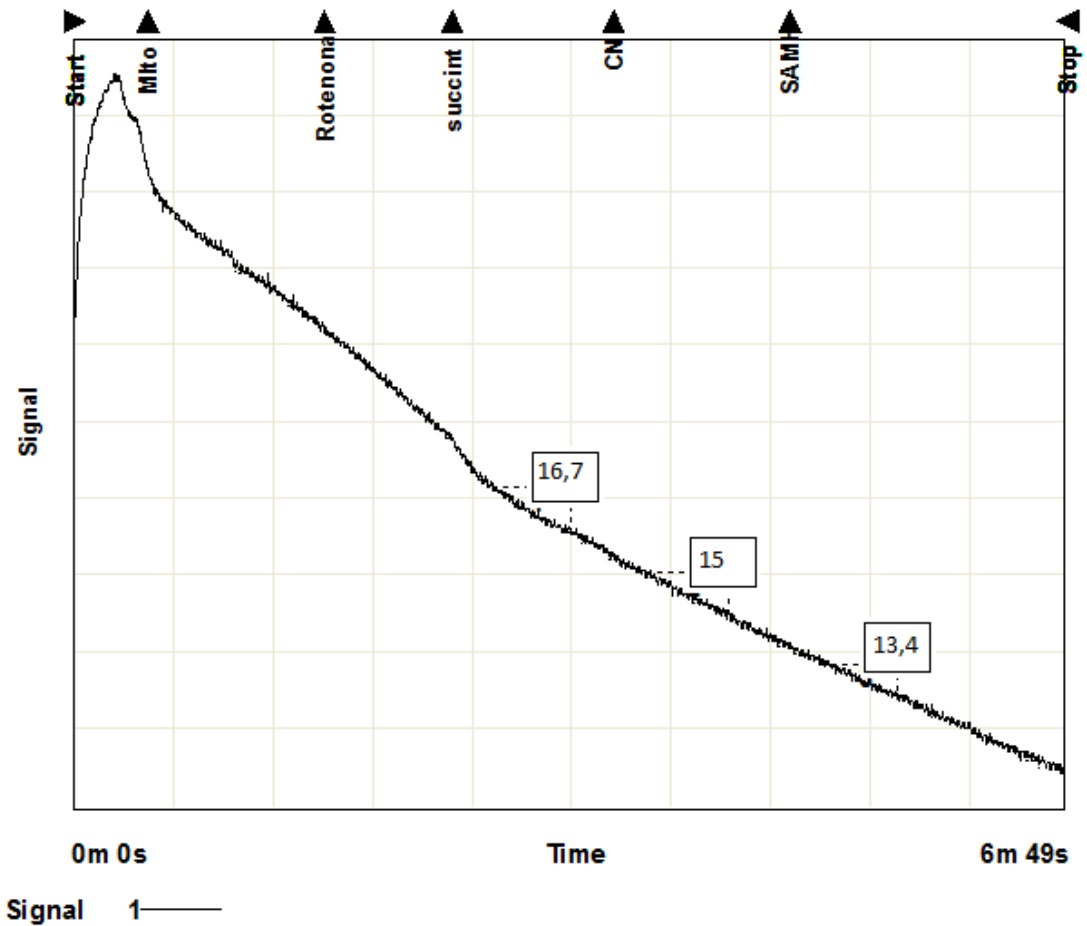
Para estudiar la respiración celular debida a la oxidasa alternativa se llevaron a cabo experimentos en presencia de cianuro y ácido salicilhidroxámico (SHAM).

Figura 52. Mitocondrias de palma sana, en presencia de cianuro y SHAM.



Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹, ADP 0.6 mmol.L⁻¹, cianuro de potasio 1mM, SHAM 1mM. Resultado representativo de 2 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

Figura 53. Mitocondrias de palma enferma, en presencia de cianuro y SHAM.



Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, sacarosa 250 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L⁻¹, ADP 0.6 mmol.L⁻¹, cianuro de potasio 1mM, SHAM 1mM. Resultado representativo de 4 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

En las Figuras 52 y 53 se trataron mitocondrias energizadas, con cianuro, inhibidor del complejo IV de la fosforilación oxidativa, y SHAM, inhibidor de la oxidasa alternativa. En las mitocondrias de palmas sanas (Figura52) se observó que al adicionar cianuro la velocidad de respiración aumentó, debiéndose teóricamente la velocidad de respiración en presencia de cianuro a la actividad de la oxidasa

