

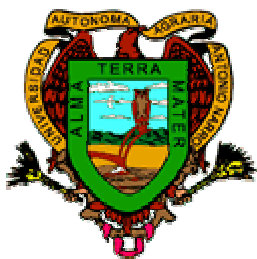
EFFECTO DE LOS SEÑALIZADORES DE ESTRÉS SOBRE LOS PARÁMETROS ESTOMÁTICOS EN HORTALIZAS.

ADRIAN DELGADILLO MENDOZA

TESIS

*Presentada como requisito parcial para
Obtener el grado de :*

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA



**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Abril de 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**EFFECTO DE LOS SEÑALIZADORES DEL ESTRÉS SOBRE LOS
PARÁMETROS ESTOMÁTICOS EN HORTALIZAS**

TESIS POR:

ADRIAN DELGADILLO MENDOZA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y
aprobada como requisito parcial para obtener el grado de

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal _____
Dr. Homero Ramírez Rodríguez

Asesor _____
MC. Humberto Macias Hernández

Asesor _____
MC. Alfredo Fernández Gaytan

Asesor _____
MC. José Ángel de la Cruz Breton

MC. Arnoldo Oyervides García
Coordinador de la División de Agronomía

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México, Abril de 2005

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”**, por que durante este tiempo fue el campo principal de los menesteres de mi formación profesional, con su planta docente y de investigadores y por el apoyo económico durante mi estancia.

Al **Dr. Homero Ramírez Rodríguez**, Por su invaluable apoyo en la elaboración de este trabajo, del cual se destaca mi importancia en los efectos fisiológicos que de alguna manera repercuten en el crecimiento y desarrollo de las plantas; por accesibilidad y orientación en la elaboración de esta tesis.

Al **MC. Humberto Macias Hernández**, Por formar parte de la presentación de este proyecto; así como por su apoyo en la redacción y revisión de este escrito.

Al **MC. Alfredo Fernández Gaytan**, Por su apoyo en esta presentación de esta investigación, y su muestra de disponibilidad de tiempo en los detalles interpretación de la misma.

Al **MC. José Ángel de la Cruz Breton**, por su apoyo en el cultivo de las diferentes especies, mismas que fueron tratadas en el invernadero tres de fitomejoramiento.

Al **MC. José Hugo Rancaño Arriola**, por haber contribuido en gran parte en la elaboración de este trabajo que fue desde el crecimiento y desarrollo del cultivo hasta la redacción del mismo, y de su dote tanto científico como literario que siempre compartió de forma integral a esta tesis.

Al **Ing. Carmelo Alanís Abdón** por su hospitalidad, tolerancia y apoyo en mi instancia en esta institución

DEDICATORIA

A **Santoentierro** quien en momentos en los que he asegurado que no tengo a nadie, siempre ha estado ahí para dar constancia que no todo está perdido y que tengo alguien en quien confiar.

A mi padre, **Pedro Delgadillo Hernández**; por creer en mi y por que es una de las cosas mas grandes que la vida me ha dado.

A mi madre; **Lucina Mendoza Mendoza**, por su amor e infinitos desvelos; por que no solo es el 50% de mi información genética; sino por que es la mas grande razón de mi existir

A † **Ma. Dolores Hernández**, Por su amor y cariño en mi infancia y por que sabe que esta conmigo en donde quiera que este.

A mis hermanos: **Mariela, Pedro, Maria Dolores Agustín y Carlo Delgadillo Mendoza** por compartir experiencias malas y buenas que me han llevado a formar parte de una gran familia.

A **Griselda Liset Cardenas** Que siempre estuvo ahí cuando mas la necesitaba y darme toda su confianza

A **mis compañeros uaaan**, Pompeyo Rivera, Gerardo Reyes, Ricardo Reyes, Salvador Rivera, Hermes Perez, Cludio Rios, Rigoberto Leyva y J. Jesús Cruz por su hospitalidad, consejo y apoyo en la elaboración de este trabajo.

RESUMEN

Con el propósito conocer sus efectos en los parámetros estomáticos, se aplicaron señalizadores de estrés en acelga (*Beta vulgaris* L.), cv. Fordhock, coliflor (*Brassica oleracea* var. Botristis) cv. Snow Ball, brócoli (*Brassica oleracea* var. italica), cv. Dico Cico y Repollo (*Brassica oleracea* var. capitata) cv. Copenhagen Market, cultivadas bajo invernadero en la primavera del año 2004. Se realizaron aspersiones con soluciones de ácido salicílico (AS) 10^{-6} M, ácido benzoico (AB) 10^{-6} M, quitosán (Q) al 1, y un testigo sin aplicación. Se evaluó el efecto de los señalizadores del estrés sobre la densidad tanto estomática, como de células tabloides en el haz y envés, así como el índice estomático adaxial y abaxial de las mismas. El comportamiento de las hortalizas fue diferente dada la especie tanto para la densidad como para el índice estomático. Se encontró interacción entre los mismos parámetros estomáticos y las especies evaluadas, así como la influencia de los señalizadores para la mayoría de las variables estomáticas mantuvo en general una gran diferencia. La densidad tanto celular como estomática en acelga, fue aumentada por los tres tratamientos de AS, AB y Q, mientras que en coliflor solo sólo se incrementó a la aplicación de AS y AB y en brócoli sólo hubo incrementos a la aplicación de AS en densidades estomáticas, sin embargo la densidad estomática en el haz se ve modificada a la aplicación de AB y AS. El índice estomático se vio modificado en coliflor con las aplicaciones de AS, al igual que en repollo, sin embargo para este caso AB dio efectos negativos en la producción de estomas por célula tabloide en el haz de las hojas, mientras que en la parte adaxial tanto en coliflor como en repollo las aplicaciones de Q manifestaron mayores incrementos en el índice estomático en el envés de las hojas, mientras que en brócoli se mantiene el ácido salicílico.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PÁGINA

INTRODUCCIÓN.....

Objetivos

Hipótesis

REVISIÓN DE LITERATURA.....

Estrés

Efecto de estrés hídrico en las plantas

Señalización de estrés

Señalizadores de estrés

 Ácido salicílico

 Ácido benzóico

 Quitosán

Parámetros estomáticos.....

 Densidad estomática.....

 Índice estomático.....

MATERIALES Y MÉTODOS.....

Localización del lugar

Descripción de material experimental.....

Descripción de los tratamientos y establecimientos.....

Riegos y fertilización

Diseño experimental.....

Variables evaluadas

Análisis estadístico.....

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....

CONCLUSINES

LITERATURA CITADA.....

INTRODUCCIÓN.

Las hortalizas contribuyen grandemente a la economía de nuestro país ya que figuras oficiales demuestran que las exportaciones de los diferentes especies a los Estados Unidos durante el período de Enero-Noviembre del 2002 alcanzaron un valor de 1, 850 millones de pesos.

