

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Obtención de oligómeros de quitosán y su evaluación como posibles promotores de crecimiento en tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo estrés salino.

Por:

JORGE ALBERTO MARTÍNEZ MORGADO

Tesis

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Buenvista, Saltillo; Coahuila, Abril de 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

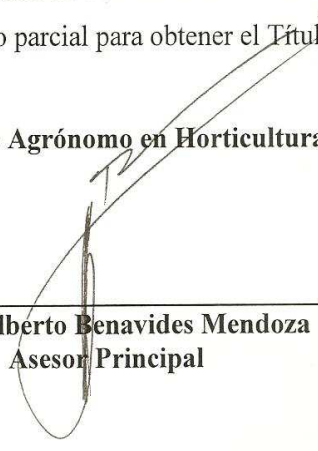
POR:

JORGE ALBERTO MARTÍNEZ MORGADO


TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador
Como requisito parcial para obtener el Título de:


Ingeniero Agrónomo en Horticultura


Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor Principal


Dra. Hortensia Ortega Ortiz
Asesor Externo


Dr. Homero Ramirez Rodriguez
Asesor


M.C. Alberto Sandoval Rangel
Asesor


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo
Coordinador de la División de Agronomía
Coordinación
División de Agronomía



Saltillo, Coahuila. Abril de 2011.

*La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la
verdad.*

Julio Verne

*“El ser ingeniero agrónomo no es sólo una profesión sino un estilo de
vida”*

Jorge A. Martínez M.

DEDICATORIAS

*Con todo mi amor, cariño y admiración, a mis padres:
Sra. Adelfa Morgado Sardineta
Sr. Ángel Martínez González (†)*

A tan maravillosas personas les dedico este humilde trabajo

A mi madre que con sus bendiciones y consejos y el apoyo cuando decidí alejarme y tomar mi camino ahora se cual valiosas son sus bendiciones por eres y seguirás siendo mi pilar en mi vida a ti mujer hermosa Te amo.

Soy el fruto de aquel árbol que debajo su sombra fui creciendo, no se tiene nombre cuando no hay padre y todo ese orgullo me lo diste a mí, el me enseñó el buen camino el me enseñó a trabajar recorrimos tantas veces caminos y mas caminos me refiero a ti buen hombre me refiero a ti mi querido padre donde quiera estés te quiero.

A mi hermana Elena que con admiración es claro ejemplo de una persona dedicada y entregada, quien fue mi compañera y fue mi testigo de alegrías, tristezas y sobre todo mi única familia al andar por tierras lejanas gracias a ti aprendí la tolerancia a ti gracias por tu compañía.

A Evelina hermana tu que siempre apoyas a las necesidades y no tuve mayor necesidad de salir de casa por la única razón de aprender y lograr esta meta en la vida a ti gracias.

Mi hermano Ángel que estando tan lejos de casa como yo sabemos cual valioso es sentirse cerca de casa y no hay nada mejor que recordarte y acorte las distancias por sien quien eres gracias.

Un buen hombre y un buen buitre jamás olvidan de los buenos amores en el camino, el cual inspiran momentos de gratitud a todas y cada una de ellas en especial a Sher Nava G. y JuLy García G.

A mis compañeros de carrera Chuy Santiago R. Anselmo Hernández, Víctor Armerio, Víctor Fonseca, y por sus consideraciones en la carrera a Kenya Zapata y demás compañeros de generaciones pasadas.

A los amigos de la comunidad paraguaya de esta universidad quienes me brindaron su amistad, consideración y amabilidad en especial por su apoyo en este trabajo Armando Becvort, a Beto Romero, Rosalino, Víctor, Osvaldo, Ricardo y demás a todos Gracias.

A las tan amables personas que me abrieron las puertas de su casa en mi estancia en Saltillo les doy mis más sinceros agradecimientos a Don Santiago Luna y la Sra. Luz con cariño y respeto a ustedes tan buenas personas jamás se olvidan.

A TODAS LAS PERSONAS DIOS LAS BENDIGA.....

|

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**. Por haber encendido esa luz que me alumbro el camino cuando me encontraba en la oscuridad y permitirme lograr una meta mas en mi vida y por la sabiduría que puso en mi para culminar tan dichosa y noble carrera.

Al **CONACyT**. Por la beca otorgada para la realización de mi trabajo de tesis dentro del Proyecto CB80425.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)**. Por haberme abierto sus puertas y el apoyo económico para la realización de mi tesis.

A Mi Alma Terra Mater la **Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”** que con vocación y esfuerzo coseche los frutos del conocimiento.

Al Dr. Adalberto Benavides M. por su apoyo en la realización de esta investigación y su orientación técnica para el desarrollo de la misma. A tan eminente persona llena de vastos conocimientos mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Hortensia Ortega O. por sus aportaciones en el desarrollo de este trabajo y por su comprensión y apoyo.

A los asesores al Dr. Homero Ramírez R. y M.C Alberto Sandoval Rangel que como profesores y miembros del jurado mis más sinceros agradecimientos.

A todos mis profesores y amigos que hicieron mi estancia que con sus profundos conocimientos sembraron las semillas del conocimiento. Ing. M.C. Cesar Estrada, Ing. M.C. Arnoldo Oyervides G. Ing. M.C. Alberto Sandoval R. e Ing. Antonio Rodríguez.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| DEDICATORIAS | <i>i</i> |
| AGRADECIMIENTOS | <i>iii</i> |
| ÍNDICE DE CUADROS | <i>vi</i> |
| ÍNDICE DE FIGURAS | <i>vii</i> |
| RESUMEN | <i>ix</i> |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Justificación | 3 |
| Objetivos | 3 |
| Hipótesis | 3 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| Inductores de Resistencia | 4 |
| La Quitina | 4 |
| Química y Estructura | 4 |
| Métodos de Obtención del Quitosán | 5 |
| Oligómeros de Quitosán | 6 |
| Interacción Oligómeros – Planta | 8 |
| El Tomate | 11 |
| Importancia del Cultivo | 11 |
| Origen e Historia | 12 |
| Factores Ambientales y Culturales que Afectan la Productividad | 12 |
| Luz | 13 |
| Temperatura | 13 |
| Plagas y Enfermedades del Tomate | 13 |
| Tipo de Suelo | 14 |
| Concepto Estrés | 15 |
| Algunos Efectos de la Salinidad en el Cultivo del Tomate | 15 |
| Efecto de la Salinidad en las Raíces | 15 |
| Efectos Nutricionales en el Cultivo de Tomate | 17 |
| Efectos en el Desarrollo de la Parte Aérea | 18 |

| | |
|--|----|
| Efectos Positivos de la Salinidad | 19 |
| Tolerancia a la Salinidad | 20 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| Localización Geográfica del Área Experimental | 21 |
| Descripción del Material Experimental | 21 |
| Qitosán | 21 |
| Oligómeros de Qitosán | 21 |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 21 |
| Solución Nutritiva | 21 |
| Material Vegetativo | 22 |
| Metodos | 22 |
| Obtención de Oligómeros de Qitosán por vía Enzimática | 22 |
| Descripción de los Tratamientos | 23 |
| Diseño Experimental | 23 |
| Establecimiento del Experimento | 23 |
| Siembra | 24 |
| Riegos | 24 |
| Aplicación de Oligómeros de Qitosán | 25 |
| Control Fitosanitario | 26 |
| Variables Evaluadas | 27 |
| Variables de Biomasa | 27 |
| Peso fresco de Raíz y Tallo | 27 |
| Peso Seco de Raíz y Tallos | 27 |
| Asimilación de CO ₂ | 27 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 28 |
| Peso Fresco de Tallos de la Aplicación de Oligómeros de Qitosán Vía Sustrato | 29 |
| Peso fresco de Tallos de la Aplicación de Oligómeros de Qitosán Vía Foliar | 32 |
| Absorción y Análisis de Minerales | 36 |
| Asimilación de CO ₂ | 43 |
| CONCLUSIONES | 45 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 2.1. Algunas de las aplicaciones de la quitina y el quitosán en actividades relacionadas con la agricultura. | 7 |
| Cuadro 3.1 Descripción de los tratamientos de las plántulas de tomate tratadas con oligómeros de quitosán y estrés salino. | 23 |
| Cuadro 3.2. Cálculo de la cantidad de NaCl a aplicar y medición de CE y del pH de las soluciones preparadas. | 25 |
| Cuadro 3.3 Principales plagas del tomate en invernadero y su control, durante el ciclo primavera-verano del 2010. | 26 |
| Cuadro 3.4 Principales enfermedades del tomate en invernadero y su control, durante el ciclo primavera-verano del 2010. | 26 |
| Cuadro 4.1 Propiedades de los oligómeros de quitosán obtenidos por hidrólisis enzimática en Planta Piloto (CIQA). | 28 |
| Cuadro 4.2 Promedio de los muestreos (a los 7, 14, 21, 28 días después de la germinación) de las variables de biomasa fresca y seca en plántulas de tomate tratadas con oligómeros de quitosán vía sustrato. | 29 |
| Cuadro 4.3 Promedio de los muestreos (7,14,21,28 días después de la germinación) de las variables de biomasa fresca y seca en plántulas de tomate tratadas con oligómeros de quitosán vía sustrato. | 32 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 Estructura Química del Quitosán. | 5 |
| Esquema 3.1 Diagrama de flujo del procedimiento experimental para cada tipo de aplicación de los oligómeros vía sustrato y foliar. | 24 |
| Figura 4.1 Espectro de Infrarrojo del oligómero 1. | 28 |
| Figura 4.2 Peso fresco de las plántula ($\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$) de tomate tratadas con los diferentes oligómeros y a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl aplicadas vía sustrato | 30 |
| Figura 4.3 Fotografías del crecimiento durante los primeros días después de las aplicaciones. | 33 |
| Figura 4.4 Peso fresco de las plántula ($\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$) de tomate tratadas con los diferentes oligómeros y sus diferentes concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl aplicadas vía foliar. | 34 |
| Figura 4.5 Comparación de la acumulación total de Ca (mg/Kg) con los diferentes oligómeros a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl en vía sustrato. | 36 |
| Figura 4.6 Comparación de la acumulación total de Ca (mg/Kg) con los diferentes oligómeros aplicados vía foliar a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl. | 37 |
| Figura 4.7 Comparación de la acumulación total de K (mg/Kg) al aplicar los oligómeros de quitosán vía sustrato en plántulas de tomate con diferentes concentraciones de NaCl 0, 75, 150, 300. | 38 |

Figura 4.8 Comparación de la acumulación total de K (mg/Kg) al aplicar los oligómeros de quitosán vía foliar en plántulas de tomate con diferentes concentraciones de NaCl 0, 75, 150, 300. 39

Figura 4.9 Comparación de la acumulación total de Na (mg/Kg) con los diferentes oligómeros a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl aplicados vía sustrato. 40

Figura 4.10 Comparación de la acumulación total de Na (mg/Kg) con los diferentes oligómeros aplicados vía foliar a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl. 41

Figura 4.11 Niveles de asimilación de CO₂ en los tratamientos vía sustrato a los 21, 22 y 23 días DDG expresados en $\mu\text{mol (CO}_2\text{)}/\text{m}^2/\text{seg}^{-1}$. 43

Figura 4.11 Niveles de asimilación de CO₂ en los tratamientos aplicados por vía foliar a los 21, 22 y 23 días DDG expresados en $\mu\text{mol (CO}_2\text{)}/\text{m}^2/\text{seg}^{-1}$. 44

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue observar los efectos de los oligómeros de quitosán sobre el crecimiento y tolerancia al estrés en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) bajo invernadero, se realizaron cuatro aplicaciones vía sustrato y foliar con soluciones al 0.1 % peso/volumen de quitosán en ácido acético al 1%. Un tratamiento testigo con cuatro concentraciones de 0, 75, 150, 300 mMolar de cloruro de sodio (NaCl) y tres tratamientos que fueron Oligómero 1, oligómero 2, oligomero 3, con cuatro concentraciones 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl para cada uno de los diferentes oligómeros. Se encontró un aumento positivo en el peso fresco de las plántulas con el oligómero 2 al 0.1% en aplicaciones vía sustrato, respecto a los demás tratamientos. No se encontraron diferencias entre los tratamientos restantes de las aplicaciones vía foliar.

La forma de aplicación vía sustrato tiene efecto positivo en el funcionamiento a las respuestas de señalización, Esto puede aclarar que la aplicación exógena de inductores de resistencia varía en cuanto a la forma de aplicación, peso molecular, síntesis etc.; así como también a las diferentes especies vegetales. También es posible deducir que las respuestas adaptativas dependen de la acción de los señalizadores que interaccionan con los receptores. Los resultados obtenidos indican el uso potencial de los oligómeros de quitosán en el manejo agronómico de cultivos. Se requiere, sin embargo, realizar gran cantidad de estudios para verificar la viabilidad de su aplicación en los cultivos en México.

Palabras Clave: Tomate, quitosán, oligómeros, estrés, salinidad.

I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de materiales menos agresivos con el ambiente es una tarea continua en todas las aéreas del quehacer humano debido a los altos niveles de contaminación presentes en todo el planeta, siendo en la agricultura doblemente complicado. Por un lado se deben producir materiales que presenten un efecto específico en la planta o en sus productos. Mientras que por otra parte, se necesita que estos se eliminen sin efectos perturbadores en el medio ambiente. Adicionalmente en los sistemas agrícolas es necesario garantizar que los diversos agroquímicos utilizados como estimuladores del crecimiento, fertilizantes, insecticidas etc., no produzcan efectos perjudiciales como la inducción de resistencia en patógenos o su acumulación en los consumidores humanos. Se estima que muchas de las enfermedades actuales se producen por las causas anteriores.

Diferentes compuestos fueron reportados en la literatura como inductores de resistencia a través de mecanismos diversos como la inhibición del crecimiento de patógenos, la producción de fitoalexinas, la activación de genes de resistencia y la resistencia sistémica inducida etc.

Entre las alternativas para el desarrollo de productos de origen natural se encuentran algunos, como los oligómeros de pectina derivados de la degradación incompleta de las paredes celulares vegetales o de levaduras, así como los oligómeros de quitina y quitosán producidos a partir de la quitina de crustáceos y hongos. Una ventaja importante de estos polímeros biológicos es su carácter polifuncional: permiten aumentar la tasa de crecimiento funcionando probablemente como fuente de carbono o como reguladores del crecimiento, inducen resistencia hacia algunos patógenos o ciertas clases de estrés abiótico, funcionan como atrapadores de cationes aumentando la disponibilidad de nutrientes para las plantas o eliminando aquellos iones indeseables como los metales pesados.

La quitina y su derivado el quitosán [poly(2-amino-2-deoxi-D-glucosa)] o (poli-D-glucosamina) constituyen, después de la celulosa, los polisacáridos más abundantes en la naturaleza.

El quitosán es un compuesto preparado comercialmente a través de la desacetilación alcalina de la quitina obtenida del exoesqueleto de crustáceos marinos. Este compuesto es soluble en ácidos débiles y puede utilizarse directamente como agente antifúngico o bien

como inductor de respuestas de defensa en las plantas, además se ha reportado la aplicación del quitosán para prevenir el crecimiento de microorganismos en jugos no pasteurizados, mientras que en otros trabajos lo utilizaron incorporándolo en una cubierta que aumentó la vida de pos-cosecha de frutos. Al aplicarlo directamente a los tejidos de la planta el quitosán induce la peroxidación de lípidos y la producción de especies reactivas de oxígeno promoviendo de esa forma la activación de respuestas de defensa contra el estrés biótico y abiótico. En cambio, al aplicarlo en el sustrato es probable que el quitosán actúe como un efectivo agente quelatante. Sin embargo, la funcionalidad y actividad del quitosán depende de sus características físicas como el peso molecular y el grado de acetilación.