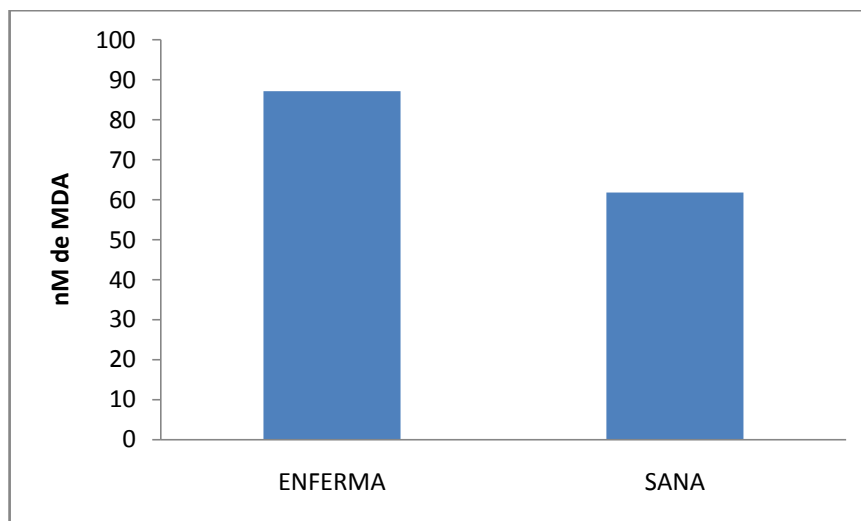
alternativa, sin embargo, al adicionar SHAM la velocidad de respiración nuevamente se incrementó, lo que nos lleva a pensar que posiblemente las mitocondrias de palma de aceite posean proteínas oxidasas resistentes a SHAM, lo que abre una nueva de posibilidad de estudio mitocondrial en células vegetales. Este mismo experimento se reprodujo en mitocondrias de palma enferma y se encontró que las velocidades disminuían contrario a lo encontrado en palmas sanas, sin embargo, este resultado por falta de conocimiento de la bioenergética de palmas de aceite, no nos permite llegar a conclusiones.

En otras plantas como tomate las mitocondrias responden alterando su bioenergética, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno para responder al ataque de patógenos, este mismo estudio en palmas de aceite arrojó mas interrogantes que respuestas, los controles respiratorios son similares en ambos tipos de palmas, ambas se presentan proteínas desacopladoras, pero se observa que las palmas sanas presentan mayor actividad de una posible oxidasa alternativa resistente a SHAM, para responder como estos resultados contribuyen a la caracterización de la enfermedad pudrición de cogollo, es obligatorio profundizar en el estudio de las proteínas presentes en las mitocondrias de esta planta, lo que se realizará en futuros proyectos en el grupo de investigación en bioquímica y microbiología de la UIS.

7.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y LIPOPEROXIDACIÓN

Para estudiar si la planta respondió al ataque del patógeno se estudió la lipoperoxidación y la actividad de enzimas antioxidantes, en los dos grupos de estudio, lo cual se presenta a continuación.

Figura 54 .Lipoperoxidación



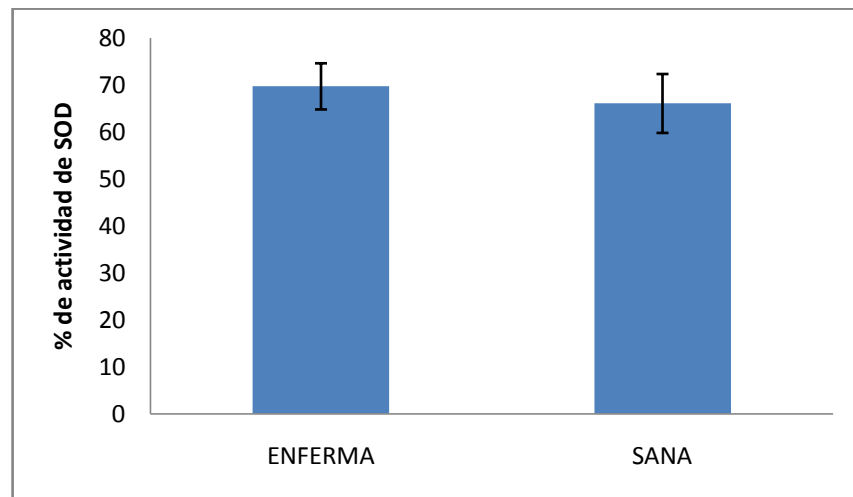
Sistema de reacción: D-manitol 250mmol.L-1 y HEPES 10 mmol.L-1, pH 7,2. Después de 45 minutos de incubación, se tomarán alicuotas, a las cuales se adicionará reactivo constituido de ácido tricloroacético (TCA) 15% (w/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% (w/v) en HCl 0,25 mol.L-1 y butil hidroxitolueno (BHT) 0,01%.

Al analizar la lipoperoxidación en los dos grupos de palmas de estudio se observó una mayor lipoperoxidación en las membranas de las palmas enfermas vs las sanas (Figura54), lo cual es congruente con un aumento del estrés oxidativo en las palmas enfermas. Esto puede ser causado por un aumento significativo de las ERO en respuesta al ataque del patógeno.

Ante el estrés oxidativo evidenciado por la lipoperoxidación, la palma no aumenta la actividad de sus enzimas antioxidantes. Esta información se evidencia en las figura 55 (SOD) y 56 (CAT) ya que no existe una diferencia significativa en la actividad de la SOD ni de CAT de palmas enfermas vs las sanas, lo cual podría