En México de las 20 millones de hectáreas que son dedicadas a la agricultura solo el 13.2% se destina a la producción de hortalizas y esta pequeña parte representa el 41% en generación de divisas del valor total. La importancia de su consumo, no solo radica en sus contenido nutricional, sino también en sus aportes al sistema inmunológico (evita riesgo de enfermedades).

De acuerdo a su forma de consumo las hortalizas se pueden distinguir en tres grupos: hortalizas de consumo fresco, para cocinar, y para la industria. Las hortalizas se producen en los 32 estados de la Republica de los cuales cuatro destacan su participación en superficie producida con el 42.5% total nacional. El estado de Sinaloa mantiene su supremacía en producción con 1' 425, 152 ton (20.7%), seguido del estado de Chihuahua con 901, 930 ton (13.1%), Morelos con 361, 100 ton (5.7%) y Sonora con 244, 799 ton (3.5%) (Sagarpa, 2004, 2005).

En forma genérica todo el ciclo biológico de las hortalizas esta sometido a condiciones ambientales del medio que las rodea. Cuando las condiciones no son favorables, estas responde en forma negativa a estos cambios, es decir cualquier

alteración en las condiciones ambientales puede resultar en el decremento del óptimo funcionamiento. Este tipo de alteraciones que afectan negativamente los procesos fisiológicos de la planta hacen que esta entre en una condición de estrés.

En base a esto en búsqueda de mejorar los cultivos hortícolas, es muy importante entender los mecanismos de la tolerancia al estrés, en los procesos de intercambio gaseoso en las plantas ya que de ello depende que se cumplan los principales procesos de vida de los cultivos hortícolas, como lo son la respiración y la fotosíntesis (Ferreira, A. Et al. 2000)

A lo antes mencionado se han hecho estudios en base a el intercambio gaseoso en las hojas de las plantas y su relación con los parámetros que de alguna manera u otra tienen relación con el cambio de morfología y anatomía de la planta, como lo dice Atchison, M y Head L. (2000). Ellos encontraron que a mayor luminosidad incrementa la densidad estomática, al igual que en un estudio realizado en Preston UK, en plantas de *Heimerocallys*, las cuales fueron sometidas a diferentes condiciones del medio (luz y oscuridad) y se encontró que en las hojas un alto número de estomas por superficie de hoja de las plantas que fueron tratadas en a la luz (Barber, L. Et al. 2002), mientras que Bettarani I. Et al. (2002) dicen que al incrementar la concentración de CO₂ en 17 especies diferentes de plantas no repercute en la densidad estomática, pero si lo hace desde el punto de vista de el índice estomático.

En otras contribuciones se afirma que el intercambio gaseoso en las hojas de *E. Japonicum* repercute en los diferentes parámetros estomáticos y con ello en el peso de la hoja. (Sawada T. et al. 2002), mientras tanto Cruz, J. (2003), hizo un trabajo de investigación en los cultivos de tomate y chile sometidos a diferentes radiaciones en el suelo, y obtuvo que a radiación de color café y blando presenta un mayor índice estomático a comparación con el testigo.

Para lograr que las plantas aumenten la tolerancia a los diversos factores ambientales es necesario implicar estados extrínsecos para los cuales los vegetales manifiesten sus mecanismos de reacción; existen diferentes técnicas para como las antes mencionadas (aumentar la temperatura, el CO₂, La luz etc.), sin embargo tener este tipo de control requiere de una alta inversión, ya que tiene que ser controlado bajo el laboratorio, en relación a esto el enfoque moderno de la producción agrícola incluye la aplicación de los mecanismos de señalización del estrés, por todo lo mencionado se plantea lo siguiente:

Objetivos.

Determinar el efecto de los señalizadores de estrés en la densidad estomática y celular de los diferentes cultivos hortícolas

Conocer el efecto de los señalizadores de estrés en el índice estomático de las diferentes especies hortícolas.

Hipótesis.

Con la aplicación de los señalizadores de estrés se modifican los diferentes parámetros estomáticos.

REVISIÓN DE LITERATURA.

Estrés.

Benavides (2002) ha definido al estrés como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida; como respuesta a dicha desviación se inducen cambios en todos los niveles funcionales de organismo, pudiendo ser dichos cambios reversibles o permanentes. Aún si la condición de estrés es temporal, es normal que la vitalidad de la planta se vea disminuido en tanto se realizan los ajustes requeridos para la nueva situación. Si el estrés es demasiado largo entonces los daños latentes se transforman a daños irreversibles que pueden afectar a la planta entera o partes de la misma.

En otras palabras 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. Asimismo, se aplicará el termino resistencia al estrés para definir “la capacidad de un organismo para evitar los estímulos ambientales negativos o para permanecer bajo un estado particular de estrés sin

que su fenotipo se vea modificado de manera significativa”. En la definición anterior se considera que existe un estado fenotípico ideal, observado bajo condiciones óptimas, a la cual se le llama “norma” (Benavides, 2002)

Efecto de estrés hídrico sobre las plantas.

El estrés hídrico en las plantas puede afectar la expansión de los tejidos en forma significativa.

Es probable que casi todos los procesos que ocurren en la planta se vean afectados por el déficit de agua. El déficit ocasiona bajos niveles de turgencia que detienen el crecimiento celular lo que da como resultado plantas muy pequeñas, además cambia los patrones de crecimiento.

El estrés hídrico en las plantas causa el cierre prematuro de estomas, lo cual reduce pérdidas de agua, pero que el cierre de estomas también interfiere con la entrada de CO_2 , lo cual es perjudicial porque se reduce la fotosíntesis. El resultado de la asimilación de carbono es mejor en los tejidos marchitos que en los turgentes.

Señalización de estrés.

Actualmente el estrés ambiental es una de las principales limitantes para el buen desarrollo de las plantas y por consecuencia baja productividad. Entre las diferentes clases de factores que ocasionan estrés en las plantas podemos mencionar a: altas o bajas temperaturas, salinidad, déficit hídrico, etc., los cuales tienen en común la causa del estrés oxidativo en las células y tejidos de las plantas.

Los intentos para disminuir el estrés, o para mejorar la resistencia o la adaptación de las plantas a dicho estrés tendrán mayor alcance si se entiende el transcurso fisiológico y bioquímico sobre el cual transcurren las respuestas de las plantas. Con ello es posible desarrollar estrategias de manejo razonable para disminuir las pérdidas debidas a las distintas clases de estrés.