El uso del quitosán en actividades agrícolas es mucho más reciente, pero a pesar de ello puede considerarse hoy en día abundante y en aumento. Propiedades útiles para la agricultura: actividad bactericida, actividad antifúngica, antiviral, estimulación del crecimiento, inducción de resistencia y algunos otros de usos específicos en áreas relacionadas con la agricultura.

El uso de agroquímicos de origen natural podría ser una solución a la problemática anterior. Son muchas las sustancias que se usan en este sentido. En el presente trabajo se estudiarán los efectos de oligómeros de quitosán, un biopolímero natural, en tomate bajo estrés salino, ya que el quitosán se ha convertido rápidamente en una alternativa prometedora para la agricultura.

JUSTIFICACIÓN

La agricultura actual requiere de procedimientos efectivos y amigables desde el punto de vista ambiental para el control del crecimiento, la fertilización y el manejo de plagas y enfermedades. El trabajo propuesto está orientado a la aplicación de los oligómeros de quitosán, en la producción agrícola. Los resultados obtenidos en otros trabajos indican efectos positivos en el crecimiento, rendimiento, composición química, vida de poscosecha, y tolerancia al estrés, etc. De obtenerse resultados positivos se tiene la posibilidad de utilizar los oligómero de quitosán, como medios alternativos y competitivos para optimizar los recursos de las plantas y aumentar el uso de productos eficientes y ecológicos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de oligómeros de quitosán de diferente peso molecular como promotores de crecimiento de plantas bajo estrés salino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtención de oligómeros de quitosán por vía enzimática a partir de quitosán comercial de peso molecular alto a nivel Planta Piloto.
- Aplicación de oligómeros de quitosán de diferentes pesos moleculares con posibles propiedades inductoras de tolerancia al estrés salino.

HIPÓTESIS

La aplicación de los oligómeros de quitosán incrementa la tolerancia al estrés salino en las plantas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Inductores de Resistencia

Diferentes compuestos fueron reportados en la literatura como inductores de resistencia a través de mecanismos diversos como la inhibición del crecimiento de patógenos, la producción de fitoalexinas, la activación de genes de resistencia y la resistencia sistémica inducida (Ryals *et al.*, 1994).

La Quitina

La quitina y su derivado el quitosán, [poly(2-amino-2-deoxi-D-glucosa)] o (poli-D-glucosamina), constituyen después de la celulosa, los polisacáridos más abundantes en la naturaleza. Estos biopolímeros forman parte del exoesqueleto de los insectos, los crustáceos y también constituyen parte de la pared celular de algunos hongos (Rathke y Hudson, 1994; Cahie, 1998).

Quitosán

El quitosán es un polisacárido natural formado por unidades de glucosamina, sustancia no tóxica y biodegradable; que se obtiene por hidrólisis básica de la quitina, es decir ocurre un proceso de desacetilación en presencia de NaOH, pero el proceso nunca es completo ya que es un copolímero donde el número de unidades de glucosamina y acetilglucosamina puede variar en su composición. La presencia de grupos amino libres hacen que sea muy activa biológicamente, como es el caso de su actividad antimicrobiana. (Shahidi *et al.*, 1999).

El quitosán tiene un contenido de nitrógeno (N) mayor al 7 % (Muzzarelli, 1977) y posee una distribución regular de los grupos aminos libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos cargándose positivamente lo que le confiere un comportamiento de policación (Glasser, 1997), (Figura 2.1).

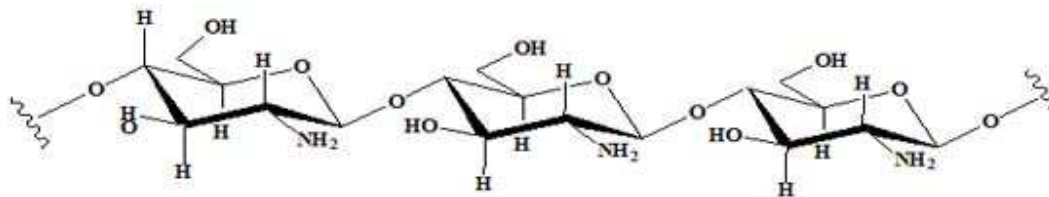


Figura 2.1 Estructura Química del Quitosán.

Este hecho permite explicar algunas propiedades del quitosán como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas (Sugimoto, 1999; Crini, 2005). Una propiedad importante del quitosán es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica. De acuerdo a Sugimoto (1999), se descompone aproximadamente a 170°C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno.

En cuanto al grado de acetilación se ha establecido, que la quitina con más de un 50% de desacetilación debe ser considerada quitosán e incluso algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente en el caso de del quitosán el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98%. Sin embargo, también se ha reportado que para lograr una mayor actividad biológica, el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de un 40% (Muzzarelli, 1977).

Métodos de Obtención del Quitosán

Se han desarrollado varios procedimientos para la obtención de quitosán en los últimos años. El método más utilizado es la reacción de conversión de quitina en este polisacárido natural principalmente por N-desacetilación alcalina (Aiba y Muraiki, 1998). Dicho proceso se realiza mediante el tratamiento directo de la quitina con una solución concentrada de hidróxido de sodio o potasio (40-50%) a una temperatura de 100°C o más, con hidrólisis de la mayoría o todos los grupos acetilos del polímero. Otro de los procedimientos de obtención de este polímero, es también la desacetilación de la quitina

por medio del uso de reactivos ácidos; sin embargo, este método puede provocar la hidrólisis del polisacárido y traer como consecuencia, bajos rendimientos del producto final (quitosán). Por esta razón, los métodos alcalinos son los procesos comúnmente empleados para la desacetilación de la quitina (Muzzarelli, 1977).

Oligómeros de Quitosán

El estudio de los oligómeros no sólo ha abierto nuevos campos en la investigación del quitosán, sino que también nos permitirá entender mejor las propiedades fisicoquímicas de sus polímeros.

En el caso del quitosán, el estudio de sus propiedades se encuentra restringido a su solubilidad en agua en un rango de pH de 2 a 6 y también a su viscosidad a concentraciones altas (Rupley, 1964).

En algunos trabajos se describe la preparación de los oligómeros de D-glucosaminas libre de grupos acetilos, a partir de la hidrólisis parcial del quitosán, estos oligosacáridos (hidroclorados) no pueden ser cristalizados, pero a partir de ellos es posible obtener quitosán con bajo contenido de grupos acetilos (Sang y Hudson, 2003).

En la literatura se encontraron solamente dos trabajos que mencionan la hidrólisis enzimática del quitosán (Rupley, 1964), por lo que su estudio será de gran utilidad para entender el proceso de hidrólisis enzimática usando complejos enzimáticos celulolíticos muy efectivos en la celulosa que además son bastante baratos, fáciles de usar y resistentes a cambios de pH (Ortega-Ortiz *et al.*, 2009).

El uso del quitosán en actividades agrícolas es mucho más reciente pero, a pesar de ello, puede considerarse hoy en día abundante y en aumento. El cuadro 1 muestra algunas de las aplicaciones que se han ensayado para este biopolímero en actividades relacionadas con la agricultura.

Cuadro 2.1. Algunas de las aplicaciones de la quitina y el quitosán en actividades relacionadas con la agricultura.

| Uso | Biopolímero | Propiedades Aprovechadas | Referencias | Cultivo |
|--|--------------------|---|---|---|
| Películas para el recubrimiento de frutos, hojas, semillas y vegetales frescos | Quitosán | Antimicrobiana | Galed <i>et al.</i> , (2004), Srinivasa <i>et al.</i> , (2004), Ratanachinakorn <i>et al.</i> , (2005) Hewajulige <i>et al.</i> , (2007), Devlieghere <i>et al.</i> , (2004). | Cítricos, mango, toronja, papaya, fresa, Tomate |
| Clarificación de jugos de fruta | Quitosán | Coagulante-Floculante | Chatterjee <i>et al.</i> , (2004), Boguslawski <i>et al.</i> , (1990), Root y Johnson, (1978), Hongfei y Hesheng, (2003) | Pera, toronja, Limón, manzana |
| Protección de Plántulas | Quitosán | Fungicida | Barka <i>et al.</i> , (2004); Lafontaine y Benhamou, (1996) | Uva de vino, Tomate |
| Liberación controlada de agroquímicos | Quitina y Quitosán | Formación de hidrogeles, labilidad de derivados | Mc Cormick <i>et al.</i> , (1982), Teixeira <i>et al.</i> , (1990), Hirano,(1978), Palma <i>et al.</i> , (2005). | Arándano |
| Estimulación del Crecimiento | Quitosán | Bioestimulante | Nge <i>et al.</i> , (2006) | Orquídea |

| | | | | |
|---|--|----------------------------|---|---|
| Inhibidor del oscurecimiento de frutos y tubérculos | Quitosán | Biocida | Waliszewski <i>et al.</i> , (2002) | Plátano, papa |
| Plátano, papa | Quitosán | Antimicrobiana | Liu <i>et al.</i> , (2007), Hadwiger y McBride, (2006), Bautista- Baños <i>et al.</i> , (2006) | Tomate, papa, Hortalizas |
| Corrección de sustratos de crecimiento | Quitina y Quitosán | Fungicida, Nematicida | Sneh y Henis, (1972), Abd-El- Kareem, (2002), Abd-El-Kareem <i>et</i> <i>al.</i> , (2002), Abd-El- Kareem <i>et al.</i> , (2004), Abd-El- Kareem <i>et al.</i> , (2006) | Lupino blanco (altramuz), chícharo, tomate, papa, apio |
| Inductor de mecanismos de defensa | Oligómeros de quitina y quitosán | Inductor de Resistencia | Khan <i>et al.</i> , (2003) | Soya |

Revista 2 UDO Agrícola 8 (1): 1-22. 2008.

Interacción Oligómeros – Planta

Las plantas cuentan con un complejo sistema de señalización que permite integrar los eventos del desarrollo y las actividades bioquímicas y fisiológicas con los constantes desafíos que impone el ambiente de crecimiento. El resultado de esta red de señales y receptores es el conjunto integrado de respuestas que se manifiesta como el fenotipo de una planta.

Muchas de las respuestas mencionadas son constitutivas, dependientes del patrimonio genético particular de la planta, mientras que otras se manifiestan sólo bajo una condición particular inductiva. Estas últimas son las que se observan durante las respuestas de adaptación al ambiente y son desencadenadas por factores bióticos, como patógenos, plagas y simbioses, o por factores abióticos como la temperatura, radiación, salinidad, etc.

Las respuestas adaptativas dependen de la acción de los señalizadores que interaccionan con los receptores. Existen múltiples clases de señalizadores, variando ampliamente en cuanto a clase química, composición, peso molecular y origen o síntesis. Entre estos compuestos señalizadores se encuentran los derivados de la hidrólisis o rompimiento de la molécula de quitina o del quitosán, que da lugar a un amplio grupo de oligómeros de diverso peso molecular con habilidad para modificar las actividades fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las plantas (Fry *et al.*, 1993).

Normalmente el receptor activado por el señalizador modifica la expresión genética, cambia las propiedades de la membrana celular o determina un cambio en la estructura o propiedades de ciertas proteínas. Se sabe que existen al menos cuatro cascadas distintas de transducción de señales de estrés de agua, salinidad y baja temperatura, los cuales son los tipos de estrés abiótico más estudiados. Dichas cascadas de señales muestran comunicación e interacción entre ellas formando una red de señalización (Pastori y Foyer, 2002).

Diferentes derivados del quitosán han sido implicados en la inducción de la resistencia al ataque de insectos y patógenos, principalmente a través de la vía del jasmonato, que está también implicado en la respuesta a estrés hídrico (Munemasa *et al.*, 2007).

Hasta el momento la información con que se cuenta sobre la señalización con los complejos de poliácido acrílico-quitosán es solamente la realizada por nuestro grupo de trabajo, siendo los resultados más sobresalientes los que a continuación se detallan.

La hipótesis del efecto fisiológico de los complejos fue verificada por nuestro grupo demostrando que en el tomate la presencia de los complejos de quitosán activan dos de las enzimas antioxidantes (catalasas y peroxidasas) asociadas con la tolerancia al estrés abiótico (Ortega-Ortiz *et al.*, 2007).

Una actividad mayor de la peroxidasa en los tratamientos con quitosán parece indicar la efectividad de este compuesto como inductor de los sistemas antioxidantes de la planta (Simontacchi *et al.*, 2000).

Al aplicarlo directamente a los tejidos de la planta el quitosán induce la peroxidación de lípidos (Dubery *et al.*, 2000) y la producción de especies reactivas de oxígeno (Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999), promoviendo de esa forma la activación de respuestas de defensa contra el estrés biótico y abiótico (Lee *et al.*, 1999). En cambio, al aplicarlo en el sustrato (Ohta *et al.*, 1999), es probable que el quitosán actúe como un efectivo agente quelatante (Rathke y Hudson, 1994). Sin embargo, la funcionalidad y actividad del quitosán depende de sus características físicas como el peso molecular y el grado de acetilación.

En cuanto al efecto de los complejos sobre la morfología, crecimiento e inducción de tolerancia en las plantas se tiene lo siguiente:

Los complejos de poliácido acrílico-quitosán fueron probados en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. Floradade), sembradas en sustratos inoculados con los patógenos *F. oxysporum* y *P. Capsici*, el tratamiento de la semilla con los complejos ejerció un efecto positivo sobre la emergencia y la biomasa de las plántulas aumentando en un 15% el promedio de estas variables. Se observó un efecto positivo significativo también en ausencia de patógenos, lo cual parece indicar el efecto promotor de crecimiento de los complejos de poliácido acrílico y quitosán en las plantas probadas. (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004).

La aplicación del complejo de quitosán-poliácido acrílico con PAA de bajo peso molecular (106,000) aumenta un 40% el crecimiento de las plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Great Lakes) y cebolla (*snow ball*) bajo condiciones alta salinidad. (Ortega-Ortiz *et al.*, 2003)

La aplicación de los complejos polielectrolíticos de poliácido acrílico-quitosán aplicados en *Agave tequilana* Weber actuaron como promotores de la acumulación de carbohidratos en hojas y en la corona de las plantas, pero sin influir en el peso seco de raíz, peso seco de corona, peso seco de hojas y peso seco total de la planta. En particular el tratamiento con los complejos de quitosán aumentó del 20 al 30% el contenido de azúcares solubles en los tejidos de la corona y las hojas. (Ortega-Ortiz *et al.*, 2007).

Se encontró adicionalmente un efecto promotor de crecimiento de los complejos al cultivar plantas en suelos pobres de zonas áridas. Semillas de tomate sembradas en suelo cal cáreo tratado con diferentes concentraciones de ácido benzoico y complejo de poliácido acrílico-quitosán (PAA-Q) hicieron posible que se presentará un efecto positivo sobre el crecimiento y la producción de fruto tanto al aplicar el complejo de PAA-Q como con el ácido benzoico. En cuanto a la calidad del fruto fue posible mantener la firmeza en el transcurso de varios días, los mejores resultados se obtuvieron con el PAA-Q (Benavides-Mendoza *et al.*, 2007).