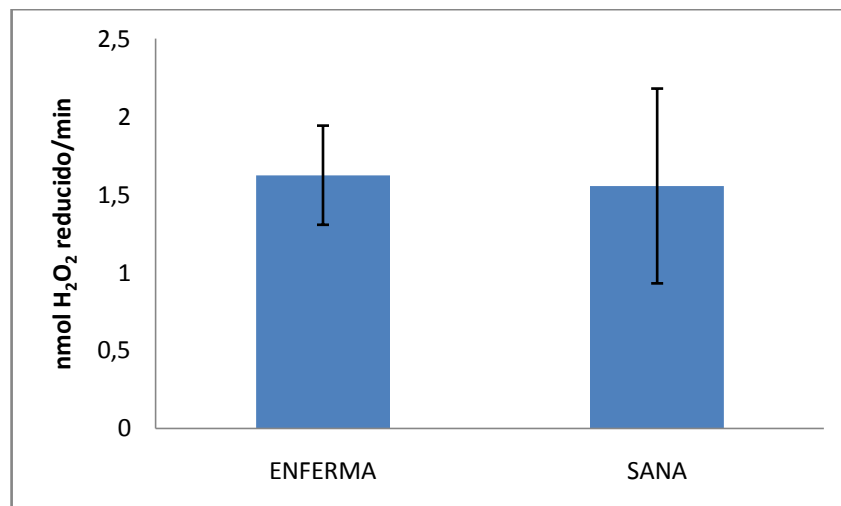
deberse a que este mecanismo no es usado por la planta para disminuir las ERO. Al estar en presencia de patógenos se requiere que la planta genere mayor concentración de ERO, para la activación de sus mecanismos de defensa.

Figura 55. Superoxido dismutasa (SOD)



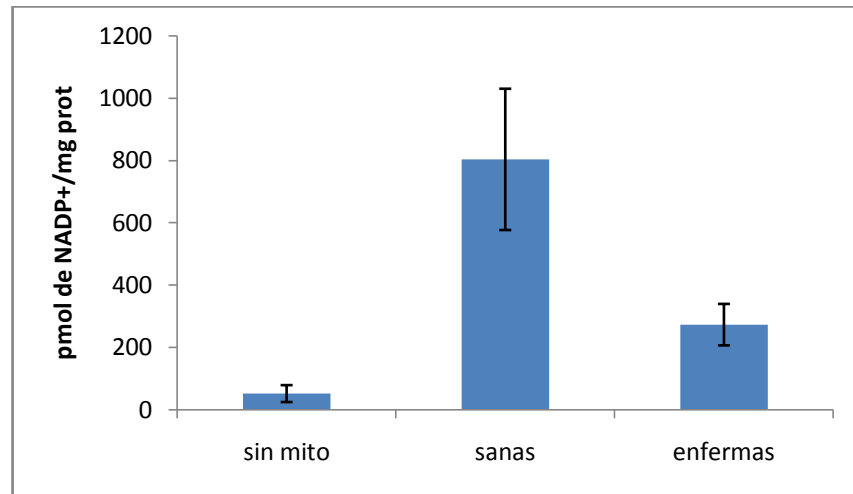
Sistema de reacción: Tris-HCl 10mM (pH 8,0), NADH 340 μ M, NTB 72 μ M, PMS 30 μ M y Mitocondria 250 μ g proteína/mL. Seguimiento 560nm

Figura 56. Catalasa (CAT)



Sistema de reacción: Tampón fosfato 50mM (pH 7,0), H₂O₂ 10mM y mitocondria 130 μ g de proteína/mL. Seguimiento disminución absorbancia a 240nm

Figura 57. Glutaciona Reductasa:



Sistema de reacción: tampón fosfato 100mM (pH 7,0), EDTA 1mM, GSSG 0,66mM, NADPH 0,075mM y mitocondria 50µg de proteína/mL. La reacción fue monitoreada

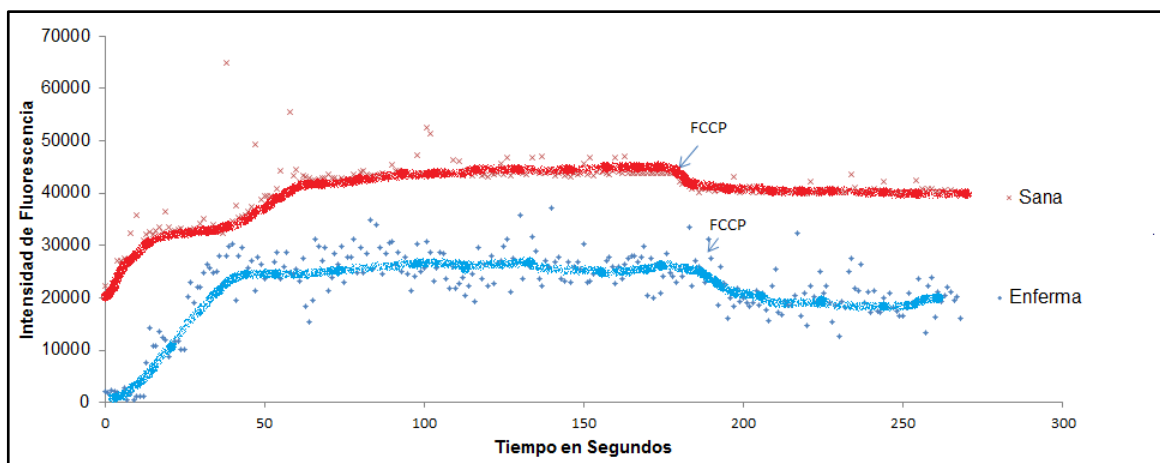
La figura57 muestra mayor actividad de la glutaciona reductasa, enzima que se encarga de mantener los niveles de glutaciona reducida en la célula. Adicionalmente se evaluó actividad de la glutaciona peroxidasa (datos no mostrados) que no presento actividad ni en palmas sanas ni enfermas. Lo que podría indicar que en palmas sanas la disminución de ERO se debe específicamente a vías no enzimáticas, como la eliminación directa del anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca(KOWALCZYK et al,2006).