La señalización es la liberación por parte de una célula de una sustancia o sustancias que transmiten información a otras células. La señalización es la base de la transducción de señales, el proceso por el cual las plantas perciben las señales de diversos factores ambientales y las transmiten a otras células para activar respuestas de modulación, adaptación y defensa. Para que ocurra la transducción de señales se requiere de la acción de una "Vía o cascada de señalización", es decir, de la transferencia de estímulos desde una molécula preceptora primaria (que es la que recibe el estímulo y se le llama receptor), a través de un conjunto de moléculas extra o intracelulares (llamadas señalizadores)

cuya función es transmitir la señal por medio de un evento químico como la fosforilación hasta las moléculas o genes que se encargan de la respuesta al estímulo (llamados “de respuesta” o efectores). Al proceso se le llama cascada ya que ocurre en cadena, requiriéndose en cada paso de la acción del agente anterior, y no estrictamente lineal, es decir, un señalizador puede evitar uno o mas efectores o un efector que puede activarse por dos o mas señalizadores. El resultado final es una especie de intercomunicación entre diversos señalizadores y efectores que forman una “red de transducción de señales” (Benavides, 2002). En la figura se muestra el esquema de una red de transducción de señales.

Señalizadores de estrés

Ácido salicílico.

El nombre de ácido salicílico proviene de *Salix alba*, el árbol cuyas hojas y corteza tradicionalmente se utilizaba como cura para el dolor y fiebre y de donde Johann Buchner en 1828 aisló la salicina. En 1874 se inició la producción comercial de AS en Alemania, al ácido acetilsalicílico se le dio el nombre comercial de aspirina en 1898 por la Bayer Company (Raskin, 1992)

En la biosíntesis del ácido salicílico (AS) es derivado de la vía del shikimato-fenilpropanoides. Se han propuesto dos caminos de síntesis de AS a partir de la fenilalanina, la diferencia entre uno y otro se encuentra en el paso de hidroxilación del anillo aromático. En una reacción medida por la enzima fenilalanina-*liasa*, este último es transformado en ácido benzoico o en ácido orto-cumárico los cuales son los precursores del AS un estudio en *Arabidopsis* demostrado que el ácido

salicílico está hecho en el cloroplasto de isochorismate, un camino que es funcional en prokaryotes (Pierre, J. 2002).

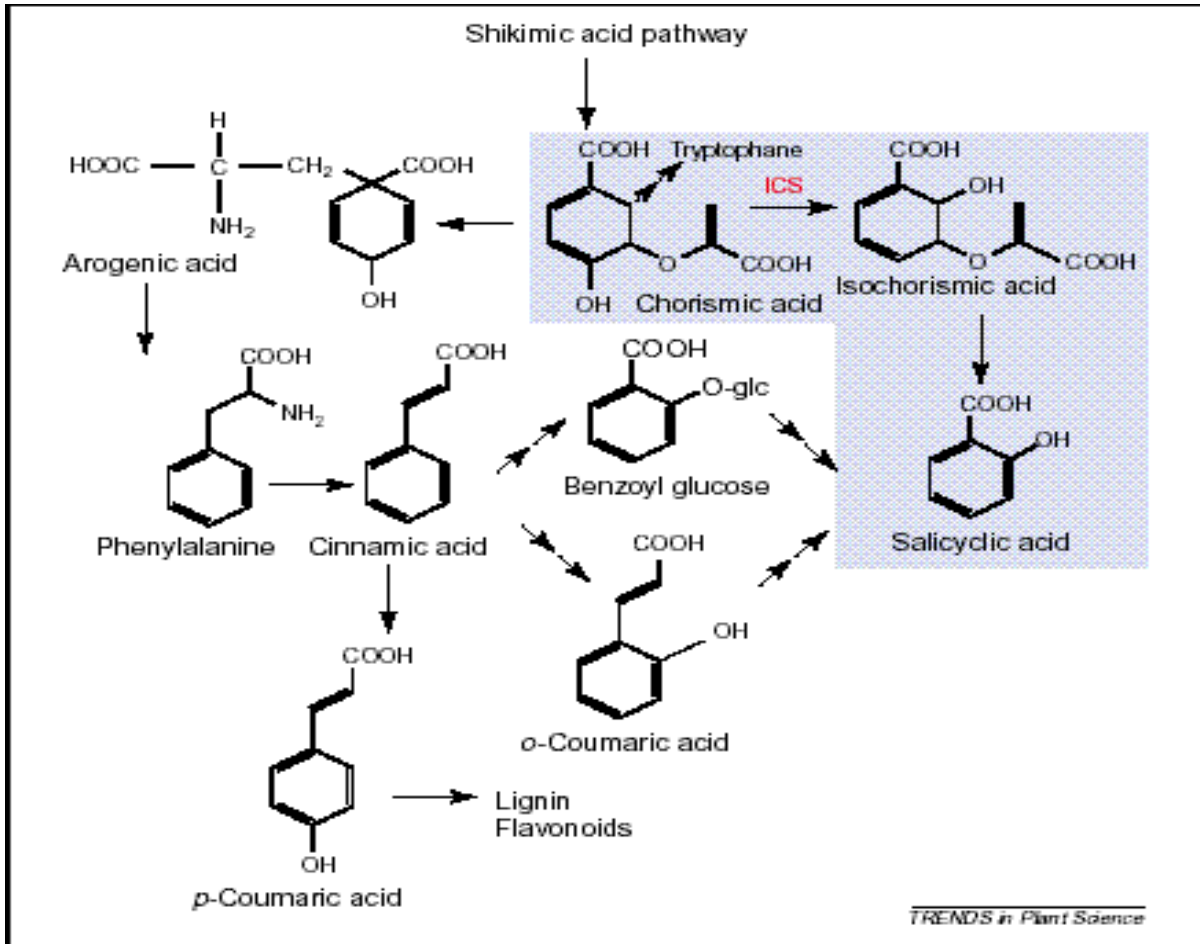


Fig. 1. Los caminos biosintéticos para la biosíntesis ácida salicílico. La pieza destacada en azul fue descrita en bacterias y ahora tiene originalmente ser demostrada para ocurrir en el cloroplasto de plantas. Abreviatura: ICS, synthase del isochorismate.

El ácido salicílico pertenece a un grupo muy diverso de sustancias conocidas como fenólicas. En las plantas los compuestos fenólicos están involucrados en gran cantidad de actividades de regulación de plantas. Siendo un compuesto encontrado en todos los tejidos de las plantas, su concentración se eleva cuando las células, órganos o plantas completas. Cuando son sometidas a la acción de una clase de estrés. Este sea de un tipo biótico y abiótico.

El daño o estrés oxidativo se presenta cuando la oxidación de especies activas de oxígeno (EAO) rebasa la capacidad de los sistemas antioxidantes y de captura de los radicales libres en la célula. Normalmente el nivel de especies activas de oxígeno (EAO) es alto cuando la planta se va sometida a alguna condición de estrés biótico o abiótico. En esta actividad el AS participa en forma importante como señalizador de plantas, que da lugar a las respuestas en la adaptación de ambiente extremos, y esto pudiera convertir a este compuesto y sus derivados en herramientas para el manejo agronómico del estrés, como una expresión de los sistemas de control y daño oxidativo (Guerreo, A. Et al 2004) .