La aplicación foliar de quitosán en ácido acético aumenta la biomasa de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Donde se observó el efecto del quitosán sobre el crecimiento y adaptación postrasplante de la lechuga. En el invernadero se hicieron aplicaciones foliares durante nueve semanas de soluciones de 0.1 y 0.25% peso/volumen de quitosano en ácido acético al 1%. Aunque en campo abierto se observó mayor biomasa en las plantas provenientes del tratamiento con quitosán al 0.25% en comparación con el de 0.1%, no hubo diferencias significativas entre las plantas con quitosán y aquellas a las que se aplicó únicamente la solución con ácido acético al 1%. (Benavides-Mendoza *et al.*, 2001).

El Tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es miembro de la familia de las solanáceas. En los trópicos el tomate es una herbácea perenne (hábito de crecimiento indeterminado), pero en latitudes más templadas se cultiva como planta anual (hábito de crecimiento determinado); debido a lo anterior, la longitud de los tallos varía apreciablemente. Los frutos de tomate son soportados en racimos que portan usualmente de cuatro a ocho frutos. El fruto es una baya compuesta por varios lóculos y con muchas semillas en su interior. (Valadez, 1996).

Importancia del Cultivo

En México el tomate está considerado como la segunda especie hortícola más importante por la superficie sembrada que ocupa, y como primera por su valor de producción. A esta hortaliza de fruto se le encuentra en los mercados durante todo el año, y

se consume tanto fresca como procesada (puré), siendo una fuente rica en vitaminas (Valadez, 1996).

El tomate ocupa un lugar preponderante con relación al desarrollo económico y social de la agricultura a nivel mundial.

Origen e Historia

El tomate es una planta nativa de América tropical, cuyo origen se localiza en la región de los Andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú en donde se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestre. México está considerado a nivel mundial como el centro más importante de domesticación del tomate (Valadez, 1996).

Factores Ambientales y Culturales que Afectan la Productividad

La productividad de los cultivos de tomate en cierto grado suele estar limitada por luz, temperatura, nutrición y abastecimiento de agua. A gran escala, la importancia relativa de estos factores depende de la latitud y a nivel región o área depende de la geografía y las condiciones ambientales particulares del lugar. Así, los cultivos de invierno en invernaderos con calefacción, como los utilizados por los productores del norte de Europa y Norteamérica, la luz viene siendo un factor limitante. En cambio, en cultivos en invernaderos sin calefacción como en los que cultivan los productores del sur de Europa y Medio Oriente la luz y la temperatura, ambos vienen siendo limitantes.

Esto también ocurre en México, sobre todo en la región del Altiplano Norte Centro, donde no es posible producir tomate de calidad durante el invierno, sin el apoyo de calefacción. La producción de cultivos en casas sombra (Net house) o Vil espacios (Bustamante 1997), con gran auge en el noroeste del país (Sinaloa, Sonora y Baja California), cuyo principio fundamental a diferencia de los invernaderos, es el reducir la temperatura y funcionar de barrera para los insectos, lo cual ha derivado a dicho concepto, que conjunta prácticas agronómicas y la modificación microambiental, en zonas con alta radiación y temperatura y baja humedad relativa para favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas (particularmente hortalizas de fruto).

En condiciones de campo y bioespacios, las temperaturas (demasiado altas y bajas); luz (días cortos y nublados, denso dosel); agua, nutrición o falta de protección de malezas, plagas y enfermedades, todas en conjunto o de manera particular pueden ser limitantes. No obstante, el manejo del agua y la nutrición vienen a ser uno de los impedimentos más importantes para alcanzar elevados rendimientos de tomate de calidad (Muñoz y Castellanos, 2003).

Luz

La calidad de la luz y el fotoperíodo no son tan importantes para el crecimiento del tomate como la radiación integral diaria. Tratar de superar las limitaciones de luz a nivel comercial, económicamente rara vez se justifica. Por lo que generalmente es mejor maximizar la iluminación natural poniendo especial atención en el material y limpieza de la cubierta de los invernaderos, un diseño cuidadoso y orientación invernal óptima del invernadero y del cultivo dentro de este (Muñoz y Castellanos, 2003).

Temperatura

El tomate es una hortaliza de clima cálido que no tolera heladas (Valadez, 1996), la temperatura óptima para el desarrollo del tomate es de 23-25°C y 15-17°C, durante el día y la noche respectivamente y una humedad relativa del 70%. Las temperaturas por debajo de 8°C y por encima de 30°C, alteran el desarrollo (deficiente fructificación por deficiencias en el desarrollo de los frutos) del tomate y a 0°C se hiela. A altas temperaturas, por encima de los 30°C y largos periodos, agobian las plantas y ocasionan desordenes fisiológicos en el fruto (Muñoz y Castellanos, 2003), cuando se presentan temperaturas altas (>38°C) durante 5 a 10 días antes de antesis, hay poco amarre del fruto debido que se destruyen los granos del polen; si las temperaturas elevadas prevalecen durante 1 a 3 días después de la antesis, el embrión es destruido (después de la polinización) (Valadez, 1996).

Riego y Fertilización

Actualmente el riego por goteo se ha impuesto en los sistemas de producción de hortalizas bajo condiciones protegidas y el tomate no es la excepción. El 80% de la superficie cultivada bajo invernadero se realiza en suelo, por lo que la nutrición del cultivo debe ser gestionada entendiendo las interacciones suelo planta. En los cultivos hidropónicos los métodos de riego son más variados, precisos y rigurosos. Hoy en día no existe un consejo general sobre la dosis y el número de riegos en cultivos en sustratos confinados en contenedores (Muñoz y Castellanos, 2003).

Plagas y Enfermedades del Tomate

El primer paso para prevenir el daño al cultivo ocasionado por plagas y enfermedades es tener un diagnóstico cuantitativo del problema. Es decir, una clara identificación sin lugar a dudas y su dimensión de una plaga o enfermedad. De ahí que el monitoreo juega un papel relevante, aspecto que muchas veces no se le da la debida importancia (Muñoz y Castellanos, 2003).

Tipo de Suelo

La salinidad de los suelos es un problema mundial, en México el centro y norte del país. El problema se agudiza en las zonas áridas y semiáridas, donde los suelos presentan drenaje deficiente y alta evaporación. La superficie afectada a nivel mundial es de 8.97 millones de km² (Szabolcs I 1994). En México un 10% del área irrigada está afectada por la salinidad, y de ésta, aproximadamente el 64% se localiza en la parte norte del país (Umali 1993). La conservación de los suelos, así como su recuperación cuando están afectados por sales, son de gran importancia para la producción agrícola, y su atención está relacionada con las causas del ensalitramiento de los mismos, que pueden ser: su origen, manejo y utilización, así como las fuentes y calidad del agua de riego, factores que intervienen en las propiedades físicas y químicas de los suelos.

Concepto de Estrés

El estrés se identifica como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Dichas condiciones ocasionan cambios en todo los niveles funcionales de los organismos. Desde un punto de vista biológico, el estrés tiene una connotación más amplia, refiriéndose a los cambios ambientales que alteran al estado fisiológico de las plantas (Larcher, 1995). El estrés es el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas. Se define la resistencia al estrés como la capacidad de un organismo para resistir, evitar y escapar a los estímulos ambientales negativos o poder permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su fenotipo se vea modificado de manera significativa; su estado “ideal” se identifica al ser observado bajo condiciones óptimas y se denomina “norma” (Benavides, 2002).

Son manifestaciones fenotípicas de estrés las deformaciones como el amarillamiento, manchas, necrosis, etcétera. Otras menos obvias requieren técnicas especiales para su detección, como la baja asimilación enzimática, inducción a transmisión de genes, cambios en la composición química, etcétera. Múltiples factores ambientales inducen estados de estrés en las plantas. El estrés hídrico es la principal barrera para incrementar la producción y la calidad; en conjunto las plagas, las enfermedades y la dinámica nutrimental forman parte del objetivo de los sistemas de producción tecnificado (Cornejo, 2002).

Algunos Efectos de la Salinidad en el Cultivo del Tomate

Efecto de la Salinidad en las Raíces

El efecto de las sales en las raíces de las plantas de tomate siempre resulta en un menor crecimiento de estos órganos, hecho que puede afectar el crecimiento general de la planta al reducirse el volumen de suelo que pueden explorar sus raíces (Almasoum, 2000). Existe variabilidad en esta respuesta, la cual depende del cultivar o especie de que se trate, los niveles de salinidad a que son expuestas y la duración del período al estrés salino.

Las principales sales que afectan a los vegetales y que se encuentran en los suelos corresponden a cloruros y sulfatos de sodio, calcio, magnesio y potasio (Munns *et al.*, 2005), siendo para las plantas los principales iones citotóxicos Na^+ , Cl^- y SO_4^- (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Investigaciones en las cuales se examinó el efecto del NaCl sobre las raíces de los cultivares de *L. esculentum*: Sera, 898, y Rohaba se determinó que el aumento de la concentración de sal afectaba adversamente el crecimiento de las raíces, cuantificado como materia seca (Al-Karaki, 2000).

Las sales afectan el crecimiento al alterar la absorción de agua por las raíces, fenómeno que se denomina componente osmótico, y sería el efecto inicial que padecen las plantas (Shannon y Grieve, 1999). También se desencadenan desequilibrios iónicos en las plantas por la excesiva absorción de sodio y cloruros, los que generan efectos secundarios como problemas de toxicidad y nutricionales vinculados a la absorción de iones esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yokoi *et al.*, 2002).

En cuanto al componente osmótico, para superar los problemas de absorción de agua las plantas requieren acumular solutos compatibles a nivel de citosol y organelos sin afectar la actividad de las enzimas. Algunos de éstos son iones esenciales como el K^+ , pero la mayoría son solutos orgánicos como azúcares simples (principalmente glucosa y fructosa), alcoholes derivados de azúcares (glicerol e inositoles metilados) y azúcares complejos (trialosa, resinoso y fructanos). También se incluyen derivados de los aminoácidos cuaternarios (prolina, glicina betaína, D-alanina betaína, prolina betaína), aminas terciarias (1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-1,4-carboxil pirimidina) y compuestos sulfónicos (o-sulfato de colina, propironato dimetil sulfónico) (Yokoi *et al.*, 2002). Con ello las plantas logran disminuir el potencial osmótico, hecho que facilita el movimiento del agua hacia el interior de las células de las raíces.

En relación a la prolina, plantas de tomates (*L. esculentum* cv Radja) sometidas a estrés salino con niveles de 140 mM de NaCl generan una acumulación significativa de prolina en el citoplasma celular de las raíces primarias y secundarias. A un estrés moderado (70 mM de NaCl) sólo existen diferencias significativas de acumulación de prolina en las raíces primarias. Estos resultados sugieren que a nivel de raíces la acumulación de prolina puede ser considerada como un indicador de sensibilidad a las sales en tomate, además de

contribuir como una respuesta adaptativa a la disminución del potencial osmótico en el citoplasma (Pérez-Alfocea *et al.*, 1996).

Otro osmoregulador, la sacarosa, también cuantificada en raíces primarias del cultivar (cv) Radja, manifestó un comportamiento opuesto al esperado, puesto que disminuyó su concentración significativamente a niveles de 140 mM NaCl. En raíces secundarias la concentración de sacarosa fue semejante a 0 y 70 mM NaCl y significativamente menor a concentraciones de 140 mM NaCl. Estos resultados estarían dando cuenta que la sacarosa no es un soluto orgánico que se acumule en *L. esculentum* cv Radja, hecho que también reafirmaría que los solutos que acumulan las plantas varían entre las especies (Yokoi *et al.*, 2002). Referente a desequilibrios iónicos y toxicidad. Al ingresar el sodio al citosol de las células de la raíz a través de canales de cationes o transportadores (selectivos y no selectivos) o a través de la vía apoplástica, reduce la relación K^+/Na^+ en el citosol, la cual en condiciones normales debe ser alta para el buen funcionamiento celular (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Esto resulta en niveles tóxicos de sodio y en una concentración insuficiente de potasio para algunas reacciones enzimáticas y el ajuste osmótico, dado que como se señaló anteriormente el potasio también es un soluto compatible. La toxicidad es causada por el reemplazo del K^+ por Na^+ en reacciones bioquímicas (Chinnusamy *et al.*, 2005). Se considera también que una alta relación K^+/Na^+ mejora la tolerancia de las plantas a la salinidad (Hu y Schimdhalter, 2005).

Efectos Nutricionales en el Cultivo de Tomate

Altas concentraciones de Na^+ en la solución externa causan una disminución en las concentraciones de K^+ y Ca^{2+} en los tejidos de las plantas. Estas reducciones se pueden deber al antagonismo del Na^+ y K^+ por los sitios de absorción en las raíces, el efecto del Na^+ en el transporte al xilema o a la inhibición de los procesos de absorción (Hu y Schimdhalter, 2005). Otros investigadores consideran que una alta concentración de Na^+ no sólo inhibe la absorción de nutrientes directamente por interferencia con transportadores en la membrana plasmática de la raíz, tales como los canales selectivos de K^+ , sino también por la inhibición del crecimiento de la raíz a causa del efecto osmótico del Na^+ y a los efectos adversos del Na^+ en la estructura del suelo (Tester y Davenport, 2003). También se

ha observado que al existir un aporte suplementario de calcio y potasio se mejora la respuesta de la planta al estrés salino. Así la adición de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KNO_3 a una solución de 50 mM NaCl con la que regaron cinco cultivares de *L. esculentum* mejoraba el volumen radicular de éstos (López-MV y Satti, 1996).

Investigaciones en *L. esculentum* cv Rossel relacionada con la adición de potasio (0.2 y 2.0 mM) en la solución salina preparada con 100 y 200 mM de NaCl reportaron que el efecto nocivo del NaCl disminuye al incrementarse el potasio. Cuando las plantas fueron cultivadas con 100 mM NaCl y el potasio elevado de 0.2 a 2.0 mM en el medio de crecimiento, se observó una disminución significativa en la concentración de sodio, siendo éste de un 17% en las raíces. Al aplicar 200 mM de NaCl, la disminución en la concentración de sodio también fue significativa, siendo del orden del 19%. Estos resultados indican que el potasio suministrado, su acumulación y la regulación que produce en el tejido de la planta contribuyen a la tolerancia de la sal y a un mejor crecimiento de las plantas de tomate (Al-Karaki, 2000).

Otros estudios que relacionaban distintos niveles de salinidad con las concentraciones de nitratos en las raíces y tallos, y con el período de aplicación de las soluciones salinas en tres cultivares de tomates con diferentes tolerancias a las sales, demostraron que los efectos de la salinidad en las concentraciones de nitrógeno total y particularmente los nitratos dependen parcialmente de los niveles de NaCl y de la duración del estrés, más bien su dependencia está determinada por el grado de la tolerancia del cultivar. De los cultivares que estuvieron sometidos menos tiempo a la solución salina (tres semanas) el cv más tolerante (GC-72) mostró el mayor incremento de nitratos en las raíces. Con el aumento del período de estrés (10 semanas) las respuestas entre los cultivares más tolerantes fueron más similares (Pérez-Alfocea *et al.*, 1993).

Efectos en el Desarrollo de la Parte Aérea

La altura de las plantas de tomate disminuye con el incremento de la salinidad. A nivel de hojas la salinidad genera una reducción en su número y en el área foliar (Romero-Aranda *et al.*, 2001). También se observa clorosis, necrosis, disminución de la densidad estomática en la cara adaxial y simultáneamente un aumento en la cara abaxial, aumento de

la clorofila e incremento de la actividad de la peroxidasa (Romero-Aranda *et al.*, 2001). También afecta la floración y la producción de frutos entre otros (Del Rosario, *et al.*, 1990; Pérez-Alfocea *et al.*, 1996; Cucci *et al.*, 2000). En cuanto a su vinculación con enfermedades, favorece la incidencia de pudrición terminal en frutos de tomates.