En la palma sana hay mayor actividad oxidando NADPH que en las enfermas y es mas efectiva para producir glutaciona reductasa, lo que le permite mantener un mejor control de las ERO. Por el contrario en las enfermas hay menos activad para reducir GSSH ya que no requieren hacer un control de esta y necesitan la presencia de esta para generar mas ERO en respuesta al estrés por el patógeno.

7.5 TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS ENERGIZADAS DE PALMA

Para analizar si el calcio está relacionado con el estrés oxidativo de las palmas de aceite bajo el ataque del patógeno, se analizó como se comporta el transporte de calcio a través de mitocondrias tanto en palmas sanas como enfermas.

Figura 58. Transporte de calcio en las mitocondrias de palmas de aceite *Elaeis guineensis* Jacq.



Sistema de reacción: Mitocondria $9,5 \times 10^{-2}$ mg/mL, sacarosa 125mM, KCl 65mM, HEPES 10mM (pH 7,2). Fura 2AM 5 μ M. Suplementadas con: Rotenona 10mM, succinato 3mM, CaCl₂ 35mM y FCCP 10mM. $\lambda_{emisión}$ 340nm y $\lambda_{excitación}$ 510nm

Se determinó el flujo de calcio en las mitocondrias energizadas con succinato observando un aumento de la intensidad de fluorescencia por adición de calcio y disminución de la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la adición de FCCP, el cual actúa como desacoplador introduciendo H⁺ a la matriz mitocondrial, permitiendo estudiar el flujo de salida del calcio de la organela.

La palma enferma captó menos calcio y liberó más calcio en presencia de FCCP (Tabla 5), lo que quiere decir que está regulando en un menor grado la concentración de calcio en el citoplasma, probablemente generando un aumento de la concentración de Ca en el citoplasma; dicho aumento de calcio citoplasmático podría desencadenar una serie de reacciones que podrían finalizar

en la muerte celular, por activación de proteínas dependientes de GTP y aumentando la producción de ERO.

Tabla 5. Liberación en calcio en presencia de FCCP

Estado de la palma	Intensidad fluorescencia entrada Ca	Intensidad de fluorescencia Salida Ca	Δ Intensidad de salida de Ca
Sana	43753,1	40053,4	3699,7
Enferma	27488	18989,9	8498,2

8. CONCLUSIONES

- Al determinar el pH, la textura, materia orgánica, composición de calcio, azufre y micronutrientes en el suelo se encontró que existe un desbalance entre los nutrientes relacionados con el metabolismo de defensa de las plantas evaluadas.
- Aunque existen niveles adecuados de algunos elementos como el calcio y el fósforo en suelos, su correlación con sus valores encontrados en los tejidos vegetales hacen evidente la necesidad de realizar enmiendas más efectivas respecto al factor acidez/aluminio.
- En la evaluación de los tejidos vegetales de cogollo y de meristemo y la hoja 17, se evidenció que el contenido de calcio en esta hoja, la cual se toma como referencia para realizar controles nutricionales, no es el más pertinente ya que este elemento tiende a acumularse en estos tejidos.
- Los tejidos jóvenes, como meristemos apicales, la flecha y la hoja 1 necesitan un resuministro constante de calcio ya que como se observó en los análisis y aunque es necesario para el desarrollo de estas zonas en crecimiento, no se detectó un nivel adecuado del mismo.
- Aunque el azufre es un elemento clave en la conformación estructural de aminoácidos como la cisteína, ya que muchos metabolitos de defensa derivan de ella, en los resultados se evidenció una marcada deficiencia del mismo, haciendo a las palmas más susceptibles a la infección por organismos patogénicos como bacterias y hongos.

- En cuanto al mecanismo de defensa de estrés oxidativo se corroboró que tanto palmas sanas como enfermas activan sistemas para la generación de enzimas antioxidantes (buscando evitar que las cantidades de ERO usadas para confinar al patógeno terminen causando un daño mayor por lipoperoxidación).
- Se presentó una mayor lipoperoxidación en las membranas de las palmas enfermas Vs las sanas, lo cual tiene relación con un aumento del estrés oxidativo en las palmas enfermas.
- Se demostró que las palmas sanas presentan una mayor actividad de la enzima glutatona reductasa y que no existe diferencia significativa en la actividad de la SOD, CAT y Glutatona peroxidasa entre palmas sanas y enfermas.
- En relación a la bioenergética mitocondrial, se demostró que las palmas de aceite poseen oxidasas alternativas resistentes a SHAM.
- Se demostró que las palmas sanas regulan más eficientemente el transporte de calcio mitocondrial, manteniendo más baja la concentración del ión en el citoplasma.