En este sentido se requiere realizar gran cantidad de investigación en diferentes especies agrícolas, para poder determinar en que forma y dosis se puedan hacer las aplicaciones exógenas de AS y pueda dar resultado favorables a la producción y a la adaptación de un estrés abiótico. Por ende se menciona el efecto del AS en diversos cultivos agrícolas y forestal.

Algunos autores concluyen que el AS en concentraciones de 10^{-4} , 10^{-6} , y 10^8 M. Manejando tres etapas de aplicación (crecimiento vegetativo, floración y primer fruto "fecundación"), en tomatillo *Physalis ixocarpa*. Tiene efectos positivos en cuanto altura de planta, número de frutos, peso de frutos y longitud de raíz (Zhang, S. 2002.).

Ácido benzoico.

El ácido benzoico (ácido bencenocarboxílico), C_6H_5COOH tiene un peso molecular de 122.05, se cristaliza en hojuelas o agujas monoclinicas blancas, lustrosas, se obtuvo primero de benjuí, en la exudación resinosa provocada por incisiones en la corteza del *Styrax benzoin*, que es un árbol de la familia de las lauráceas (Kirk, 1961).

Blaise de Vigenere, médico francés no fue el primero en mencionar el ácido benzoico, pero si lo fue en describirlo en lenguaje moderno (1618). Wöhler y Liebig (1832) y Mitscherlich (1834) determinaron su estructura. El ácido benzoico se usa en medicina y para conservar los alimentos (Kirk, 1961)

El ácido benzoico en estado libre, o en forma de derivados sencillos, como sales, esterres y amidas, está muy distribuido en la naturaleza. El benjuí (*Styrax benzoin*) puede contener hasta 20% de ácido benzoico, en estado libre o en combinaciones que se descomponen fácilmente por el calentamiento. La resina acaroide (de la *Xanthorrhoea hastilis*) contiene de 4.5 a 7 %. Se encuentran

proporciones mas pequeñas del ácido libre en productos naturales de índole muy diversa; la corteza del cerezo negro silvestre, el castóreo, los arándanos, las ciruelas, el clavo maduro y el aceite volátil de anís.

Se ha encontrado que al aplicar AB en concentración de 10^{-4} M en tubérculos u foliar en papa, produce un incremento en el porcentaje de brotación, crecimiento, producción de biomasa y mayor número de tubérculos por planta (Cabeza, 2001).

Al aplicar AB en semillas de betabel aumenta la biomasa de este, pero en lechuga tiene efectos negativos (Santiago, 2002)

Quitosan.

El quitosán es un biopolímero, no tóxico que se obtiene por la desacetilación parcial o total de l quitina, un polímero natural muy abundante en la naturaleza que se extrae comercialmente a partir de los caparazones de crustáceos generados como desechos de la industria pesquera, en las cutículas de los insectos y tambien se presenta en forma natural en la pared celular de algunos hongos, donde se sintetiza a través de varias reacciones enzimáticas que ocurren en estos microorganismos, y tiene la capacidad de asociarse a lípidos. (Rathke et al., 1994)

Se señala que se aplicó un estrés hídrico en plantas de cebolla como en lechugas tratadas con quitosán encontrando un mayor crecimiento un tanto en la cebolla como en la lechuga tratadas con el quitosán; también sometieron plantas de tomate a la presencia de patógenos como *P. Capsici* y *Fusrium osysporum*, encontrando que las plantas de tomate tratadas con el Quitosán presentaron mayor crecimiento. Aunque fue efectivo en inducir mayor tolerancia a las dos especies de patógenos inoculadas, la mejor respuesta fue la obtenida contra *P capsici*.

El quitosán es un producto de gran Interés debido a que es un material natural renovable que por lo general es desechado en grandes cantidades por la industria camionera, 1.44 millones de toneladas en base a peso seco (Knorr, 1991), el cual puede ser aprovechando como un subproducto, además presenta características importantes desde el punto de vista de aplicación entre los que destacan la biocompatibilidad, el alto poder quelatante y la biodegradabilidad. Se puede usar como recubrimiento de semillas protegiéndolas de plagas, empaque de alimento, antimicrobianos, purificación de agua, diálisis, recuperación de metales preciosos, películas de fotografía y muchas otras aplicaciones de interés en la agricultura, medicina, cosmetología, etc., todas estas propiedades están determinadas por la naturaleza química del compuesto.

Se evaluó el efecto de Quitosán sobre *Sacharomyces cerevisitae* (la levadura que lleva acabo la fermentación alcohólica), *bettanomyces intermedius* y *bettanomyces bruxellensis* (potentes contaminantes en destilerías y bebidas

alcohólicas) encontrando que con la aplicación de quitosán en su forma natural alargó los tiempos de fase de latencia en ambas cepas de *Bettanomyces*, desde 170h en *B. Intermedius* con 2 g/l de Quitosán y 80 h en *B. Brusellensis* con 6/l de Quitosán, siendo mas sensible *B. Intermedius* para el caso de *S. Cerevisiae* se observó una tendencia a disminuir la velocidad de crecimiento en un 50% con 6g/l del polisacárido, por lo que es factible el control del crecimiento de *Bettanomyces*, en presencia de *S. Cerevisiae*, utilizando Quitosán. (Peña, F. 2003)

Mientras Raygosa, M. (2001) Al hacer un estudio en el efecto del quitosán sobre la lechuga se llevó acabo la aplicación de dicho compuesto en soluciones a una concentración de 0.1 y 0.25% peso/volumen en 1% de ácido acético.

Se encontró un aumento significativo en el peso dfresoc de las plantas tratadas con con quitosán al 0.1% al compararse con el tratamiento control de aplicación de agua. No se encontraron diferencias para los tratamientos restantes.

Parámetro estomáticos.

Densidad estomática.

En la superficie epidérmica de las hojas se presenta un gran número de poros llamados estomas. Los estomas son microscópicos y están rodeados por dos células especializadas llamadas células oclusivas o estomáticas que regulan la apertura y cierre de los estomas. (Delvin, R. 1982)

La densidad estomática de las hojas , es una característica conveniente de medir al analizar las relaciones agua-planta y para encontrar indicadores que expliquen su rendimiento con relación a la intensidad y duración de la sequía.

Se indica que la variación en la tasa de transpiración depende de la frecuencia de estomas, tamaño (largo y ancho) del ostiolo y compartimiento estomatal, por lo tanto deben de identificarse variedades con menor densidad y tamaño de estomas e incorporar posteriormente estas características en los genotipos para reducir así la tasa de transpiración y superar con ello el estrés de agua bajo temporal.