La disminución en el número de hojas como consecuencia del incremento de la salinidad es una respuesta variable que depende de la especie o cultivar que se trate como también de los niveles de sales a que son expuestas las plantas. Experimentos realizados en los tomates cultivados del cv Daniela y Moneymarker (Romero-Aranda *et al.*, 2001) que fueron sometidos a estrés salino con 35 y 70 mM de NaCl, el nivel inferior fue suficiente para reducir significativamente el número de hojas en el cv Daniela, no así en el cv Moneymarker, que requirió 70 mM de NaCl para presentar una respuesta similar. Considerando este parámetro, se podría pensar que el cv Moneymarker es más tolerante a la salinidad que el cv Daniela y que al interior de *L. esculentum* existe variabilidad genética para tolerancia salinidad.

Efectos Positivos de la Salinidad

Al regar las plantas de tomate con aguas salobres se ha observado que algunos atributos inherentes a la calidad de los frutos mejora, por cuanto éstos presentan un mayor contenido de sólidos solubles (Del Amor *et al.*, 2001; Fernández-García *et al.*, 2004; Serio *et al.*, 2004; Satti-SME y López, 1994), sólidos totales, acidez total (Guichard *et al.*, 2001), carotenoides y licopeno (Maggio *et al.*, 2001). Estudios sobre la respuesta de las plantas al estrés osmótico (Nichols-MA *et al.*, 1995) muestran que a mayores niveles de estrés se mejora la calidad de los frutos, por cuanto el índice de refracción (°Brix) registrado en éstos fue superior a los controles.

Los frutos de tomates constituyen una fuente valiosa de carotenoides, en los cuales destaca el licopeno, poderoso antioxidante natural que se ha reconocido como beneficioso para prevenir enfermedades y patologías cardiovasculares. Investigaciones referentes a este pigmento en las cuales se sometieron plantas de tomates (híbrido H601) a tratamientos con aguas salinizadas detectaron que las concentraciones de carotenoides totales y licopeno se incrementaban gradualmente desde los niveles más bajos de CE 0.5 dS/m hasta los 4.4 dS/m (aproximadamente 0.25% NaCl w/v), sobre este valor de conductividad comenzaba a

decrecer su concentración (Maggio *et al.*, 2001). Estos datos muestran la posibilidad de mejorar el contenido de carotenoides en los frutos con una aceptable reducción del rendimiento al regar con agua con una CE de 4.4 dS/m. No obstante estos resultados, en otras investigaciones en las cuales se regaron plantas de tomates cv Naomi con una solución nutritiva ajustada a 3 y 6 dS/m con NaCl no se detectaron efectos en el contenido de licopeno (Serio *et al.*, 2004). Por otra parte, estudios realizados con el cv Durina F1 expuesto a CE de 2.7, 4.5, 6.0, 7.5 y 8.6 dS/m se detectaron en frutos ubicados en el segundo racimo un aumento en la concentración de licopeno a 4.5 dS/m. A 6.0 dS/m se reducía la concentración, volviendo a subir a los 7.5 dS/m, para bajar a los 8.6 dS/m (Leonardi *et al.*, 2004).

Considerando estos tres experimentos es posible afirmar que no existe una tendencia clara en la respuesta de las plantas de tomate a producir carotenoides cuando son sometidas a estrés salino. Presumiblemente en su producción, además del cv de que se trate, estén interactuando otras variables, de modo que es un tema que amerita más estudios para ser aclarado.

Tolerancia a la Salinidad

La tolerancia o resistencia a la salinidad es generalmente expresada en términos de la habilidad inherente de las plantas para resistir los efectos de las altas cantidades de sales en la zona radical o en los tejidos foliares sin que presenten efectos adversos. Otros autores demostraron que la salinidad causaba una mayor reducción en el crecimiento de las raíces de la acelga que en las hojas, mientras que en la cebolla la reducción en el crecimiento de los bulbos fue menor que el observado en las hojas. Adicionalmente, consideran que la resistencia o tolerancia a la salinidad es un carácter cuantitativo muy complejo controlado por muchos genes (Benavides, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Localización

Este trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México, siendo las coordenadas geográficas del sitio: 25° 21' 20'' latitud norte, 101° 01' 50'' longitud oeste y altitud de 1,776 m.s.n.m.

Qitosán

Polímero de origen natural del proveedor Marine Chemicals (India), obtenido a partir de caparazones de cangrejo. Peso molecular promedio de 200,000 determinado en el CIQA por viscosimetría usando una mezcla de solventes: ácido acético 0.2M/ acetato de sodio 0.1M a una temperatura de 30°C y grado de desacetilación del 84%.

Oligómeros de Qitosán

Los oligómeros de qitosán usados en el presente experimento se obtuvieron en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por vía enzimática, a los cuales se les determino el peso molecular por viscosimetría y son los siguientes: Oligómero 1 con peso molecular viscosimétrico (Mv) de 12,000, oligómero 2 con Mv de 8,000 y oligómero 3 con Mv de 5,000.

Cloruro de Sodio (NaCl)

El cloruro de sodio usado fue grado reactivo con 98% de pureza de la marca Halmeck con un peso molecular de 58.43 molar.

Soluciones Nutritivas

Haifa Poly-Feed[®] GG 12-43-12 + Micros 1 g/L

Nitrato de Calcio 1 g/L

Material Vegetativo

Se utilizó como material vegetal para la producción de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) la variedad “Río Grande” con hábito de crecimiento determinado.

MÉTODOS

Obtención de Oligómeros de Quitosán por Vía Enzimática

Primero se determinaron los parámetros óptimos de la reacción de hidrólisis enzimática del quitosán de peso molecular alto en el laboratorio; por lo que en base a estos parámetros se llevó a cabo la obtención de los oligómeros de quitosán a nivel Planta Piloto.

Las reacciones de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en un reactor de 120 litros con agitación y control de temperatura agregando una solución buffer de acetatos de pH 4.5 a temperatura ambiente, posteriormente se aumenta la temperatura a 60°C y se va adicionando poco a poco la cantidad necesaria de quitosán para obtener una solución al 1% y hasta que el quitosán esté completamente soluble se estabiliza la temperatura a 40°C para poder luego agregar una solución del complejo enzimático celulolítico Celobiridin (*Trichoderma viride*). Toda la mezcla de reacción se deja en agitación y temperatura constante por 24 horas. Después de este tiempo se detiene la reacción agregando una solución de hidróxido de sodio desactivando así la enzima. Posteriormente se lava el producto hasta pH neutro y se filtra; por último se seca a 50°C en estufa con circulación de aire.

Para obtener diferentes pesos moleculares se varió solamente la concentración de la enzima de 20 mg/mL a 80 mg/mL.

A los tres oligómeros obtenidos se les determinó el peso molecular viscosimétrico a las mismas condiciones que para el quitosán de peso molecular alto del cual se partió y por infrarrojo el grado de desacetilación.

Para obtener las diferentes soluciones de los oligómeros de quitosán se disolvieron en ácido acético al 1% a una temperatura de 50°C por una hora y luego se aforo con agua destilada.

Descripción de los Tratamientos

Fueron diez y seis los tratamientos donde se aplicaron vía sustrato y vía foliar tres oligómeros de quitosán con sus diferentes concentraciones de NaCl (Cuadro 3.1), a plántulas de tomate.

Cuadro 3.1 Descripción de los tratamientos de las plántulas de tomate tratadas con oligómeros de quitosán y estrés salino.

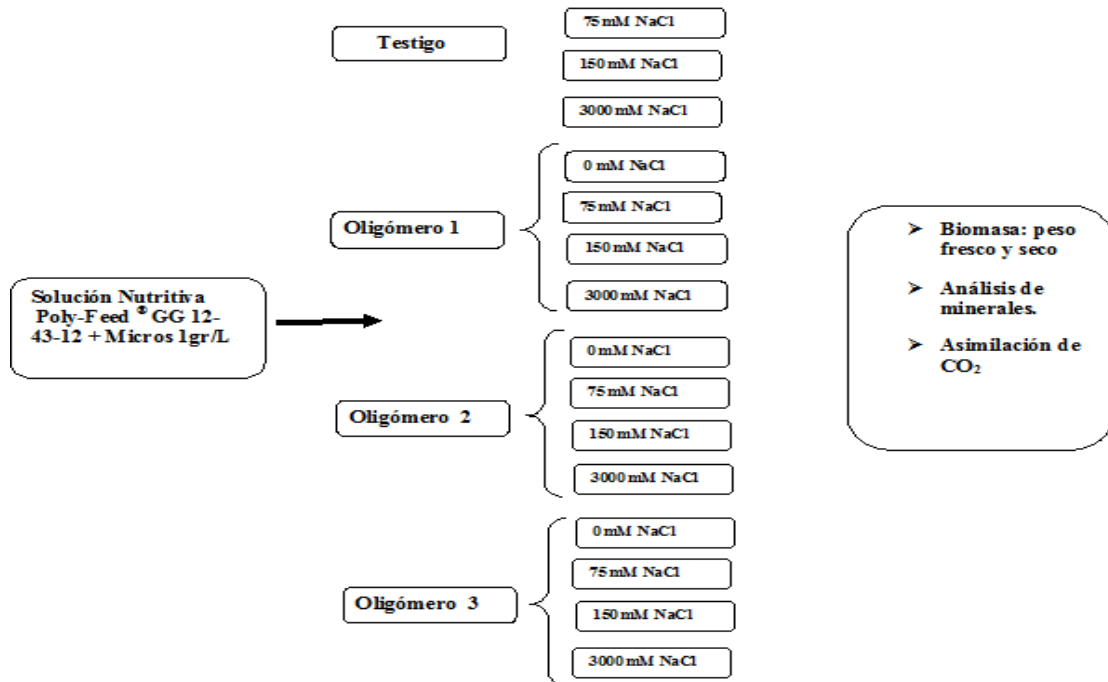
| Tratamiento | Abreviatura | Descripción |
|-------------|-------------|--------------------------------|
| T1 | T-0 | Testigo con 0 mM de NaCl |
| T2 | T-75 | Testigo con 75 mM de NaCl |
| T3 | T-150 | Testigo con 150 mM de NaCl |
| T4 | T-300 | Testigo con 300 mM de NaCl |
| T5 | O1-0 | Oligómero 1 con 0 mM de NaCl |
| T6 | O1-75 | Oligómero 1 con 75 mM de NaCl |
| T7 | O1-150 | Oligómero 1 con 150 mM de NaCl |
| T8 | O1-300 | Oligómero 1 con 300 mM de NaCl |
| T9 | O2-0 | Oligómero 2 con 0 mM de NaCl |
| T10 | O2-75 | Oligómero 2 con 75 mM de NaCl |
| T11 | O2-150 | Oligómero 2 con 150 mM de NaCl |
| T12 | O2-300 | Oligómero 2 con 300 mM de NaCl |
| T13 | O3-0 | Oligómero 3 con 0 mM de NaCl |
| T14 | O3-75 | Oligómero 3 con 75 mM de NaCl |
| T15 | O3-150 | Oligómero 3 con 150 mM de NaCl |
| T16 | O3-300 | Oligómero 3 con 300 mM de NaCl |

Diseño Experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cuatro repeticiones, aplicándose un análisis de varianza con pruebas de separación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Establecimiento del Experimento

Las charolas fueron establecidas en camas flotantes bajo un invernadero tipo túnel, con cubierta rígida de policarbonato y ventilación activa a través de extractores y pared húmeda, utilizando madera y polietileno como estructura para las camas flotantes (Esquema 3.1).



Esquema 3.1 Diagrama de flujo del procedimiento experimental para cada tipo de aplicación de los oligómeros vía sustrato y foliar.

Siembra

La siembra de la semilla se realizó el 15 de mayo en charolas de polietileno de 38 cavidades usando como sustrato un compuesto de Peat moss/Perlita 75:25 colocando dos semillas para posteriormente hacer un aclareo hasta dejar sólo una plántula por cavidad, bajo condiciones de invernadero.

Riegos

Se utilizó como fuente de nutrimentos minerales una solución nutritiva constante con fertilizante comercial de marca Haifa Poly-Feed® GG 12-43-12 + Micros 1 g/L +

Nitrato de Calcio 1 g/L. Haciendo dos primeras aplicaciones de fortalecimiento antes de aplicar la solución de NaCl después de 12 y 18 días después de la germinación (DDG). Posteriormente se aplicó la misma solución nutritiva y agregando el NaCl a las concentraciones correspondientes de 0, 75, 150, 300 milimolar, midiendo la C.E. y el pH aplicando cada tercer día según el criterio de humedad. Para el cálculo de la adición del NaCl de 0, 75, 150, 300 milimolar se tomó en cuenta el peso molecular del NaCl grado reactivo (ver Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Cálculo de la cantidad de NaCl a aplicar y medición de CE y del pH de las soluciones preparadas.

| Concentraciones de NaCl a aplicar (mM) | Concentración de NaCl (g/L) | CE de Sol. Nutritiva + NaCl (dS/m /cm) | pH |
|---|-------------------------------------|---|-----------|
| 0 | 0 | 2,261 | 6.49 |
| 75 | 4.382 | 13,309 | 6.53 |
| 150 | 8.766 | 23,373 | 6.57 |
| 300 | 17.53 | 38,275 | 6.43 |

PM de NaCl 58.43; 0.05843 g. (Unidad milimolar).

Aplicación de Oligómeros de Quitosán

Soluciones de los tres oligómeros de quitosán al 0.1% con pesos moleculares diferentes se aplicaron en dos formas: vía foliar y vía sustrato, haciendo tres aplicaciones de cada en estado de plántula. La primera aplicación de los oligómeros se llevó a cabo a los 8,23 y 38 días después de la germinación (DDG).

Vía Sustrato

Para cumplir la condición de la aplicación vía sustrato se elaboraron camas flotantes para cada tratamiento aplicando las soluciones para cada oligómero al 0.1% a partir de una solución concentrada, retirando el excedente de las soluciones nutritivas

anteriores para después agregar 3 litros de la solución final de los oligómeros a cada charola por 24 hrs.

Las aplicaciones fueron a los 8, 23 y 38 días después de la germinación (DDG) haciendo la primera aplicación antes de aplicar la solución nutritiva con las diferentes concentraciones de NaCl.

Vía foliar

Las aplicaciones fueron a los 8, 23 y 38 días DDG, aplicando a la parte foliar de manera independiente para cada tratamiento para evitar contaminación con otros tratamientos, se utilizaron atomizadores diferentes para cada oligómero, asperjando de manera completa todas las plántulas de cada tratamiento.

Control de Plagas y Enfermedades

Se tomaron medidas preventivas para el control de plagas y enfermedades que fueron tratadas con diferentes productos comerciales (Cuadro 3.3) haciendo sólo una aplicación.