BIBLIOGRAFÍA

- AEBY, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* San Diego, v.105, p.121-126.
- AFFOURTIT, C; KRAB, K; MOORE A.L. (2001). Control of plant mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica* 1504:58-69.
- AMTMANN, A; TROUFFLARD, S; ARMENGAUD P. (2009). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol Plant.* 133(4):682-91.
- ARPAGAUS, S; RAWYLER, A; BRAENDLE, R. (2002). Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *Biol. Chem.* 277:1780-1787.
- AYA, H. (2009). Evaluación del manejo químico de la pudrición del cogollo en cuatro materiales de palma de aceite. Tesis. Universidad Nacional Colombia. Agronomía.
- AZNAR Y. (2001). Caracterización fisiológica del Bitter Pit: aspectos nutricionales, fenológicos y de diagnóstico. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. España
- BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. *Biochem Pharmacol*, Oxford, 2008.
- BERGMANN, W. (1992). Nutritional disorders of plants. G. Fischer. Jena (Alemania). pp. 132-150.

BIGG, AR. (1997). Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Dis.* 81: 339-403.

BUCHER M (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol*, 173:11-26.

BUEGE, J.A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation, *Method.Enzymol.* San diego, v. 52, p.302-310, 1978.

BUSTAMANTE C. (2009). Caracterización de la actividad β -Xilosidasa en frutos climatéricos y no climatéricos. Análisis de regulación y expresión hormonal. *Plants Science.* Vol 177, issue 1: 49-56

CAKMAK I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cell from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.* 146:185-205

CASOLO, V; BRAIDOT, E; CHIANDUSSI, E; MACRI, F; VIANELLO, A. (2000). The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS Letters.* Vol 474, Issue 1.:53-57

CASTRO H. (1998). Fundamentos para el conocimiento y manejo de suelos agrícolas. Instituto universitario Juan castellanos. Tunja.

CENIPALMA. (2010). *Phytophthora palmivora.* En http://www.cenipalma.org/es/PC_phytophthora_palmivora_sanidad. Consulta: Octubre 2010.

CHAPMAN, H.D. (1965). Chemical factors of the soil as they affect microorganisms. In: Baker, K.F, Snyder W. Ecology of soil. Borne plant pathogens. University of California, Berkeley, CA. pp. 120-139.

CHEN, C; LEHNINGER.A. (1973). Ca^{2+} transport activity in mitochondria from some plant tissues. *Biochem. Biophys.* 157:183-196.

CHINCHILLA, M; DURAN N. (1999). Nature and management of spear rot-like problem in oil palm; a case study in Costa Rica. Proceedings of the 1999 porim international palm oil Latine America. *Oleagineux* 20(6): 359-363.

CHIU, T.F; BOULD C. (1976). Effects of shortage of calcium and other cation ^{45}Ca mobility, growth and nutritional disorders of tomato plants. *Journal of the science of food and agriculture*, 27: 969-977.

CONSIDINE, M.J; GOODMAN, M; ECHTAY, K.S; LALOI, M; WHELAN, J; BRAND, M.D; SWEETLOVE, L.J. (2003). Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J. Boil. Chem.* 278:22298-22302.

CONWAY W.S. (1992). Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. *Plant Dis.* 76(4): 329-334.

CORRADO F. (1970). La maladie du palmier á huile dans les llanos de Colombie. *Conseils de l'IRHO n° 97. Oléagineux.* 35 (7):383-384.

CORREDOR, M. (2008). Problemática de la Pudrición del cogollo en Tumaco e instrumentos para su manejo y la renovación del cultivo. *Palmas* 29(3), 11-16.

DE ROJAS, P; RUIZ, E. 1972. Investigaciones sobre la Pudrición del cogollo Pudrición de la flecha de la Palma africana de la plantación “La Arenosa”, de Coldesa S.A., Turbo (Departamento de Antioquia). Informe mimeografiado. 131 p. Departamento Nacional de Planeación-DNP. (2007). Visión Colombia 2019. Visiones Regionales.

DÍAZ, A; CAYON, G; MIRA, J.J; (2007). Metabolismo del calcio y su relación con la “mancha de madurez” del fruto de banano. Una Revisión. Agronomía Colombiana. Vol. 25 n^o2. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/14131>. Consulta: Mayo 2010.

DNP. (2007). Documento Conpes 3477, Estrategias para el desarrollo competitivo del sector palmero Colombiano.

DNP. (2010). Estadísticas del sector Agropecuario.

DROILLARD M-J, PAULIN A (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol* 94: 1187–1192

DUFF A. (1963). The bud rot/Little leaf disease of the oil palm. *Journal of West Afric. Inst. Oil Palm Res.* 14:176-190.

FEDEPALMA. (2008). “la palmicultura y la producción de biodiesel en Colombia” presentación Jens Mesa Dishington. Presidente ejecutivo, en X congreso de economistas de Latinoamérica y el Caribe. Septiembre de 2008. En: <http://www.veterinaria-online.com.ar/libros-pdf/motores-diesel-ppt-6.html>. Consulta: Diciembre 2010

FEDEPALMA. (2010). "Realidad y Perspectivas de La Agroindustria de la Palma de Aceite. Presentación Jens Mesa Dishington presidente ejecutivo en el primer encuentro de municipios palmeros Bogotá, Febrero de 2010. En www.fedepalma.com/document/2010/municipios_palmeros.pdf. Consulta: Diciembre 2010.