En ocasiones los estomas se presentan sólo en la superficie inferior de las hojas, pero con frecuencia se le encuentra en ambas superficies, casi siempre con mayor abundancia en la superficie inferior, mientras que las plantas que crecen bajo la superficie del agua carecen de ellos. Los pastos por lo común tienen casi la misma cantidad en ambos la dos. A veces los estomas se hallan en una cripta como es el caso del pino y la adelfa.

Los estomas típicos de las dicotiledóneas constan de dos células oclusivas con forma de riñón; las células oclusivas de pastos y ciperáceas tienden a ser mas alargados (con forma de hilera). Las células oclusivas tienen pocos cloroplastos, mientras que las células epidérmicas epidérmica casi siempre no tienen. Típicamente no hay plasmodemos (o se les encuentra incompletos) que comunique a los protoplastos de las células oclusivas con los de las accesorias.

Por lo común, cada milímetro cuadrado de superficie foliar tiene unos 100 estomas, aunque el número puede ser 10 veces mayor, ya que se ha encontrado un total de 2230 (Salisbury, F. 1994).

En estudios recientes en el cultivo de aguacate se encontró que en la raza mexicana presentó mayor número de estomas por mm^2 que las razas Antillana y Guatemalteca. Esta última le sigue a la primera hasta las séptima hoja donde se iguala con la raza Antillana a partir de ahí presenta mayor número de estomas, que la raza guatemalteca (Barrientos, F. Et al. 1994)

Mientras que Pereira et al (2004) encontraron un mayor número de estomas por mm^2 al comparar dos especies de cítricos en el cual hizo la comparación entre un híbrido poliploide y un híbrido diploide, en el que el primero fue el que tuvo una mayor densidad estomática, y encontraron que este afecta solo la morfología de la planta, pero se comportan de igual manera en campo.

En otro trabajo similar pero con la medición de la densidad estomática en 11 hortalizas se obtuvieron resultados con diferencias significativas entre especies teniendo que la calabacita presentó una mayor densidad estomática con 131.41 estomas por mm^2 a comparación con la col que solo presentó 19.41 estomas por mm^2 en la parte adaxial de la hoja (Morales, J. 1998.)

Índice estomático.

Este parámetro se refiere a la cantidad de estomas que se encuentran en la epidermis de la hoja, en relación con el número de células oclusivas (tabloides)

Trabajos realizados con el índice estomático, se muestra el echo por Barrientos, F. Et al (1994), los cuales hicieron un experimento en la determinación del indice estomático en tres razas diferentes de aguacate (Antillana, Mexicana y Guatemalteca) dentro de las cuales determinaron que se mantuvo estables en las tres razas, en cuanto a laumento en el nivel de la hoja, y fueron en casi cada nivle diferentes entre razas. La raza Mexicana presentó mayor índice estomático, seguido de la raza Antillana y la Guatemalteca, con una tendencia al incremento. Mientras que con la aplicación de ácido Salicílico $10^{-4}M$ y $10^{-5}M$ en plántulas de chile se encontró un mayor índice estomático, a comparación con el testigo en la parte adaxial de la hoja.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Localización del lugar

El presente trabajo de investigación se llevó acabo en el invernadero cuatro del departamento de fitotecnia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, de Saltillo Coahuila, durante el periodo de Enero a julio del 2004, a una altura de

1743 msnm, con coordenadas geográficas de 25° 22' de latitud norte y 101° 00' de longitud oeste

Descripción del material experimental.

Descripción del material vegetal

Acelga. Es una planta bianual y de ciclo largo, su período de siembra a cosecha es de 45 – 60 días, sus hojas constituyen la parte comestible y estas son grandes de forma oval y corazonadas, y posee un pecíolo ancho y largo que se prolonga en el limbo el cultivar que se utilizó para el experimento fue “Fordhock”.

Coliflor. Es una planta anual, su sistema de raíces es muy ramificado y profundo, su período de siembra a cosecha es de 60 a 120 días, y su parte comestible esta constituida por una masa de flores abortivas con pedúnculo corto y carnoso; el cultivar que se utilizó en el experimento fue “Snow ball”.

Brócoli. Al igual que el cultivo anterior esta es una especie anual erecta, tiene de 60 a 90 cm de altura y termina en una masa de flores de flores, la cual es la parte comestible, su ciclo de vida varía de entre 60 a 120 días, el cultivar que se utilizó en este experimento fue Di Cico.

Repollo. Es una planta bianual, su sistema radicular es muy fibroso y abundante, con hojas sésiles, mismas que son la parte comestible de esta especie, su período

de siembra a cosecha es de 60 a 120 días; el cultivar utilizado en el experimento es "Copenhagen market".

Descripción de los tratamientos y establecimiento

Este trabajo de investigación se desarrolló en un invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio narro, Coahuila, México, que esta ubicada a 1760msnm 17° 21' de latitud norte y a 101° 00' de longitud oeste, durante el período de Enero a Julio del 2004. Se utilizaron semillas certificadas de acelga (*Beta vulgaris* L.), cv. Fordhock, coliflor (*Brassica oleracea* var. Botritys), cv. Snow ball, brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cv. Di Cico y repollo (*Brassica oleracea* var. Capitata) cv. Copenhagen market. Estas se sembraron en cinco cajas de poliestireno de doscientas cavidades con sustrato de peat moss premier bx el 28 de Enero del 2004. Las plántulas fueron transplantadas en un invernadero del departamento de fitotecnia el 23 de Febrero, en bolsas de plástico negro de 25 X 30 cm con sustrato de peat moss y arena (1:2). El la mezcla obtenida del sustrato fue tratada con Bromuro de metilo con nueve días de tratamiento para su posterior aireación, posteriormente se llevó acabo el llenado de las bolsas con las características antes mencionadas. El cultivo fue manejado de acuerdo al paquete tecnológico utilizado en el departamento de Horticultura (Benavides, 2002).

Las camas del invernadero se tratadas con la aplicación de furadan con una dosis de 20 cc en 12 litros de agua, con la posterior colocación de un plástico negro, con el fin de evitar la infiltración de plagas y enfermedades fúngicas de suelo. Las

bolsas se establecieron en camas de 0.90 X 13m a una densidad de población inicial de 32 plantas por m² estas se reacomodaron durante el desarrollo del cultivo hasta alcanzar una densidad de población de 16 plantas por m².

Riegos y Fertilización.