Cuadro 3.3 Principales plagas del tomate en invernadero y su control, durante el ciclo primavera-verano del 2010.

| Nombre común y técnico | Dosis ha⁻¹ |
|---|------------------------------|
| Mosca blanca (<i>Bemisia sp</i>) | Confidor ® 0.3-0.6 L |
| Trips (<i>Frankliniella occidentales</i>) | Confidor ® 0.3-0.6 L |
| Minador de hoja (<i>Liriomyza spp</i>) | Confidor ® 0.3-0.6 L |

Cuadro 3.4 Principales enfermedades del tomate en invernadero y su control, durante el ciclo primavera-verano del 2010.

| Nombre común y técnico | Dosis ha⁻¹ |
|--|------------------------------|
| Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>) | Ridomil Gold 76.5PH 2.5 Kg. |
| Tizón temprano (<i>Alternaria solanil</i>) | Ridomil Gold 76.5PH 2.5 Kg. |
| Mancha bacteriana (<i>Xantomonas sp</i>) | Cupravit ® 2-4 Kg. |

Variables a Evaluar

Variables de Biomasa

Peso fresco de Raíz y Tallos

Se evaluó la biomasa a los 8, 16, 24,32, días después de la germinación (DDG), muestreando 2 plántulas por tratamiento que se seleccionaron de forma aleatoria, iniciando de la primera semana de crecimiento. Separando la parte aérea de la raíz, posteriormente se pesó cada parte en una balanza analítica. Los resultados se expresan en $\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$.

Peso Seco de Raíz y Tallos

Cada parte de las plántulas fueron introducidas a una estufa de secado a una temperatura constante de 60°C por 48 horas y se pesaron en una balanza analítica para obtener el peso seco. Los resultados se expresan en $\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$.

Análisis de Minerales

Los análisis del contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu) se llevaron a cabo en los tejidos vegetativos aéreos (tallo + hojas), en el fruto y en la raíz. Para determinar el N, los tejidos secos se molieron y se pesaron para posteriormente, someterse a digestión ácida con ácido sulfúrico a 200°C . Para evaluar la concentración de N, se usó el método de análisis microkjeldahl. Para los demás minerales, la digestión ácida de los tejidos se llevó a cabo con ácido nítrico y perclórico a la temperatura mencionada. La evaluación del P fue por colorimetría en un fotocolorímetro (Thermo Spectronic, modelo Helios Epsilon). Para los otros elementos, la evaluación se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, modelo AA-1275).

Asimilación de CO_2

Se evaluó la asimilación de CO_2 tomando dos lecturas a los 31,32 y 33 DDG. Con un área foliar de 6 cm^2 , con un equipo (LI-COR, modelo 6400). Tomado dos lecturas por cada tratamiento. Procurando tomar las lecturas con cielo despejado en horas del medio día.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 4.1 se muestran las propiedades de los oligómeros de quitosán aplicados al tomate en condiciones salinas.

Cuadro 4.1 Propiedades de los oligómeros de quitosán obtenidos por hidrólisis enzimática en Planta Piloto (CIQA).

| Oligómero | Concentración de enzima (mg/mL) | PM viscosimétrico | Grado de desacetilación (%) |
|-----------|---------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | 20 | 12,000 | 98 |
| 2 | 40 | 8,000 | 100 |
| 3 | 80 | 5,000 | 100 |

El cálculo del grado de desacetilación se hizo en base a la siguiente ecuación a partir del espectro de IR de cada oligómero midiendo la absorbancia (área) de los picos característicos a 1320 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} según la fórmula de Brunerotto (Figura 4.1).

Ecuación:

$$\% \text{ grado de acetilación} = [31.92 (A_{1320}/A_{1420})] - 12.2$$

$$\% \text{ grado de desacetilación} = 100 - \% \text{ de acetilación}$$

A= absorbancia

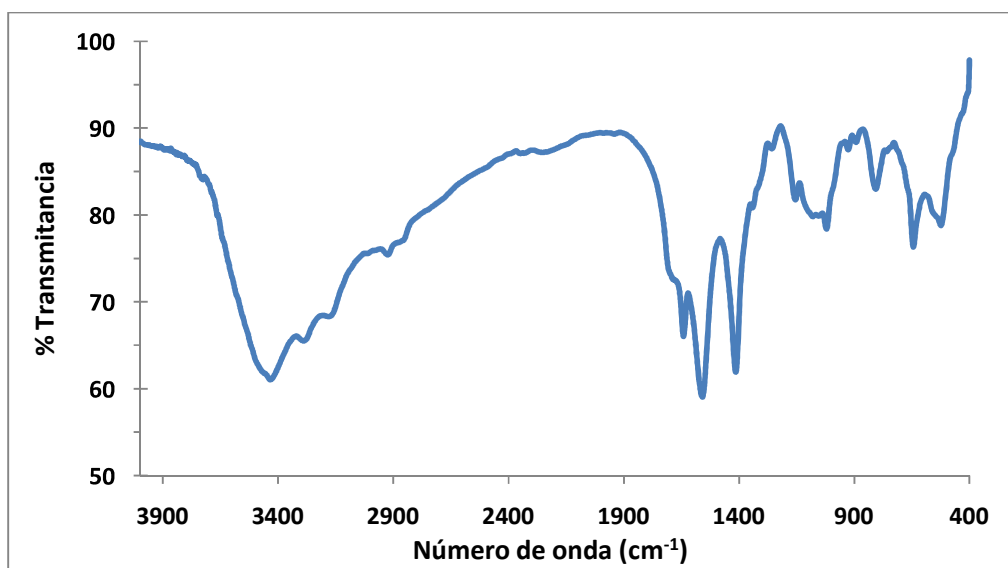


Figura 4.1 Espectro de Infrarrojo del oligómero 1.

Peso Fresco de Tallos de la Aplicación Vía Sustrato

Los resultados del análisis de varianza para peso fresco aéreo no mostraron diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. No obstante, en promedio, el tratamiento con la aplicación del Oligómero 2 y 3 a 75 mM, fue superior frente al testigo; siendo el Oligómero 2 el que presentó con mayor respuesta con mayor peso (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Promedio de los muestreos (a los 7, 14, 21, 28 días después de la germinación) de las variables de biomasa fresca y seca en plántulas de tomate tratadas con oligómeros de quitosán vía sustrato.

| Tratamiento | Peso fresco | | Peso seco | |
|-----------------------|-------------|-------|-----------|-------|
| | Tallos | Raíz | Tallos | Raíz |
| 0 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 43.61a | 8.90a | 4.76a | 1.27a |
| Oligómero 1 | 33.07a | 6.57a | 3.14a | 0.82a |
| Oligómero 2 | 31.25a | 4.55a | 3.14a | 0.57a |
| Oligómero 3 | 9.87 a | 1.77a | 1.05a | 0.31a |
| 75 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 15.09a | 3.43a | 1.38a | 0.39a |
| Oligómero 1 | 18.16a | 3.35a | 1.61a | 0.31a |
| Oligómero 2 | 23.66a | 3.58a | 2.14a | 0.54a |
| Oligómero 3 | 21.22a | 3.82a | 1.98a | 0.45a |
| 150 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 18.43a | 3.71a | 1.93a | 0.42a |
| Oligómero 1 | 19.82a | 3.23a | 2.06a | 0.50a |
| Oligómero 2 | 15.00a | 3.17a | 1.46a | 0.32a |
| Oligómero 3 | 16.53a | 2.99a | 1.71a | 0.34a |
| 300 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 11.51a | 2.14a | 1.17a | 0.23a |
| Oligómero 1 | 10.85a | 2.04a | 1.04a | 0.24a |
| Oligómero 2 | 10.82a | 2.17a | 1.12a | 0.23a |
| Oligómero 3 | 9.87a | 1.77a | 1.05a | 0.31a |

* Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p \leq 0.05$, según Tukey.

Los resultados no coincidieron a los obtenidos por Ortega-Ortiz *et al.*, (2002) con derivados del quitosán, donde la aplicación del complejo de quitosán-poliácido acrílico con PAA de bajo peso molecular (106,000) aumenta un 40% el crecimiento de las plantas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y cebolla (*Allium cepa*) bajo condiciones salinidad alta.

Al evaluar la variable de biomasa total se observó que no hay diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo el resultado más sobresaliente obtenido en este trabajo muestra que la aplicación vía sustrato del oligómero 2 a 75 mM, con peso molecular viscosimétrico (Mv) de 8,000 aumenta el peso fresco en presencia de estrés en comparación con los demás tratamientos incluyendo al testigo, pero sin haber diferencia significativa. (Figura 4.1)

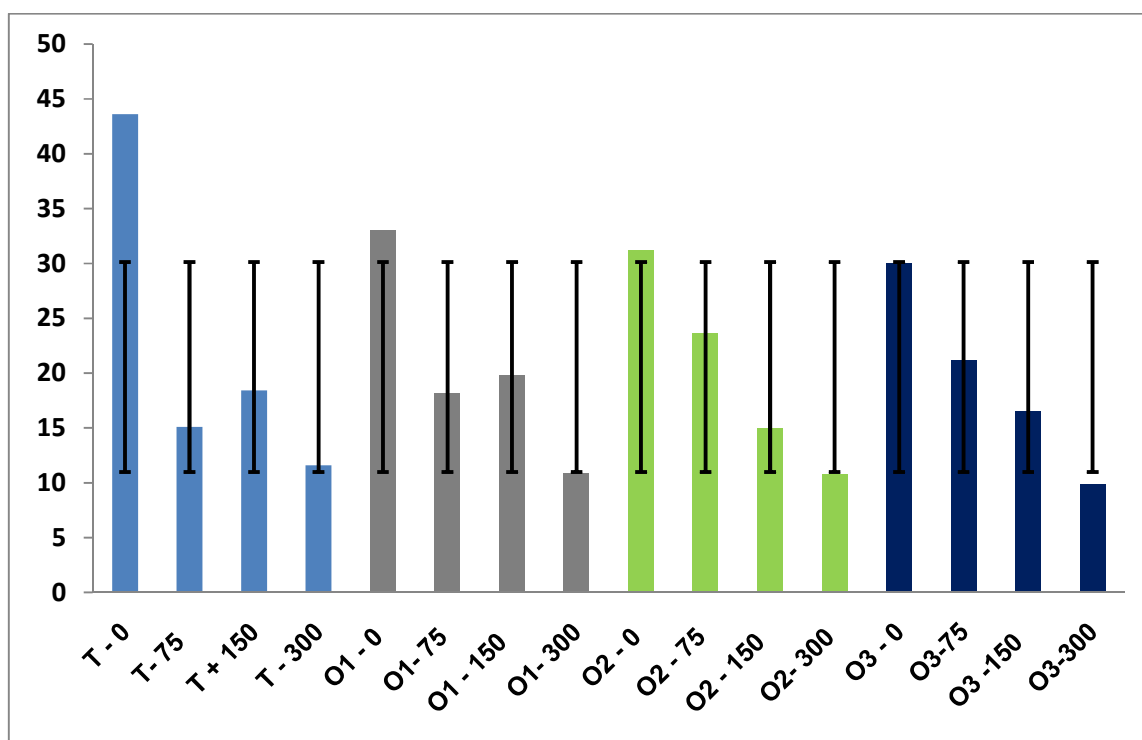


Figura 4.2 Peso fresco de las plántula (g-plant⁻¹) de tomate tratadas con los diferentes oligómeros y a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl aplicadas vía sustrato.

A pesar de ello, es posible que el tamaño del experimento determinara la obtención de un error estándar alto lo que no permitió separar estadísticamente las diferencias entre los promedios dentro de los tratamientos de oligómeros.

La hipótesis del efecto fisiológico de los complejos fue verificada demostrando que en el tomate con la presencia de los complejos de quitosán activan dos de las enzimas antioxidantes (catalasas y peroxidasas) asociadas con la tolerancia al estrés abiótico (Ortega-Ortiz *et al.*, 2007).

Esto define que muchas de las respuestas mencionadas pueden ser dependientes del patrimonio genético particular de la planta, mientras que otras se manifiestan sólo bajo una condición particular inductiva desencadenadas por factores bióticos o abióticos.

Peso Fresco de Tallos de la Aplicación Vía Foliar

Los resultados del análisis de varianza para peso fresco aéreo no mostraron diferencia significativa entre las medias de los tratamientos, existiendo uniformidad entre los pesos de cada tratamiento (Cuadro 4.3)

Cuadro 4.3 Promedio de los muestreos (7,14,21,28 días después de la germinación) de las variables de biomasa fresca y seca en plántulas de tomate tratadas con oligómeros de quitosán vía foliar.

| Tratamiento | Peso fresco | | Peso seco | |
|-----------------------|-------------|-------|-----------|--------|
| | Tallos | Raíz | Tallos | Raíz |
| 0 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 38.54a | 6.84a | 4.88a | 1.27a |
| Oligómero 1 | 39.34a | 5.88a | 4.74a | 0.79a |
| Oligómero 2 | 37.02a | 7.27a | 4.56a | 1.28a |
| Oligómero 3 | 37.96a | 6.89a | 4.65a | 1.12a |
| 75 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 26.14a | 4.91a | 3.37a | 0.64a |
| Oligómero 1 | 24.28a | 4.69a | 3.31a | 0.56a |
| Oligómero 2 | 20.46a | 4.37a | 3.12a | 0.56a |
| Oligómero 3 | 26.38a | 4.19a | 3.43a | 0.55a |
| 150 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 21.73a | 4.10a | 3.08a | 0.50a |
| Oligómero 1 | 17.09a | 3.33a | 2.60a | 0.33a |
| Oligómero 2 | 19.44a | 3.17a | 2.63a | 0.39a |
| Oligómero 3 | 18.99a | 3.19a | 3.05a | 0.416a |
| 300 mM de NaCl | | | | |
| Testigo | 10.43a | 2.39a | 2.06a | 0.35a |
| Oligómero 1 | 10.40a | 2.21a | 2.09a | 0.24a |
| Oligómero 2 | 8.47a | 1.98a | 1.93a | 0.24a |
| Oligómero 3 | 10.97a | 1.56a | 2.59a | 0.23a |

*Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p \leq 0.05$, según Tukey.

Las plantas de todos los tratamientos tuvieron un peso similar aun en presencia de estrés, esto es contrario a los trabajos realizados por (Benavides-Mendoza *et al.*, 2001). La aplicación foliar de quitosano en ácido acético aumenta la biomasa de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) donde se observó el efecto del quitosano sobre el crecimiento y la adaptación postrasplante de la lechuga.

Basado en observaciones diarias del crecimiento de las plántulas, se determinó que las plantas sometidas a la aplicación de los oligómeros de quitosán vía sustrato detienen el crecimiento en comparación con los aplicados vía foliar, sin embargo independiente a la forma de aplicación, el crecimiento es semejante siendo los testigos con un mayor aumento en el desarrollo y disminuye al aumentar la concentración de NaCl (Figura 4.2).

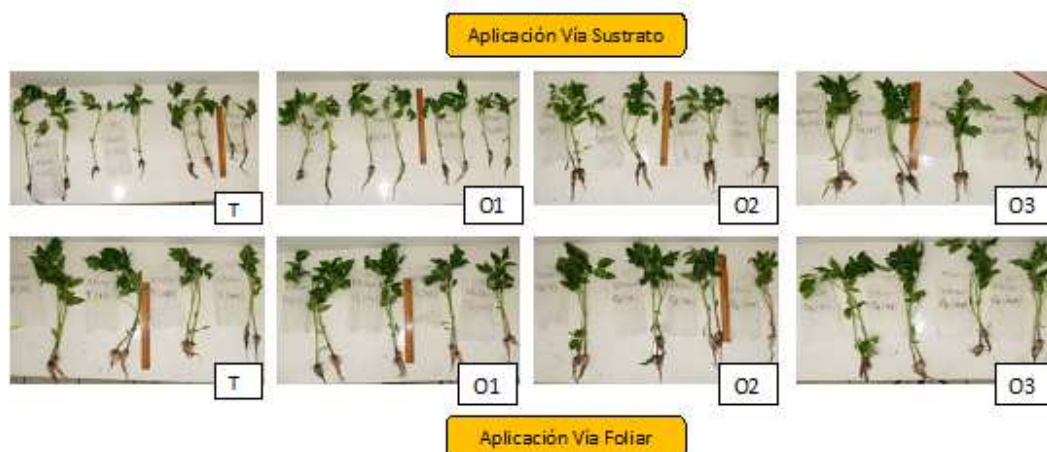


Figura 4.3 Fotografías del crecimiento durante los primeros días después de las aplicaciones.