FELLE, H. (1988). Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca²⁺ and pH?. *Planta* 176, Number 2. 248-255

FLOHE, L; GUNZLER, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* San Diego, v. 105, p. 114-120p.

FÖSTER, H; RASCHED I, (1985). Purification and Characterization of Extracellular Pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* (1985) 77, 109-112

FRANQUEVILLE. H. (2001). La pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina. Revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. Cirad. Francia. Tomado de: <http://www.bionica.info/biblioteca/Franqueville%202001%20pudricion%20cogollo%20palma%20aceitera.PDF>. Consulta: Enero 2010

GARZON, T. (2003). Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España

GIL MARTÍNEZ F. (1995). Elementos de Fisiología vegetal. Relaciones hídricas, nutrición mineral, Transporte, metabolismo. Mundi prensa. Madrid.

GILL S & TUTEJA N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plant. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.

GILROY, S; BLOWERS, D.P; TREWAVAS A.J. (1987). Calcium: a regulation system emerges in plant cells. *Development* 100:181-184,

GÓMEZ, P.L; AYALA, L; MUNEVAR F. (2000). Characteristics and management of Bud rot, a disease of oil palm proc. Of the international planters conference, 17-20:545-553.

GÓMEZ P.L (1995). Estado actual de la investigación sobre pudrición de cogollo. *Palmas* 16(1): 9-23.

GRIVENNIKOVA, V.G.; VINOGRADOV, A.D. Generation of superoxide by the mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta. Amsterdam*, v. 1757, p. 553-561, 2006.

GUEVARA, A; NIETO L.E. (1999). Nematodos asociados con palmas de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) afectadas por pudrición de cogollo. *Palma* 20(1).

GUNTER, T.E.; SHEU, S-S.(2009) Characteristics and Possible Functions of Mitochondrial Ca²⁺ Transport Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics*.

HÄNSCH, R; MENDEL R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Plant Biology*. 12:259-266.

HARTLEY (1965). Some notes on the oil palm in Latine America oléagineux 20(6): 359-363.

HEPLER, P.K; WAYNE R.O. (1985).Calcium and plant development. *Plant Physiol.* 36:391-439.

HETHERINGTON, A.M; BROWNLEE.C. (2004). The generation of Ca²⁺ signals in plant. *Plant Biol.* 55: 401-427.

HORST, WJ. (1988). The physiology of manganese toxicity. En R.D Graham y N.C Uren (ed), *Manganese in soils and plants.* Kluwer Academic, Dordrecht. Pp 175-188.

IRHO.(1986). Troisième bilan des recherches sur la pourriture du coeur dans l'orient Equatorien. Document Irho 2013, 70p.

IRHO. (1987). Quatrième bilan des recherches sur la pourriture du coeur dans l'orient equatorien. Document Irho 2085, 77p.

JABS .T. (1999).Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 57: 231–245

JOUAVILLE, L.S; ICHAS, F; MAZAT.J.P. (2004). Modulation of cell calcium signals by mitochondria.

KIRKBY, E; RÖMHELD V. (2008). Micronutrientes en la fisiología de plantas:funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica.* N.68 pag 1-16.

KOWALCZYK, LP.,WIELGAT B., MACIEJEWSKA U. (2006). Changes in the antioxidant status in leave of solanum species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology.* 164:1268-1277.

LAING, D. (2011). La deficiencia transitoria del calcio como causa primordial de la pudrición de cogollo en palma de aceite. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*. N. 3 pag 26-52.

LAING D. (2009). La causa de la pudrición de cogollo en palma de aceite: hipótesis Abiótica-Edáfica. Presentación CIAT-Colombia. Junio 2009.Pdf.

LAM E, KATO N, LAWTON M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, Vol 411:848-853

LIOCHEV, S.; FRIDOVICH, I. The role of $O_2^{\bullet-}$ in the production of HO^{\bullet} in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med. New York*, v. 16, p. 29-33, 1994.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY S, MATSUDAIRA P, BARTIMORE D AND DARNELL J. (2002) *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana. 4Ed. Madrid, España.

LOGAN. D & KNIGHT.M. (2003). Mitochondrial and Cytosolic Calcium Dynamics Are Differentially Regulated in Plants. *Plant Physiology*. vol. 133 no. 1 21-24

MAATHUIS F. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Plant Biology*. 12:250-258.

MACKENZIE, S & MCLINTOSH, L. (1999). Higher Plant Mitochondria. *The Plant Cell*, Vol. 11, 571–585.

MARSCHNER H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition)*. Pages 229-312

MARSCHNER H. (1986). Mineral nutrition of higher plants. Academic press, Londres. Pp 285-299.

MARTÍNEZ G., TORRES L. (2007). Presencia de la pudrición de cogollo de la palma de aceite (PC) en plantas de vivero. Palmas vol. 28 n^o 4:12-13.

MARTÍNEZ G. (2009). Identificación temprana y manejo integrado de la enfermedad pudrición de cogollo. Palmas vol. 30 n^o 2.

MARTÍNEZ Y SILVA 2009. Fedepalma. Avance plan nacional de manejo de la pudrición de cogollo.