Inicialmente la el día de transplante si dio un riego ligero, en las etapas iniciales el frecuencia de riego fue dos veces a la semana, y con forme al crecimiento y desarrollo de las plantas, el riego fue siendo mas frecuente, ya que en la etapa intermedia del crecimiento de las mismas el rigo fue diario, y en las etapas finales de la investigación los el riego se hizo dos veces por día. Mientras tanto la fertilización consistió en altas concentraciones de nitrógeno (por manejar hortalizas de hoja) utilizando la solución de Duglas 300 ml, con aplicación de una vez por semana, y al igual que con el riego, la fertilización si incrementó, de acuerdo con el crecimiento y desarrollo del cultivo, con aplicaciones de hasta tres veces por semana en las etapas finales del cultivo.

Tratamiento 1 = Aplicación de Ácido salicílico (AS) a una concentración de 10⁻⁶ M a los diferentes cultivos (Acelga, Coliflor, Brócoli y repollo). Las aplicaciones se iniciaron cuando las plántulas alcanzaron 8 y 10 hojas verdaderas, el 18 de Marzo y se continuaron haciendo cada dos semanas hasta el 30 de mayo. En cada aplicación de los tratamientos se agregó el surfactante líquido nonifenol (10) poliosietilénico (Pego Del) a razón de 1 ml litro⁻¹ de agua.

Tratamiento 2 = Aplicación de Ácido Benzoico (AB) a una concentración de 10^{-6} M a los diferentes cultivos: Acelga, Coliflor, Brócoli y Repollo tomando en cuenta las mismas consideraciones que en el caso del tratamiento anterior.

Tratamiento 3 = Aplicación de Quitosan (Q) a una concentración de 1% a los cultivos de Acelga, Coliflor, Brócoli y Repollo teniendo el mismo método que los anteriores tratamientos.

Tratamiento 4 = Este es el que se mantuvo como control (testigo), en el cual no se hizo ninguna aplicación de sustancias conocidas como señalizadores de estrés.

Diseño experimental

El diseño utilizado en el presente trabajo fue el completamente al azar con arreglo factorial A X B (Universidad Autónoma de Nuevo León 5.0). El experimento consistió en que el factor A, esta representado por los cultivos (Acelga, Coliflor, Brócoli y Repollo), y el factor B por los señalizadores de estrés (Ácido salicílico, Ácido Benzoico, Quitosan y testigo) con ocho repeticiones. El modelo estadístico es el siguiente.

Variables evaluadas

Densidad estomática en la parte adaxial de la hoja.

La toma de muestras se realizó el 5 de junio, que fue 3 meses después de la siembra de los cultivos, esta actividad se llevó a cabo con la utilización de pegamento de petróleo mismo que se aplicó a la parte adaxial de la hoja y con el uso de la cinta skoch para tomar la impresión de la cutícula de la hoja de los diferentes cultivos, tomando una muestra por cada repetición en la parte del haz de la hoja, la hoja fue escogida en base a que estuviera completamente desarrollada y a su competencia completa para con las demás hojas (que estuviera ubicada preferiblemente hacía el oriente).

Una vez obtenidas las impresiones cuticulares de las hojas, todas las muestras fueron llevadas al laboratorio de Citogenética para cuantificar el número de estomas, con el uso de portaobjetos (MADESA, 25 X 75 mm) y el microscopio óptico (Earl-Zeiss) con el objetivo de 40X por 10X de la lente ocular y así poder obtener la cantidad de estomas por unidad de área (mm^2), y se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad estomática} = \frac{\text{No. De estomas}}{\text{Unidad de área (mm}^2\text{)}}$$

Densidad de Células tabloide en la parte adaxial.

Para el caso de esta variable se utilizó el mismo procedimiento que para la variable anterior, solo que ahora se cuantificó en número de células tabloide en el haz de las hojas y se aplicó la misma fórmula.

Densidad estomática en la parte abaxial .

Se hizo el conteo de estomas tomando cuatro campos por repetición (al igual que en las variables anteriores) en el envés de las hojas.

Densidad de células tabloides en la parte abaxial.

Se hizo el conteo de las células tabloides en el envés de las hojas y se aplicó el mismo procedimiento que el resto de las variables anteriores.

Índice estomático en la parte adaxial de las hojas.

Con la misma metodología antes mencionada se obtiene el número de estomas, y el número de células tabloide en el haz de las hojas de las diferentes especies hortícolas e incluso el mismo número de campos por repetición (4 campos), solo que se aplica la siguiente fórmula.

Índice estomático = Número de estomas _____.

Número de células tabloides.

Índice estomático en la parte abaxial de las hojas.

Se hizo el conteo de los estomas y células tabloides en el envés de las hojas de los diferentes cultivos hortícolas y se obtuvo mediante la relación entre estas dos parámetros morfológicos de la hoja, utilizando la misma metodología que para índice estomático en la parte abaxial.

Análisis estadístico.

Se realizó el ANVA para las variables y la prueba de rango múltiple de tukey ($p \leq 0.01$), en todas las variables evaluadas, utilizando el programa de U de Nuevo León versión 2.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultado de lo efectos de las aspersiones de AS, AB, y Q en cada hortaliza se presentan en el Cuadro 1. Posteriormente se presenta el efecto de cada especie hortícola (Cuadro 2), así como el efecto de cada uno de los señalizadores de estrés (Cuadro 3) sobre la misma variable.

Densidad de células tabloides en el envés de las hojas.

Para esta variable se encontró que en respuesta a las aplicaciones de los señalizadores del estrés mostró diferencias significativas (cuadro1) , de las cuales en acelga hubo mayor densidad de células con la aplicación de quitosán con 3 células más que el testigo, seguido del ácido salicílico con 2 células a excepción del ácido Benzóico que se comportó de igual manera que el testigo ($P \leq 0.01$). Para el caso de coliflor el AS fue el único que obtuvo valores significativos, con cuatro células tabloides mas que le testigo ($P \leq 0.01$). Al igual que en coliflor en el cultivo de brócoli también se obtuvo mayor efecto con la aplicación de AS solo que también la aplicación de Q mostró mayor densidad de células tabloides, que fue de 3 y 2 mas que el testigo respectivamente ($P \leq 0.01$). Y para el caso de repollo no hubo diferencias significativas pero se observa que el AB es el que obtuvo mayor resultado numérico ($P \leq 0.01$).

Para el caso del efecto general de los señalizadores del estrés en las diferentes especies en el cuadro 2, se ve que se obtuvo mayores densidades de células en los cultivos de brócoli y coliflor ya que ambas especies tuvieron 19 células tabloides por mm^2 a comparación con acelga y repollo que solo obtuvieron 14 y 12 respectivamente. En el efecto general de los señalizadores del estrés el AS presento mayor densidad de células con una cantidad de diecisiete, seguido del Q con 16 posteriormente el AB y por último el testigo ($P \leq 0.01$) (cuadro 3)

Densidad estomática en el envés.