Uno de los efectos inhibidores fenólicos y terpelactónicos mencionados por Rojas Garcidueñas y Ramírez Rodríguez (1987), menciona que los compuestos terpelactónicos, a su vez, provienen del ácido acético y se constituyen por unidades isoprénicas (C_5H_8). El estudio de estos inhibidores es muy interesante por su acción fisiológica cuando se aplica de forma exógena. El locus de acción de los inhibidores de los grupos terpelactónicos son las enzimas respiratorias que oxidan el sustrato a través de su grupo SH; a las cuales bloquean o inactivan.

Esto puede deberse a que el quitosán puede disolverse en diferentes ácidos débiles como el cítrico, láctico, etc. y principalmente el ácido acético; por lo cual es necesario, continuar con los estudios sobre la aplicación de quitosán, considerando el efecto específico de cada compuesto que se utilizan como solvente y los efectos sobre el crecimiento de las plantas.

El peso fresco total vía foliar que se determino a las plántulas de tomate se puede observar en la (Figura 4.3), donde se aprecia un comportamiento similar en el peso fresco, ya que no fue determinar una diferencia estadística entre el comportamiento de los tratamientos con los oligómeros de diferentes pesos moleculares ni entre los tratamientos donde sólo se aplicó la sal.

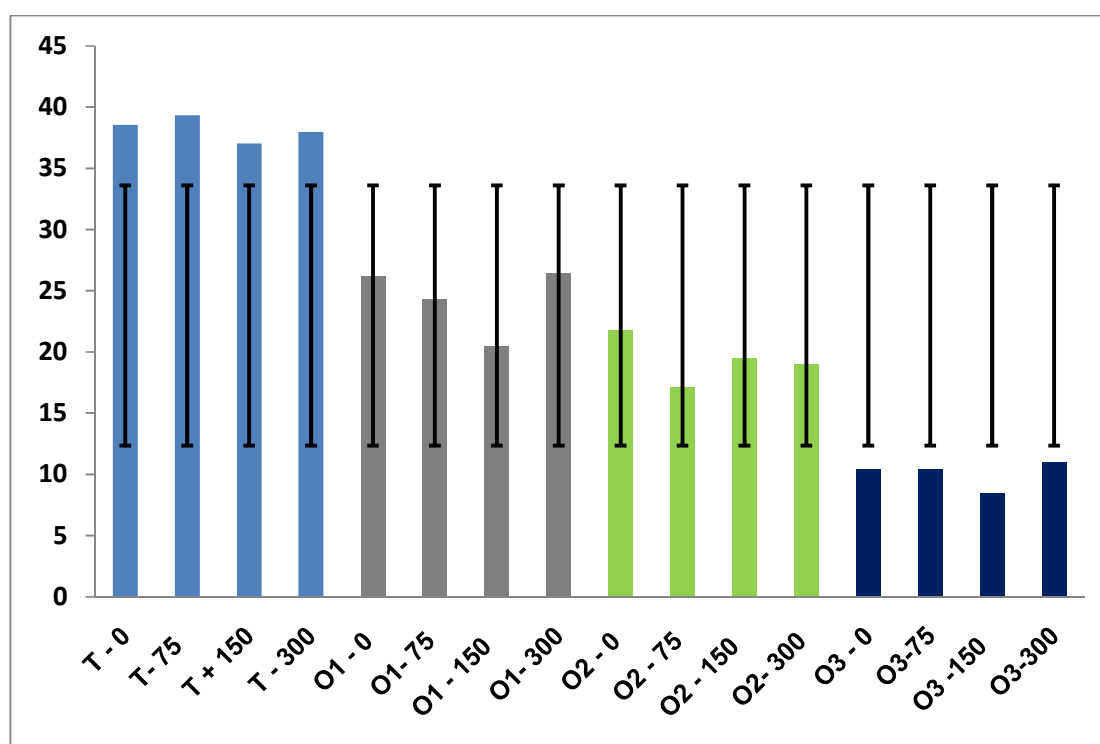


Figura 4.4 Peso fresco de las plántula (g.planta⁻¹) de tomate tratadas con los diferentes oligómeros y sus deferentes concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl aplicadas vía foliar.

El número de hojas de las plántulas disminuyó con el aumento de la salinidad al aplicar la sal vía foliar. También se observa clorosis, necrosis, disminución de la densidad estomática en la cara adaxial y simultáneamente un aumento en la cara abaxial, aumento de la clorofila e incremento de actividad de la enzima peroxidasa según reportan Romero-Aranda *et al.* (2001).

Esta puede ser una de las explicaciones de cualquier daño en el área foliar y la disminución de la densidad estomática reduce los procesos fisiológicos dentro de la planta como respiración donde los niveles de asimilación de CO₂ se reducen por los efectos de las altas concentraciones de sodio lo que significa una disminución en los procesos fisiológicos.

Debido que existen diferencia entre los tratamientos con aplicaciones vía sustrato y vía foliar, puede aclarar que la aplicación exógena de inductores de resistencia varía en cuanto forma de aplicación, peso molecular, síntesis etc. Así como también en las diferentes especies vegetales. Esto puede deducir que las respuestas adaptativas dependen de la acción de los señalizadores que interaccionan con los receptores.

Absorción y Analisis de Minerales

En los análisis de asimilación de Ca y K, se muestran diferentes niveles de asimilación que pudieran no corresponder al tratamiento pero puede explicarse que los tratamientos estuvieron expuestos a diferentes oligómeros, forma de aplicación y diferentes concentraciones de NaCl. Esto excluye las propiedades de los oligómeros de quitosán como efecto quelante puesto que no estuvieron en contacto con las soluciones nutritivas.

En la Figura 4.4 se puede observar que la asimilación de Ca entre los tratamientos testigos con respecto a los tratamientos del oligómero 3 los tratamientos son muy similares, esto puede explicarse que el oligómero 3 es de peso molecular bajo, comportándose como si fuesen solo soluciones salinas, mostrando que la concentración de 75 mM es la más aceptable para la asimilación de Ca. Siendo en promedio el oligómero 2 con mayor asimilación que el testigo.

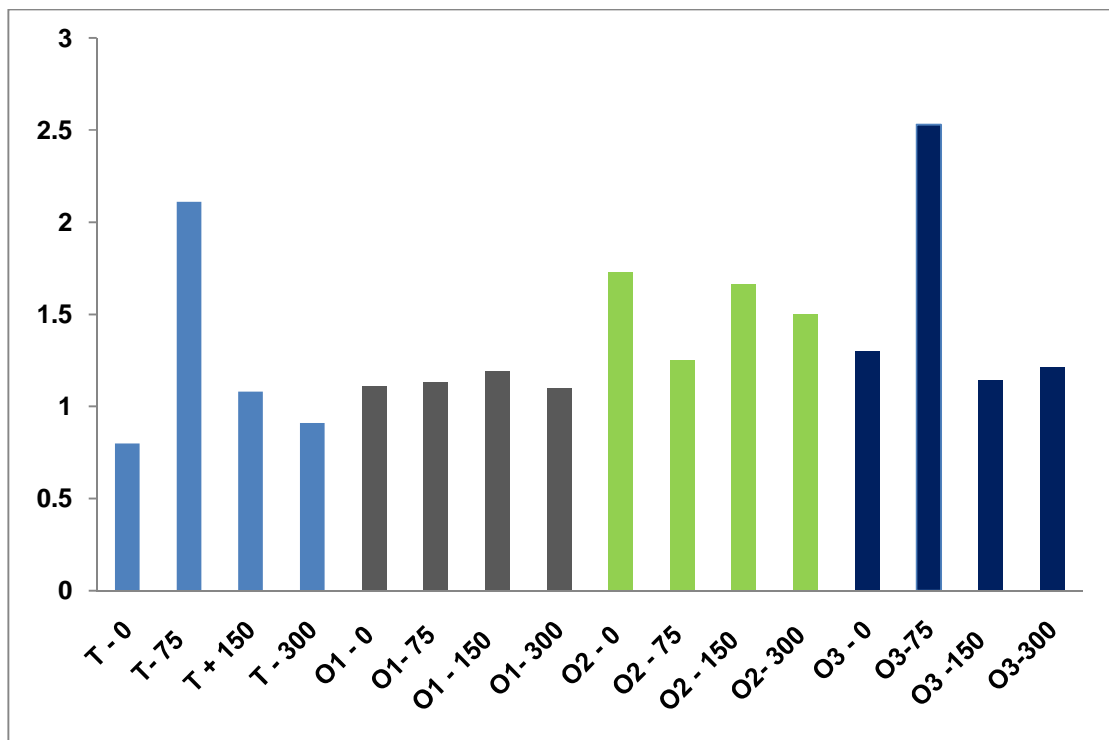


Figura 4.5 Comparación de la acumulación total de Ca (mg/Kg) con los diferentes oligómeros a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl en vía sustrato.

En las aplicaciones de de forma foliar las asimilaciones de Ca en promedio son menores que las de la forma vía sustrato esto puede deberse a los propiedades por estar en contactos directos con las raíces proporcionan una mayor protección así mismo una mayor asimilación de nutrientes. Demostrando que el tratamiento testigo y oligómeros 1 y 2 con 75 mM existe mayor asimilación de Ca pudiéndose deber a que es la máxima concentración para la asimilación de nutrientes (Figura 4.5).

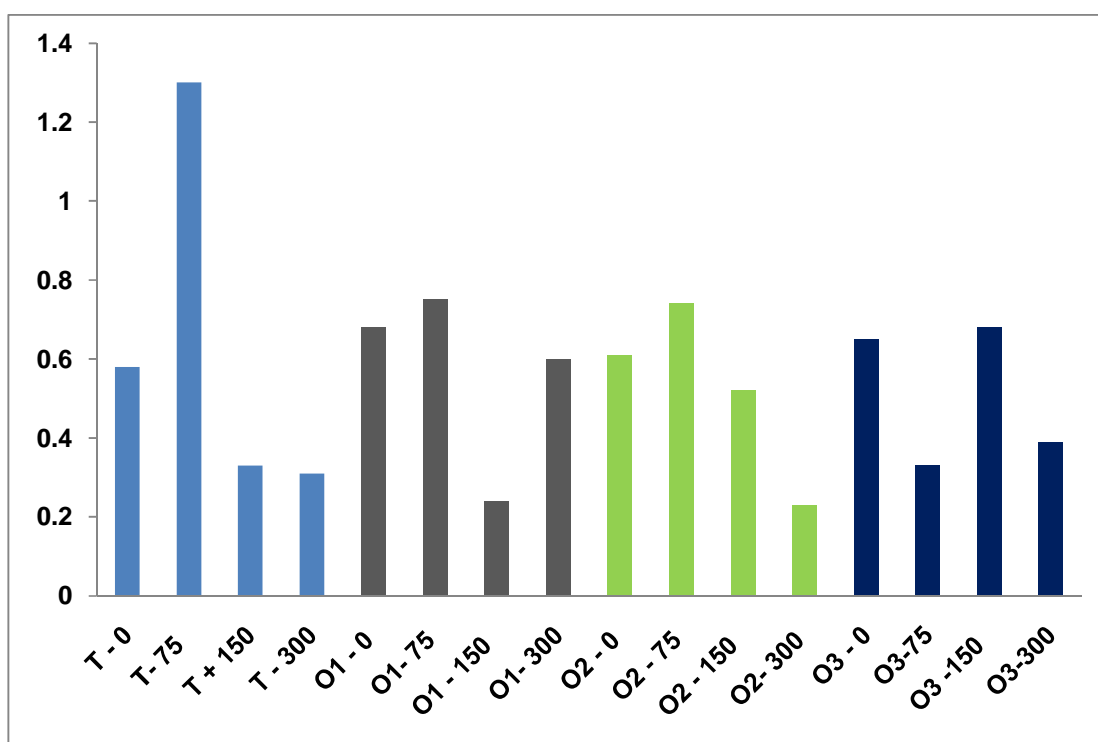


Figura 4.6 Comparación de la acumulación total de Ca (mg/Kg) con los diferentes oligómeros aplicados vía foliar a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl.

En la asimilación de potasio de las aplicaciones vía sustrato no hay una diferencia en ninguno de los tratamientos manteniendo una similar concentración en todos los tratamientos sobresaliendo el O1- 75 con mayor concentración, sin embargo también indica que los efectos negativos del NaCl sobre el potasio son mayores que en las concentraciones de Calcio, esto puede deberse a su forma química de asimilación de cada uno de los elementos preferidos por la planta o por el bloqueo del sodio por las diferentes concentraciones también no se descarta por la interacción de los oligómeros con los nutrientes (figura 4.6).

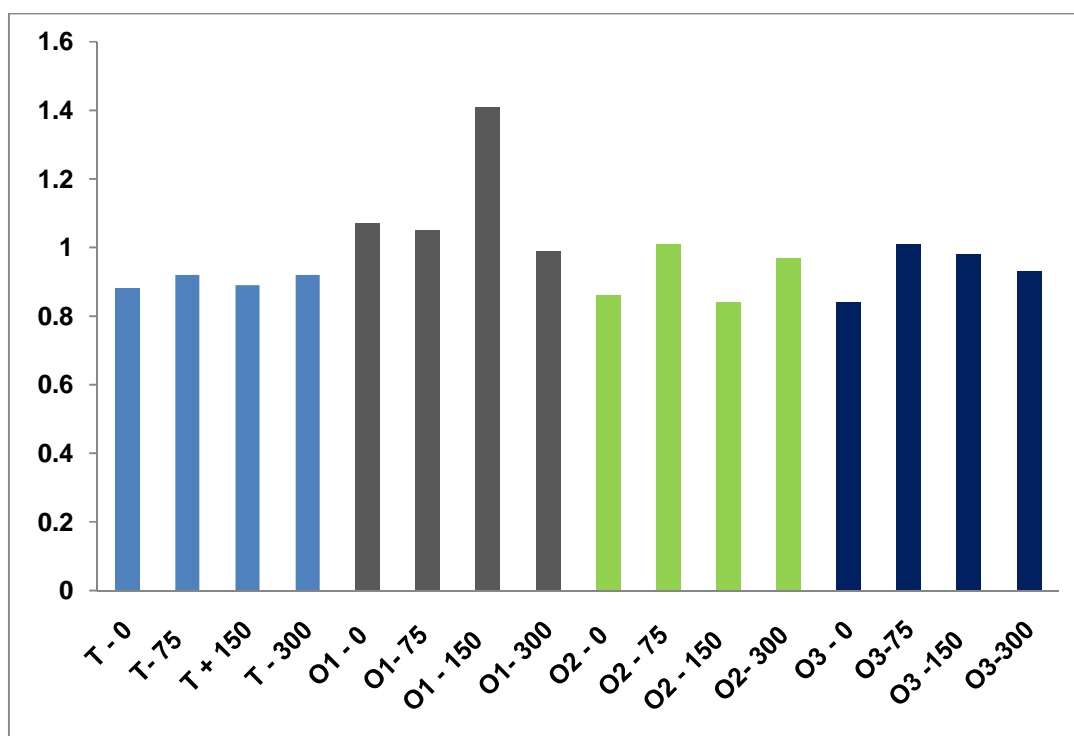


Figura 4.7 Comparación de la acumulación total de K (mg/Kg) al aplicar los oligómeros de quitosán vía sustrato en plántulas de tomate con diferentes concentraciones de NaCl 0, 75, 150, 300.