MEYER A, PÜHLER A, NIEHAUS K. (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. Induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana*. *Planta* vol 213(2): 214-222.

MILLER AJ, CRAMER MD. (2008) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 2008, 274:1-36.

MITSUHASHI N, OHNISHI M, SEKIGUCHI Y, KWON Y, CHANG Y, CHUNG S, INOUE Y, REID R, YAGISAWA H, MIMURA T. (2005). Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cell of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Plant physiology* vol 138(3):1607-1614

MOLLER, I.M. (2001). Plant Mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 52:561-591

Ministerio de comercio, industria y turismo. (2010). Apuesta exportadora agropecuaria. Cultivos de tardío rendimiento. En <http://mincomercio.gov.co/content/documentos/competitividad/zonafrancas/informe.pdf>. Consulta: Diciembre 2010

MORO, M.A.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J.P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic. Biol. Med.* New York, v. 39, p. 1291-1304, 2005.

MUNEVAR F., ACOSTA A. (2005). Efectos de las propiedades físicas y el contenido de nutrientes en el suelo en la pudrición de cogollo en palma aceitera. *Informaciones agronómicas*. Octubre 2005. N° 25: 1-5.

NAVARRO S. & NAVARRO G. (2000). *Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Ediciones mundi-prensa pp. 295-308.

NELSON D & COX, M.(2008). *Lehninger principios de bioquímica*. 5 Edicion. Editorial Omega.

NIETO L.E., GÓMEZ C. (1991). Estado actual de la investigación sobre el complejo pudrición cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 12 (2): 57-67.

NIETO L.E., GÓMEZ C. (1996). Síntomas e identificación del agente causal de complejo pudrición cogollo de las palmas de aceite, *Elaeis guinnensis* Jacq. *Palmas (Colombia)* V17.

NISHIMIKI, M. ET AL. (1972).The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen.*Biochem.Biophys.Res. Commun.*San Diego, v 46, P 849–864.

OKOROCOV LA, SYSUEV VA, KULAEV IS, (1978). Pyrophosphate-Stimulated Uptake of Calcium into the Germlings of *Phytophthora infestans*. *Eur. J. Biochem.* 83: 507- 511

ORSEL M, FILLEUR S, FRAISIER V, DANIEL-VEDELE F (2002): Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J Exp Bot* ,53:825-833.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. Dordrecht, v. 12, p. 913-922, 2007.

PALMER CM, GUERINOT ML. (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol.* May; 5 (5):333-340

PÉREZ M. (2009). Dinámica del sector palmero en Colombia y la región del sur de Bolívar: análisis de sus conflictos ambientales. Universidad del valle.

PILON M., ABDEL-GHANY, S., COHU C.,(2006). Copper cofactor delivery in plant cells. *Plant Biology.* 9:256-263.

PIÑEROS, M., TESTEER, M. (1995). Characterization of a voltage dependent calcium selective channel from wheat roots. *Planta*, 195, 478-488.

PIÑEROS, M., KOCHIAN, L. V, (2001). A patch clamp study on the physiology of aluminium toxicity and aluminium tolerance in *Zea mays*: identification and characterization of Al³⁺ -induced anion channels. *Plant Physiol.* 125, 292-305.

POOVAIAH B.W & REDDY A.S (1987). Calcium messenger system in plant. *Critical reviews in plant sciences.* 6:47.103.

QUESADA G. (2000). Cultivo e Industria de la Palma Aceitera. En: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_palma.pdf. Consulta: Diciembre 2009

REDONDO M, NIETO M, BONILLA I., BOLAÑOS L., (2002). El boro y la Relación Boro-Calcio (B-Ca²⁺). En: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/boro.htm

RENGEL, Z. (1992). Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol*, 121, 491-513

RENGEL, Z., ELLIOTT, D. C. (1992). Mechanism of aluminium inhibition of net ⁴⁵Ca²⁺ uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol*. 98, 632- 638

RENGEL Z. (1996). Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol*. 134(3):389-406

ROCHA DE SOUZA., VIEGAS A. (2000). Amarelecimento fatal do dendezeiro: identificação prática. Denpasa, Belem, Brasil, 27p.

SALISBURY F.B., ROSS C.W. (2000a). Fisiología de las Plantas. Tomo 1. Celulas: agua, soluciones y superficies. Ed. Thomson. España.

SALISBURY, B.F Y ROSS, C.W (2000b). Fisiología de las Plantas. Tomo 2. Bioquímica Vegetal. Thomson Editores. España.

SALVI, M.; TONINELLO, A. Effects of polyamines on mitochondrial Ca²⁺ transport. *Biochim. Biophys. Acta. Amsterdam*, v. 1661, p. 113-124, 2004.

SANCHEZ, J. (2007) Fertilidad del suelo y nutrición mineral de plantas. En <http://www.olivos.cl/images/stories/noticias/fertilidad-del-suelo-y-nutricion.pdf>.

Consulta: Septiembre 2012.

SANTOS A., CAYON G. (2010). Análisis de las últimas investigaciones sobre pudrición de cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) Universidad nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.

SAOTOME, M.; KATOH, H.; SATOH, H.; NAGASAKAS.; YOSHIHARA, S.; TERADA, H.; HAYASHI, H. Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol Heart Circul. Physiol.* Bethesda, v. 288, p. 1820-1828, 2005.