Para el caso de esta variable fue afectada principalmente por el efecto de la aplicación de AS y Q con una densidad de células tabloides de entre siete y seis estomas respectivamente, no así la aplicación de AB que tuvo efectos negativos con un estoma menos a comparación con el testigo. Para el caso de coliflor al aplicación de AS tuvo dos estomas mas a comparación con el testigo, y el resto de las aplicaciones (AB y Q) fueron estadísticamente igual que el mismo. Al igual que con coliflor el efecto de al aplicación en brócoli de AS tuvo diferencias significativas a comparación con el testigo manteniendo se las demás aplicaciones con igual efecto a comparación al control. Los resultados en el cultivo de repollo fueron estadísticamente iguales, pero numéricamente diferentes con un mayor efecto con la aplicación de AS.

El efecto general de las aplicaciones de los señalizadores del estrés se muestra que hubo una mayor respuesta para el caso de brócoli y coliflor con una cantidad de diez estomas por mm^2 a comparación con acelga que sólo tuvieron seis células ($P \leq 0.01$) (cuadro 2). Y para los diferentes tratamientos en el cuadro 3 se observa que el efecto que el mayor efecto general de las especies fue con la aplicación de AS (nueve estomas) ya que el resto de las aplicaciones se comporto de manera igual que el testigo ($P \leq 0.01$).

Densidad de células tabloides en el haz.

En acelga todos los tratamientos tuvieron mayores respuestas a las del testigo, pero el AS obtuvo una mayor densidad de células tabloides (cinco células mas que

el testigo) seguido de las demás aplicaciones (Q y AB) que fue de tres y dos células más que el testigo respectivamente, en relación a coliflor también el AS fue el que tuvo mayor densidad de células, con cinco células mas que el testigo, pero en esta especie la aplicación de AB dio mayor densidad que en Q (tres células mas que el testigo), ya que esta última se fue igual estadísticamente a comparación con el testigo, resultados similares en el cultivo de brócoli en el cual a excepción de AS (tres células mas que el testigo) tanto AB como Q dieron los mismos resultados que el testigo, sin embargo en el caso de repollo en los tres tratamientos hubo resultados significativos a comparación con el testigo, los cuales AS y AB hubo dos células mas y en con la aplicación de Q solo hubo una mas que en el testigo . ($P \leq 0.01$) (cuadro 1).

El efecto general de las aplicaciones de los señalizadores del estrés en el cuadro 2 se observa que al igual que en las pasadas variables el brócoli y la coliflor tienen diferencias significativas a comparación con acelga y coliflor que se comportaron igual estadísticamente, mientras que el efecto particular de estas aplicaciones fue dotado por AS quien del cual se obtuvo aproximadamente de cuatro células tabloides por mm^2 mas que en el testigo, seguido del Q y AB quienes en promedio se obtuvieron dos células mas que el testigo.

Densidad estomática en el haz.

Para esta variable en particular solo hubo diferencias significativas a la aplicación de los señalizadores de estrés en el brócoli, en el cual al igual que en las demás

variables se tiene diferencias significativas con la aplicación de AS, ya que presento de dos a tres estomas mas a comparación con el testigo, y por consiguiente para el caso de el efecto general de los señalizadores del estrés es mayor en el Brócoli (doce estomas) ya que acelga coliflor y repollo se comportaron estadísticamente igual con ocho estomas en promedio ($P \leq 0.01$) (tabla 2). Y de igual como se ve en el cuadro 3 el AS dotó de mayores densidades en los cultivos en general a comparación con el resto de los tratamientos que obtuvieron resultados estadísticamente iguales; en general para el caso de la densidad estomática esto coincide con lo dicho por Atchison, M y Head L. En el 2000 quienes encontraron que al someter al estrés a las plantas incrementa la densidad estomática; al igual que en un estudio similar hecho en Preston UK en las plantas de *Hermocallys* de las cuales se demostró que las altas luminosidades incrementan el estrés de estos vegetales y por lo tanto el incremento el incremento en el número de estomas por superficie de hoja (Barber, L. Et al); sin embargo en otras investigaciones en las que se estresan las plantas se ha encontrado que al aplicar altas concentraciones de CO₂ se obtuvieron resultados opuestos al incremento de la densidad estomática (Sawada T. et al .2002).

Índice estomático en el haz de las hojas.

Para el caso de Acelga y Brócoli no hubo diferencias significativas a la aplicación de los señalizades del estrés, mientras que en coliflor las aplicaciones de AS tuvieron mayor efecto con un estoma por célula tabloide mas que el testigo,

mismo que se comportó estadísticamente igual que el resto de los tratamientos, y al igual que en coliflor en el repollo el AS mantuvo mayor índice estomático con un estoma por célula tabloide mas a comparación con el testigo ($P \leq 0.01$) (Cuadro 1). En el efecto general de los señalizadores del estrés se tiene que en Repollo y Brócoli hubo un mayor índice estomático, seguidos de coliflor, y por último acelga como se muestra en la figura 1; sin embargo la respuesta en general de las especies a la aplicación de los señalizadores muestra que el AS dio mayores índices estomáticos que el testigo y que el resto e os tratamientos en general debido a que estos se comportaron de la misma manera estadísticamente ($P \leq 0.01$) (figura 2);tal como lo dice Betarani L. et al (2002) quienes aumentaron la concentración de CO₂ en 17 especies diferentes de plantas y modificaron el sus índices estomáticos, similara a lo encontrado por Cruz, J en el 2003 quien hizo una investigación el los cultivos de tomate y chile sometidos a diferentes radiaciones en el suelo, y obtuvo que a radiación de color café y blanco presenta un mayor índice estomático a comparación con el testigo.

Índice estomático en el envés de las hojas.

Para la variable en cuestión el cuadro 1 muestra que a excepción de la Acelga en los demás cultivos si hubo diferencia significativa, y particularmente en coliflor todos los tratamientos tuvieron diferencias significativas a comparación con el testigo, con 1 estomas más que el testigo, pero el Q ascendió con dos estomas por célula tabloide más a comparación con el testigo, en lo referente a Brócoli el AS tuvo mayor efecto (un estoma mas que el testigo) mientras que el AB mostró

un resultado negativo, y en Repollo se mantiene el Q con un mayor índice estomático, mientras que en este caso el AS mostró efectos negativos, mientras tanto que el efecto general de los señalizadores del estrés se muestra mas prominente en Brócoli y Repollo con aproximadamente seis estomas por célula tabloide, seguidos del acelga con cinco y por último coliflor que solo tuvo cuatro estomas por célula tabloide ($P \leq 0.01$) (figura 3); sin embargo en la respuesta general de las especies hortícolas a la aplicación de los señalizadores en la figura 4 se muestra que no hubo diferencias significativas a comparación con el tratamiento 4 (testigo).