Los niveles de concentración de potasio en los tratamientos de vía foliar no corresponde con lo esperado; que a manera que aumenta las concentraciones de sodio menores serán las asimilaciones de potasio, pero demostrando que los niveles de asimilación son bajos. Sin embargo se puede comparar con los tratamientos en los que se aplicaron los oligómeros a través de la vía sustrato demuestra que hay una mayor estabilidad o equilibrio en los niveles de asimilación que puede atribuirse a las propiedades de los diferentes oligómeros (Figura 4.7).

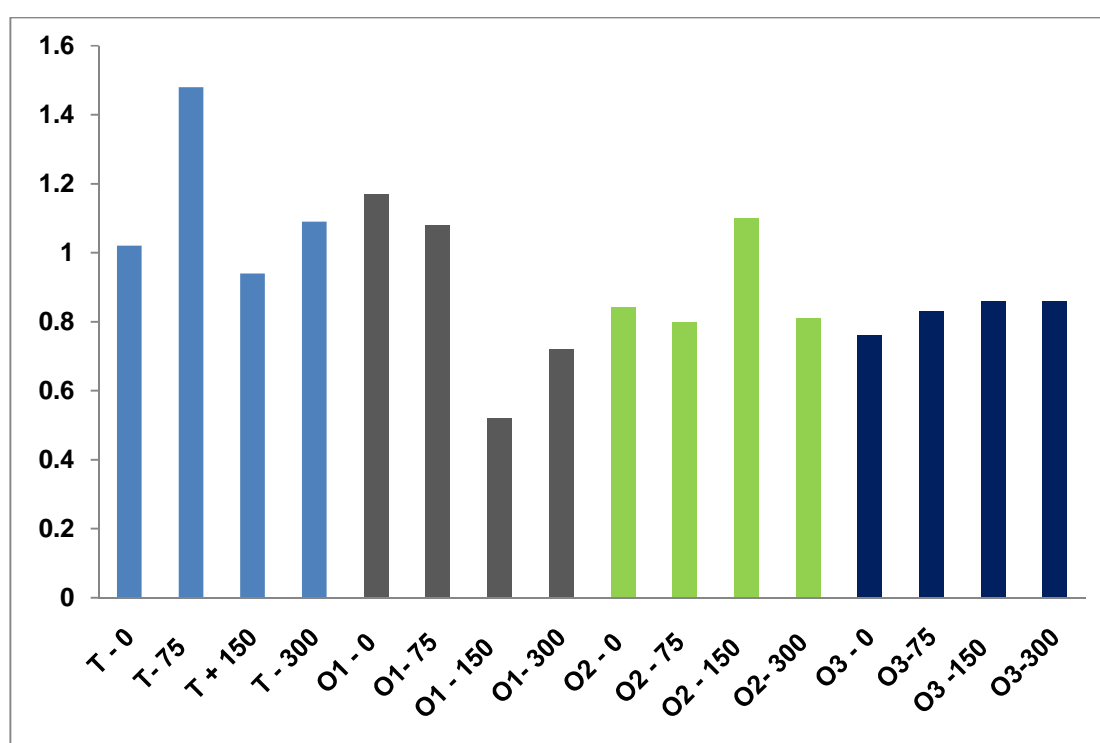


Figura 4.8 Comparación de la acumulación total de K (mg/Kg) al aplicar los oligómeros de quitosán vía foliar en plántulas de tomate con diferentes concentraciones de NaCl 0, 75, 150, 300.

En los análisis de asimilación de sodio por las plántulas de tomate demuestran una congruencia en todos los tratamientos demostrando lo esperado; a medida que aumentan las concentraciones de NaCl en soluciones aumenta las concentraciones en los tejidos de las plántulas de cada tratamiento. Los oligómeros demuestran un efecto importante en las aplicaciones vía sustrato conforme disminuye los pesos moleculares de cada oligómero O1, O2, O3, se incrementan las concentraciones de sodio en los tejidos, esto puede concluir que los tratamientos del O1 resultan una mayor protección contra los niveles de de concentración de Na en las plántulas y conforme disminuye el peso aumenta las concentraciones de Na.

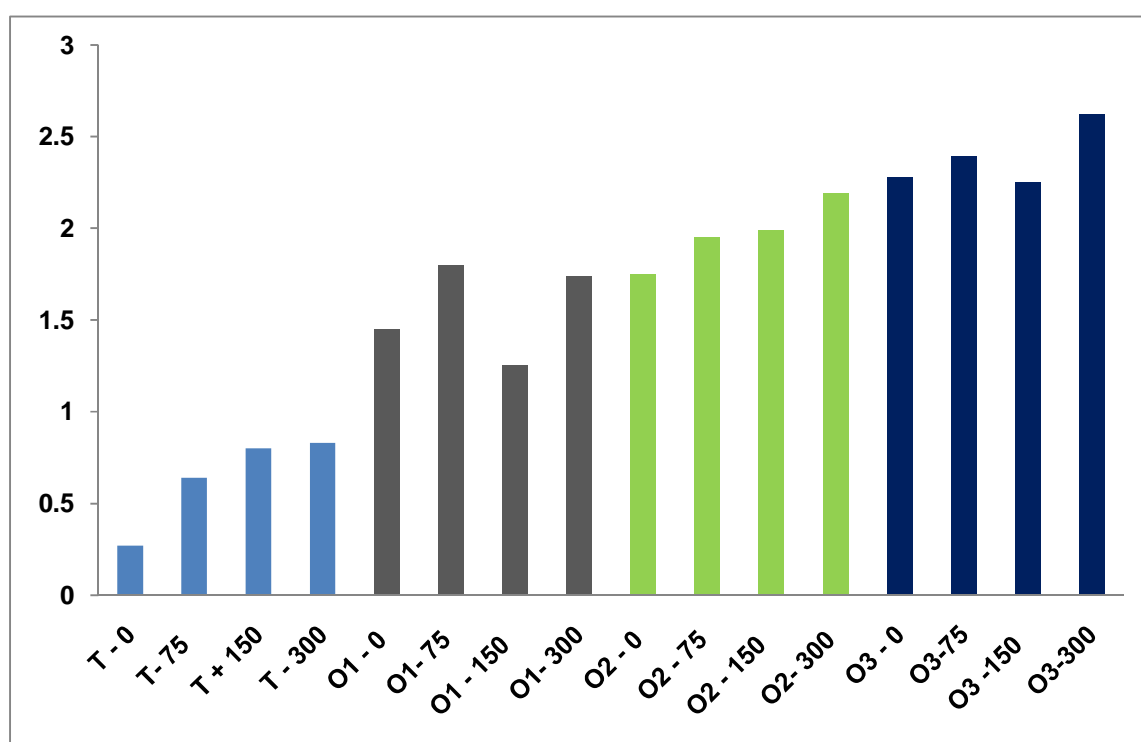


Figura 4.9 Comparación de la acumulación total de Na (mg/Kg) con los diferentes oligómeros a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl aplicados vía sustrato.

Una vez más en los resultados de los tratamientos que fueron expuesto a aplicaciones de los oligómeros vía foliar es semejante a la aplicación vía sustrato, demostrando las misma tendencia a medida que aumentan las concentraciones de NaCl aumentan en los tejidos pero sin que haya una diferencia significativa, también a medida que disminuyen los pesos moleculares de los oligómeros ($O3 < O2 < O1$), aumentan las concentraciones de sodio en los tejidos de las plántulas.

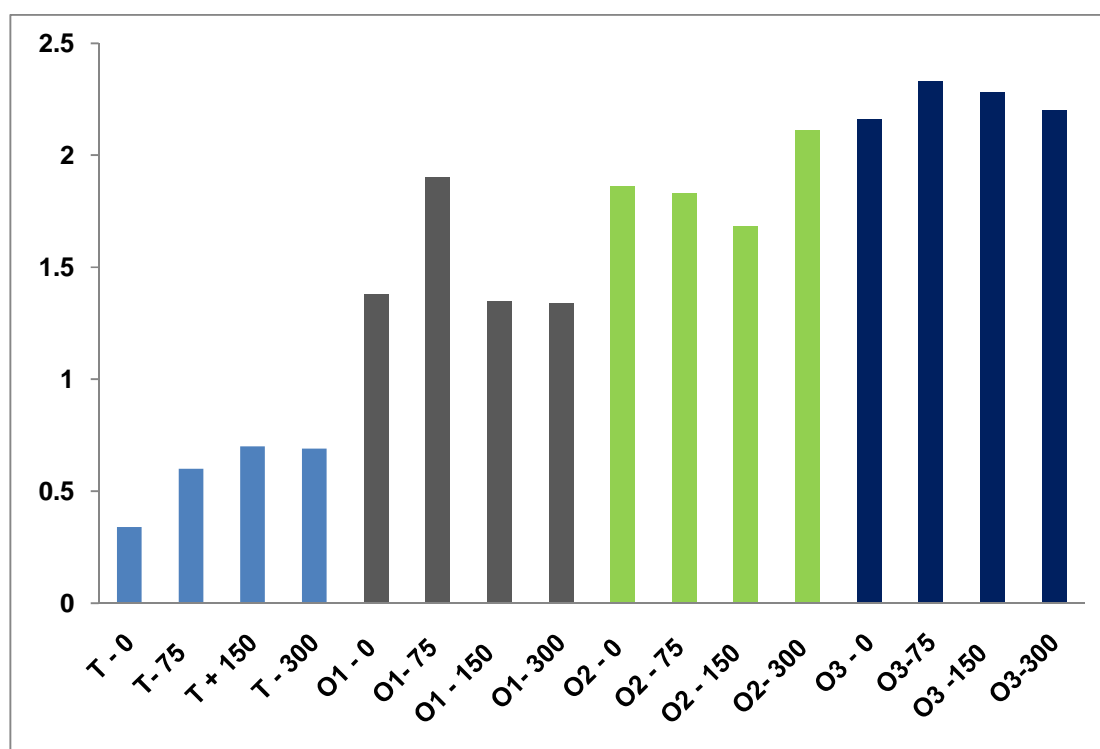


Figura 4.10 Comparación de la acumulación total de Na (mg/Kg) con los diferentes oligómeros aplicados vía foliar a las concentraciones de 0, 75, 150 y 300 mM de NaCl.

Altas concentraciones de Na^+ en la solución externa causan una disminución en las concentraciones de K^+ y Ca^{2+} en los tejidos de las plantas. Estas reducciones se pueden deber al antagonismo del Na^+ y K^+ por los sitios de absorción en las raíces, el efecto del Na^+ en el transporte al xilema o a la inhibición de los procesos de absorción (Hu y Schimdhalter, 2005). Esto también puede deberse a que el sodio en la solución bloquea los cationes impidiendo su asimilación adecuadamente por las plántulas.

En los análisis de asimilación de calcio Ca^{2+} y potasio K^+ muestran diferentes niveles de asimilación que pudieran no corresponder a los tratamientos, pero puede explicarse que los tratamientos estuvieron expuestos a diferentes pesos moleculares de los oligómeros, forma de aplicación y diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

Sin embargo al comparar los niveles de sodio en las aplicaciones vía sustrato y foliar la tendencia es semejante a medida que aumentan las concentraciones de NaCl , en las soluciones nutritivas, aumentan los niveles de sodio Na en los análisis de minerales de los tratamientos.

En las aplicaciones vía sustrato y foliar de NaCl , respectivamente; se puede observar que cuando son aplicados los oligómeros de quitosán la asimilación de sodio aumenta (más efectiva), además de que con la disminución del peso molecular del oligómero aplicado ($\text{O3} < \text{O2} < \text{O1}$) aumenta la concentración de sodio que es asimilado por las plántulas de tomate.

Asimilación de CO₂

Los tratamientos expuestos a diferentes concentraciones de sodio aplicados vía sustrato reducen los procesos fisiológicos causados por el estrés salino (ver Figuras 4.10 y 4.11). No pudiéndose apreciar un efecto positivo al aplicar los oligómeros siendo el grupo de los testigos superior a los demás tratamientos.

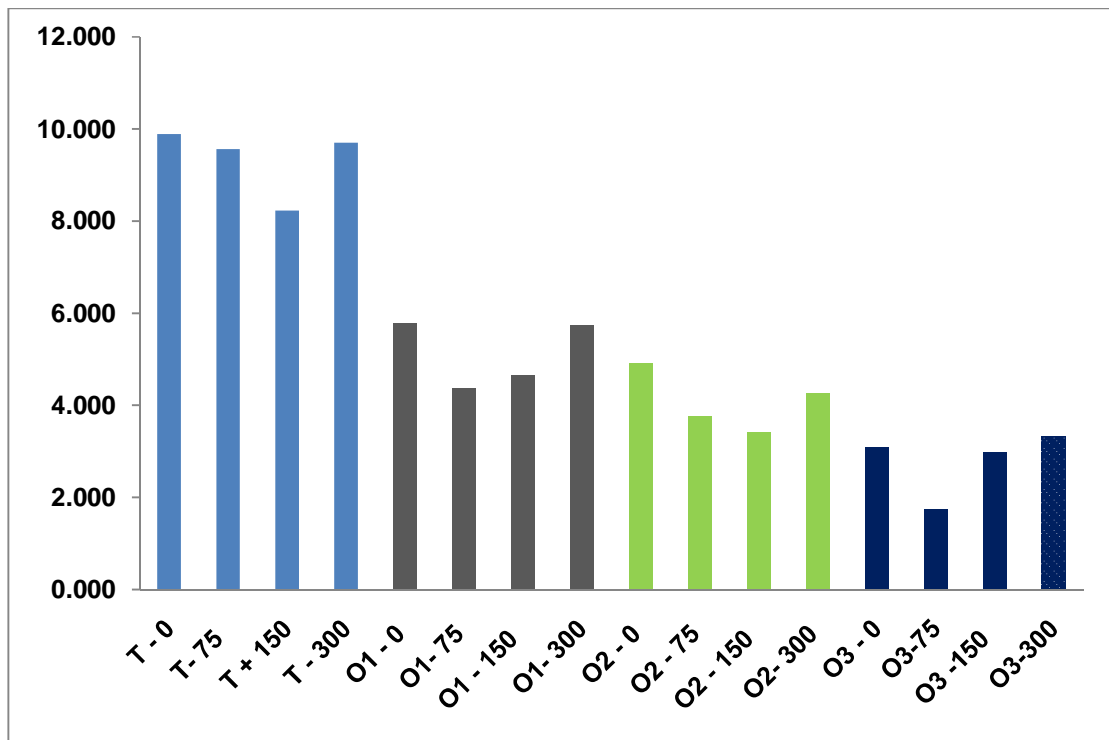


Figura 4.11 Niveles de asimilación de CO₂ en los tratamientos vía sustrato a los 21, 22 y 23 días DDG expresados en μmol (CO₂)/m²/seg⁻¹.

Los niveles de asimilación de CO₂ en los tratamientos vía foliar es ligeramente superior a los que fueron sometidos a la aplicación vía sustrato (Figura 4.11); apreciándose en este caso una mayor asimilación de CO₂ cuando el peso molecular de los oligómeros es mayor O-1 pero sin ser mejor que el testigo.