SARRIA G (2008). Microorganismos asociados a la pudrición del cogollo de palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero. Vol. 29 n^o 3. Edición Especial, Palmas 27.

SANZ MA., BLANCO A., MONGE E., VAL J. (2001). Caracterización de la deficiencia de calcio en plantas de tomate utilizando parámetros fisiológicos. *Información técnica económica agraria (ITEA)*, Vol 97.

SCAIFE M.A., CLARKSON P.T. (1978). Calcium related disorders in plants- a possible explanation for the effects of weather. *Plant soil* 50: 723-725.

SIES ET AL, (1979). Increased biliary glutathione disulfite release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS letters*. Amsterdam, v. 103, p. 287-290.

SILLAMPA M. (1976). Los oligoelementos en el suelo y en la agricultura. Ed. FAO. Roma. El calcio en las plantas: transporte y absorción

SIMÓN, E.W. (1978). The symptoms of calcium deficiency in plants. *New Phytologist*, 80: 1-15.

SIRIJOVSKI N. LUNDQVIST J, ROSEMBÄCK M, ELMLUND H, AL-KARDAGHI S, WILLOWS RD, HANSSON M. (2008). Substrate-binding model of the chlorophyll biosynthetic magnesium chelatase BchH subunit. *Biol Chem* 283(17):11652-60.

SLUSE, E.F, JARMUSZKIEWEZ. W, NAVET. R, DOUETTE. P, MATHY.G, SLUSE-GOFFART.C.M. (2006). Review Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochimica et Biophysica*. 1757:480-485.

SPANN T Y SCHUMANN A. (2010). Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance. University of florida IFAS extension.

SPARAGNA, G.C.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GUNTER, T. (1995). Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. *J. Biol. Chem. Bethesda*, v. 46, p.27510-27515,

SYED, R, (1979). Studies on oil palm pollination by insects. *Bull. Ent. Res.*, 69 : 213-224.

SYSUEV, VA Y COL. (1978). Phosphohydrolases of the phytopathogenic fungus *Phytophthora infestans*. *Biokhimiia*. 1Oct;43(10):1790-5.

TAGLIAVINI, M. (2000). Mineral nutrient partitioning to fruits of deciduous trees. *Acta Horticulturae*, 512: 131-140.

TRIWAVAS, A., GILROY, S. (1991). Signal transduction in plant cells. Trends in genetics 7, 356-361

TURNER P.D. (1981). Oil palm diseases and disorders. Oxford university press, Kuala Lumpur, 280p.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. Oxon, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem-Biol. Interact. Ireland, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN DONGEN. J, GUPTA. K.J, RAMIREZ-AGUILAR. S.J, ARAUJO. W.L, NUNES-NESI. A, FERNIE. A.R. (2011). Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. Plant Physiol. Doi:10-1016

VANG-PETERSEN, O. (1980). Calcium nutrition of Apple trees. A Review. Scientia Horticulturae, 12: 1-9.

VANGUARDIA. (2010). En <http://vanguardia.com/historico/56859-pc-el-gran-desafio-sanitario-de-los-palmeros>. Consulta: Marzo 2011.

VIEIGAS J.M., FRAZAO D.A (2000). Teores de micronutrientes em folhas de dendeseiros sadios com sintomas de amarelecimento fatal. Poster seminário internacional-agronecio de dende: uma alternativa social, económica e ambiental para o desenvolvimento, sustentavel da Amazonia. Belém, Pará. Brasil, 16-20.

WHITE P.J. (2001). The pathways of calcium movement to the xylem. J. Expl. Bot. 52(358): 890-899.

WHITE P.J. & BROADLEY M. (2003). Calcium in plants a review. *Annals of botany* 92; 487-511.

WHITE P.J & DAVENPORT R.J. (2002). The voltage-independent cation channel in the plasma membrane of wheat roots is permeable to divalent cations and is involved in cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Plant physiol.* 130: 1386-1395.

VIROLAINENE, E. BLOKHINA, O. FAGERSEDT. (2002). Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann. Bot.* 90:509-516

WISNIEWSKI M. DROBY S. CHALUTZ E. (1995). Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on *Botrytis cinerea* and *penicillium expansum* in vitro and on biocontrol activity of *candida oleophila*. *Plant Pathol.* 44, 1016-1024.

WISSEMEIER AH, HORST WJ (1992) Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp.). *Plant Soil* 143: 299-309

VOSS, O.D (1961). The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* San Diego, v.4, n.1, p. 48-51.

XIONG T, BOURQUE S, LECOURIEUX D, AMELOT N. (2006). Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763:1209–1215

YAMAMOTO, Y., RIKIISHI, S., CHANG, Y. C., ONO, K., KASAI, M., MATSUMOTO, H. (1994). Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured

tobacco cells: Correlation between aluminium uptake and growth inhibition. *Plant Cell Physiol.* 35, 575-583

YUEN M.C. (1993). Postharvest handling of tropical fruits. In: proceedings of the international conference on postharvest handling of tropical fruit, July 19-21. Chaing Mai, Thailand.

ZENTMYER G.A., LEWIS L.L.(1975). Avocado root rot research program calif Avocato. Soc. Yearb 58, 89-92.