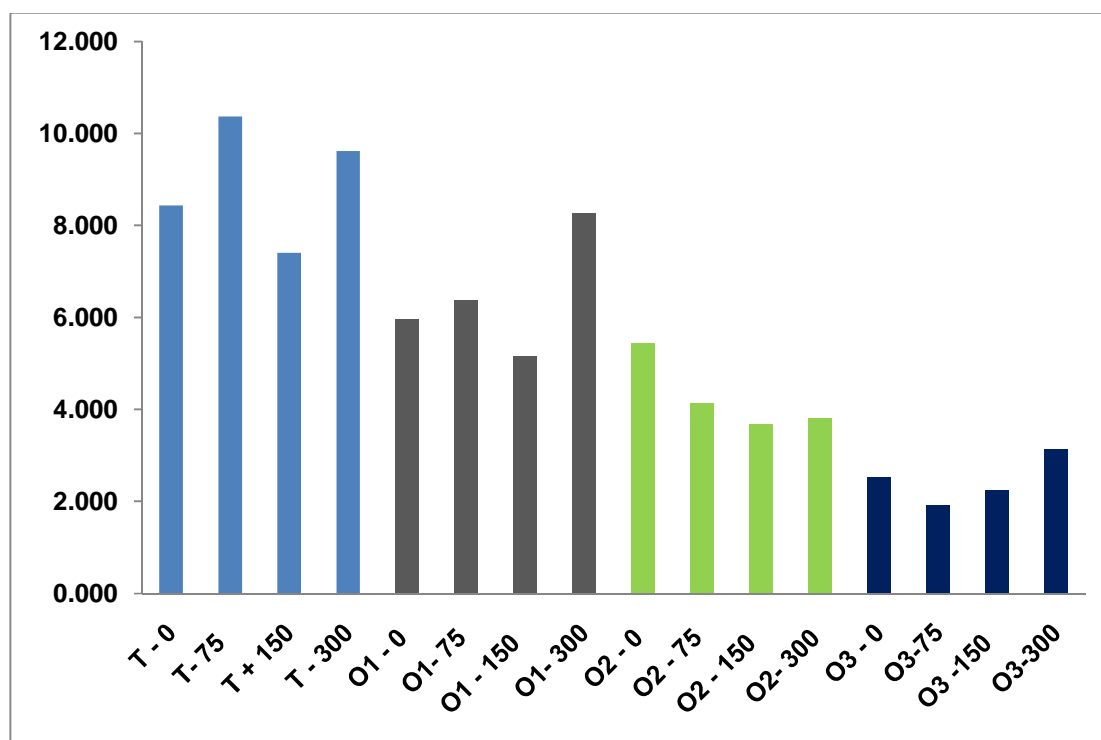


Figura 4.11 Niveles de asimilación de CO₂ en los tratamientos aplicados por vía foliar a los 21, 22 y 23 días DDG expresados en μmol (CO₂)/m²/seg⁻¹.

VI. CONCLUSIONES

- No fue posible determinar una diferencia significativa entre el peso molecular de los oligómeros del quitosán y su efectividad como promotores de diferentes actividades de crecimiento y desarrollo bajo estrés salino.
- A nivel Planta Piloto fue posible la obtención de oligómeros de quitosán de bajo peso molecular por vía enzimática a partir de quitosán comercial de peso molecular alto con un grado de desacetilación cercano al 100%.
- El peso molecular no fue una determinante significativa en los resultados sin embargo el oligómero 2 con la concentración más baja de sales demostró un mayor efecto positivo en las aplicaciones vía sustrato.
- Los resultados obtenidos indican la factibilidad de uso de los oligómeros de quitosán en el manejo agronómico de cultivos. Se requiere, sin embargo, realizar gran cantidad de estudios para verificar la viabilidad de su aplicación en los cultivos en México.

I. BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, S.; Muraiki, E. 1998. Preparation of higher *N*-acetylchitooligosaccharides in high yields. Proceeding of the Third Asia-Pacific chitin and chitosan Symposium. Feelung, Taiwán. pp. 89-96.
- Al-karaki, G. N. 2000. Growth, sodium, and potassium uptake and translocation in salt stressed tomato. *J. Plant-Nutr. Monticello*, N.Y. Marcel Dekker Inc. 23 (3):369-379.
- Al-karaki, G. N.; Hammad, R. 2001. Mycorrhizal influence on fruit yield and mineral content of tomato grown under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 24 (8):1311-1323.
- Almasoum, A. A. 2000. Effect of planting depth on growth and productivity of tomatoes using drip irrigation with semi saline water. *Acta Hort.* 537: 773-778.
- Benavides-Mendoza, A. "Ecofisiología y química del estrés en plantas", Departamento de agricultura/UAAAN, 2002.
- Benavides-Mendoza, A., J. Romero-García, A. S. Ledesma-Pérez, J. M. Raygoza-Castro. 2001. La aplicación foliar de quitosano en ácido acético aumenta la biomasa de la lechuga. *Biotam Nueva Serie* 12(3):1-6.
- Benavides-Mendoza, A.; Burgos-Limón, D.; Ortega-Ortiz, H.; Ramírez 2007. H. El ácido benzoico y poliácido acrílico-quitosán en la calidad y el rendimiento del tomate cultivado en suelo calcáreo. *Terra Latinoamericana*, Vol. 25(3), 1-8.
- Benavides-Mendoza, H. Ortega-Ortiz, H. Ramírez, R. K. Maiti 2004. Use of interpolyelectrolyte complexes of poly (acrylic acid)-chitosan as inducers of tolerance against stress in horticultural crops. *Crop Research*, 28 (1).
- Cauhie, H. M., Advances in Chitin Science, Vol. II, Domard A., Roberts G.A.F. and Varum, K.M., Jacques André Publisher, Lyon, 32, 1998.
- Chinnusamy, Viswanathan; Jagendorf, André; Cucci, G.; Cantore, V.; Boari, F.; de Caro, A. 2000. Water salinity and influence of SAR on yield and quality parameters in tomato. *Acta Hort.* 537: 663-670.
- Cornejo-Oviedo, E.: 2002 "Factores ambientales que originan el estrés. Ecofisiología y química del estrés en plantas", Departamento de agricultura/UAAAN,.
- Crini, G. 2005. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science* 30, 38-70.
- Del amor, F. M.; Martínez, V.; Cerda, A. 2001. Salt tolerance of tomato plants as affected by stage of plant development. *HortScience*, 36(7): 1260-1263.
- Del Rosario, D. A.; Sumague, A. C.; Roxas, V. P.; Bautista, T. S. 1990. Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) to salt stress. *The Philippine agriculturist*, 73 (2): 193-198. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo
- Dubery, I.A., L.G. Teodorczuk, A.E. Louw. 2000. Early responses in methyl jasmonate-preconditioned cells toward pathogen-derived elicitors. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:105-110.

- Dubery, I. A., L.G. Teodorczuk, A. E. Louw. 2000. Early responses in methyl jasmonate-preconditioned cells toward pathogen-derived elicitors. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:105-110.
- Flowers, T.J.: "Physiology of halophytes", *Plant Soil*, 89 (1985), pp.41-56.
- Fry, S. C., S. Aldington, P. R. Hetherington, and J. Aitken. 1993. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.* 103:1-5.
- Fry, S.C., S. Aldington, P.R. Hetherington, and J. Aitken. 1993. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.* 103:1-5.
- Fukusaki, E., Ta Watanabe, Te Watanabe, S. Kajiyama, A. Kobayashi. 1998. Expression analysis of a gene family in French bean (*Phaseolus vulgaris*) induced by carbohydrate elicitor.
- Glasser, W. 1997. Preparation of N-acylglucosamine polymers from chitosan for chitin fibers and filaments. Canada Pat CA2172232.
- Guichard, Soraya; Bertin, Nadia; Leonardi, Cherubino; Gary, Christian. 2001. Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie.*21: 385-392.
- Larcher, W.: *Physiological Plant Ecology*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1995, p. 506.
- Lárez, Cristóbal. "Algunas potencialidades de la quitina y el quitosán para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica". UDO Agrícola, 19 de Noviembre 2008 pág 1-22. Venezuela.
- Lee, S., H. Choi, S. Suh, I.-S. Doo, K.-Y. Oh, E.J. Choi, A.T. Schroeder-Taylor, P.S. Low, Y. Lee. 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.* 121:147-152.
- Lee, S. H. Choi, S. Suh, I.-S. Doo, K.-Y. Oh, E.J. Choi, A.T. Schroeder Taylor, P.S. Low, Y. Lee. 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.* 121:147-152.
- Leonardi, M. M.; Giussrida, S.; Fogliano, V.; Pernice, R. 2004. Tomato fruit quality in relation to the content of sodium chloride in the nutrient solutions. Università di Napoli. Italy. p7.
- López-mv; Satti Sme. 1996. Calcium and potassium enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress. *Plant-Science-Limerick.* 114 (1):19-27.
- Maggio, A.; Fogliano, V.; Ambrosino, P.; Ritieni, A.; de Pascale, S. 2001. Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.*76 (4): 447-453.
- Munemasa, S., Oda, K.; Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., and Murata, Y. 2007. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol* 143, 1398-1407.

- Munns, R.; Husain, S.; Rivelli, A. R.; James, R.A.; Condon, A. G.; Lindsay, M. P.; Lagudah, E.S.; Schahtman, D. P.; Hare, R. A. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil*. 247(1): 93-105.
- Munns, Rana; Goyal, Sham S.; Passioura, JOHN.2005. Salinity stress and its mitigation. University of California, Davis. 19 p.
- Munns, Rana; 2005. Genes and salt tolerance: ringing them together. *New Phytologist*. 167 (3): 645-660.
- Muzzarelli, R. A. A. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. En: *Chitin*. Pergamon Press, Oxford University pp.164-167.
- Nichols-MA; Fadallan-EF; Fisher-KJ; Morganlm;Gerasopoulos-D (ED.); Olympios-CH (ED.); Passam-H. 1995. The effect of osmotic stress on the yield and quality of tomatoes. *Acta-Horticulturae*.379: 105-111.
- No, H.K. and S.P. Meyers. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan a review. *J. Aquatic Food Product Tech*. 4:27-52.
- Ohta, K. A. Taniguchi, N. Konishi, and T. Hosoki. 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience* 34:233-234.
- Onsoyen, E. and O. Skaugrud. 1990. Metal recovery using chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 49:395-404.
- Orozco-Cárdenas, M. and C.A. Ryan. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6553-6557.
- Ortega-Ortiz, H., A. Benavides-Mendoza, A. Flores-Olivas, A. Ledezma-Pérez, Use of the Interpolyelectrolyte Complexes of Poly(acrylic acid)-Chitosan as Inductors of Tolerance Against Phatogenic Fungi in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Floradade), *Macromol. Biosci.*, v 3, 566-570, 2003.Ortega-Ortiz, H., A.
- Benavides-Mendoza, S. Alonso-Corona, 2002. “Uso de los complejos interpolielectrolíticos de poliácido acrílico-quitosán como inductoresde tolerancia al estrés en hortalizas”, II Simposio Iberoamericano de Quitina y Quitosán (II SIAQ), Acapulco, México, 10-15 de Noviembre de
- Ortega-Ortiz, H.; A. Benavides-Mendoza, H. Ramírez, R. Mendoza-Villareal, J. Hernández-Dávila, V. Robledo-Torres, “Respuesta morfológica y bioquímica del *Agave tequilana* (Weber) a la fertilización con diferentes balances Na/K y aplicación de inductores de tolerancia”, Memorias de la XV Semana Internacional de Agronomía, Septiembre de 2003, ISBN: 968-64-04-66-X.
- Ortega-Ortiz, H.; Benavides-Mendoza, A.; Mendoza-Villarreal, R; Ramírez-Rodríguez, De Alba Romenus, 2007. Enzymatic Activity in Tomato Fruits as a Response to Chemical Elicitors, *J. Mex. Chem. Soc.*, Vol. 51(3), 141-144.

- Ortega-Ortiz, H.; Gutiérrez-Rodríguez, B.; Barrera-Aguilar, E. "Optimización de los Parámetros Cinéticos de la Hidrólisis Enzimática de Quitosano Mediante un Complejo Enzimático Celulolítico", XIII congreso de nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Acapulco, Guerrero. 21-26 de Junio de 2009.
- Pastori, G. M. and C. H. Foyer. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129:460-468.
- Pérez-Alfocea-F; Balibrea-me; Santa-Cruz-A; Estan-MT. 1996. Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant-and-Soil.* 180 (2): 251-257.
- Pérez-Alfocea-F; Estan-MT; Santa-Cruz-A; Bolarin-MC. 1993. Effects of salinity on nitrate, total nitrogen, soluble protein and free amino acid levels in tomato plants. *Journal-of-Horticultural-Science.* 68 (6):1021-1027.
- Rathke T. D., S. M. Hudson. 1994. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *Rev. Makromol. Chem. Phys.* 34C (3): 375.
- Rayón, E., S. Alonso, D. Ramírez, H. Ortega, H. Ramírez, A. Benavides, J. Romero. 2001. Aplicación de un complejo de poliácido acrílico y quitosán para modificar las respuestas al estrés de plantas. Memorias del Primer Congreso Estudiantil de Polímeros y Especialidades Químicas Relacionadas. Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, México del 1 al 5 de octubre del 2001
- Rick, C. M. 1982. The potential of exotic germplasm for tomato improvement. *Plant improvement and somatic cell genetics.* p. 1-28.
- Rojas Garcidueñas Manuel y Ramírez Rodríguez. Control Hormonal del Desarrollo de las Platas. México DF. LIMUSA. 1987.
- Roller, S., and N. Covill. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 47:67-77.
- Romero-Aranda, R.; Soria, T.; Cuartero, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science.* 160: 265-272.
- Roughan, P.G., R. Holland, and C.R. Slack. 1979. Acetate is the preferred substrate for long-chain fatty acid synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Biochem. J.* 184:565-569.
- Rupley, J. A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrate for lysozyme; *Biochimica et Biophysica Acta*, 83, pags. 245 – 255.
- Ryals, J.S. Uknes, and E. Ward. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104:1109-1112.
- Saitó,H. and R. Tabet. 1987. Resolution Solid-State ¹³C NMR Study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent ¹³C chemical shifts. *Macromolecules* 20: 2424.

- Salvador, L., S.P. Miranda, N. Aragón y V. Lara. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 43:18-23.
- Sang-Hoon Lim and Samuel M. Hudson, 2003. Review and Its Derivatives as Antimicrobial Agents and Their Uses as Textile Chemicals, *J. of Macromol. Sci. Part C*, Vol. C43 (2), 223-269.
- Serio, Francesco; de Gara, Laura; Caretto, Sofia; Leo Lucía; Santamaría, Pietro. 2004. Influence of an increased NaCl concentration on yield and quality of cherry tomato grown in posidona (*Posidonia oceanica* (L) Delile). 14: 1885-1890.
- Shahidi, F., Arachchi, V. J. K., Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 32-51, 1999.
- Shahidi, F., Kamil, J., Arachchi, V. y Jeon, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Food Sci. Technol.* 10:37-51.
- Shannon, M. C.; Grieve, C. M. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*. 78: 5-38.
- Sugimoto K. 1999. Preparation and characterization of chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers* 36: 49-59.
- Szabolcs I. Prospects of soil salinity for the 21st century. 15th World Congress of Soil Sci Soc 1994(1):123-141.
- Umali DL. Irrigation induced salinity technical. World Bank. Washington, DC Paper No. 215. 1993:3-25.
- Yokoi, Shuji; Bressan Ray, A.; Mike Hasegawa, P. 2002. Salt stress tolerance of plants. Jircas Working Report 25-33.