CUADRO 1. Efecto de aplicaciones foliares de los señalizadores de estrés: ácido salicílico (AS), ácido benzóico (AB), quitosán (Q) y testigo (T), sobre parámetro estomáticos de cuatro hortizas en Saltillo, Coahuila. México 2004. cada valor representa la media de cuatro plantas.

Tratamiento	DCTE (ct/mm ²)	DEE (e/mm ²)	DCTH (ct/mm ²)	DEH (e/mm ²)	IEH (e/ct)	IEE
Acelga						

AS 10 ⁻⁶	14.50 ab	6.63 a	19.38 a	8.38 a	5.25 a	5.00 a
AB 10 ⁻⁶	12.50 b	5.13 b	15.75 bc	7.50 a	4.63 a	5.25 a
A al 1%	15.38 a	6.75 a	17.50 ab	7.88 a	4.88 a	5.38 a
Testigo	12.50 b	5.50 ab	14.63 c	7.13 a	5.25 a	5.25 a
Coliflor						
AS 10 ⁻⁶	21.25 a	11.13 a	26.13 a	8.38 a	5.88 a	4.00 ab
AB 10 ⁻⁶	18.63 b	9.63 b	23.88 b	7.50 a	5.38 b	4.13 ab
A al 1%	17.75 b	9.13 b	20.13 c	7.88 a	5.25 b	4.75 a
Testigo	17.25 b	8.50 b	21.88 c	7.13 a	5.34 b	3.75 b
Brócoli						
AS 10 ⁻⁶	20.75 a	11.38 a	25.50 a	14.63 a	5.25 a	6.63 a
AB 10 ⁻⁶	18.38 b	9.25 b	22.13 b	11.50 b	4.63 a	5.75 b
A al 1%	19.00 ab	9.50 b	23.38 b	12.00 b	4.88 a	5.88 ab
Testigo	17.38 b	8.50 b	22.13 b	11.63 b	5.25 a	6.00 ab
Repollo						
AS 10 ⁻⁶	11.50 a	6.12 a	15.13 a	7.75 a	6.00 a	5.50 b
AB 10 ⁻⁶	13.25 a	6.38 a	15.50 a	8.63 a	5.38 ab	6.25 ab
A al 1%	12.38 a	5.38 a	13.88 ab	7.88 a	4.75 b	6.38 a
Testigo	11.00 a	5.50 a	13.00 b	7.38 a	5.25 ab	6.13 ab

* Valores con la misma literal dentro de las columnas, son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey $P \leq 0.01$.

DCTE: Densidad de células tabloides en el envés; DEE: Densidad estomática en el envés; DCTH: Densidad de células tabloides en el haz; DEH; Densidad estomática en el haz.

CUADRO 2. Parámetros estomáticos de cuatro hortalizas en respuesta al efecto general de señalizadores de estrés, en Saltillo, Coahuila, México 2004. Cada valor representa la media de dieciséis plantas.

hortalizas	DCTE (ct/mm ²)	DEE (e/mm ²)	DCTH (ct/mm ²)	DEH (e/mm ²)
------------	----------------------------	--------------------------	----------------------------	--------------------------

Acelga	13.71 b	6.00 b	16.81 b	7.72 b
Coliflor	18.72 a	9.59 a	23.00 a	7.72 b
Brócoli	18.88 a	9.66 a	23.28 a	12.43 a
Repollo	12.03 c	5.84 b	14.38 c	7.91 b

CUADRO 3. Efecto de las aplicaciones foliares de los señalizadores de estrés. Ácido salicílico (AS), ácido benzóico (AB), quitosán (Q) testigo (T) sobre los parámetros estomáticos de cuatro hortalizas en Saltillo, Coahuila, México 2004. Cada valor representa la media de dieciséis plantas.

Tratamiento	DCTE (ct/mm ²)	DEE (e/mm ²)	DCTH (ct/mm ²)	DEH (e/mm ²)
AS 10 ⁻⁶	17.00 a	8.81 a	21.53 a	9.78 a
AB 10 ⁻⁶	15.69 bc	7.59 b	19.31 b	8.78 b
Q al 1%	16.13 ab	7.69 b	18.72 bc	8.91 b
Testigo	14.53 c	7.00 b	17.91 c	8.31 b

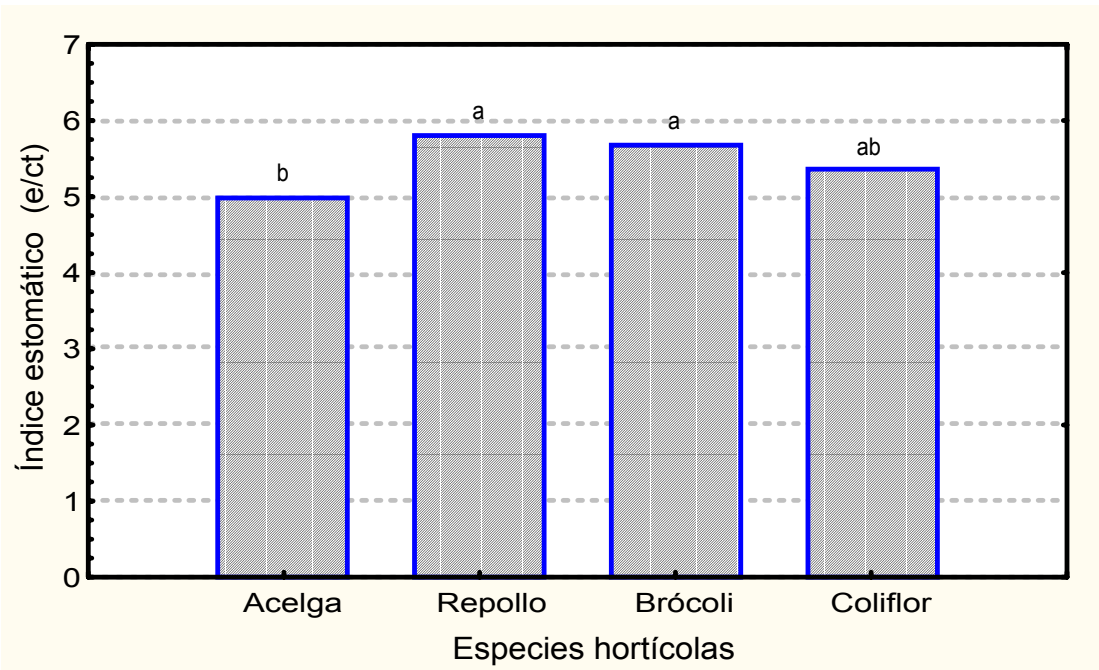


Figura 1. Efecto general de los señaladores del estrés en el índice estomático en el haz de las diferentes especies hortícolas.

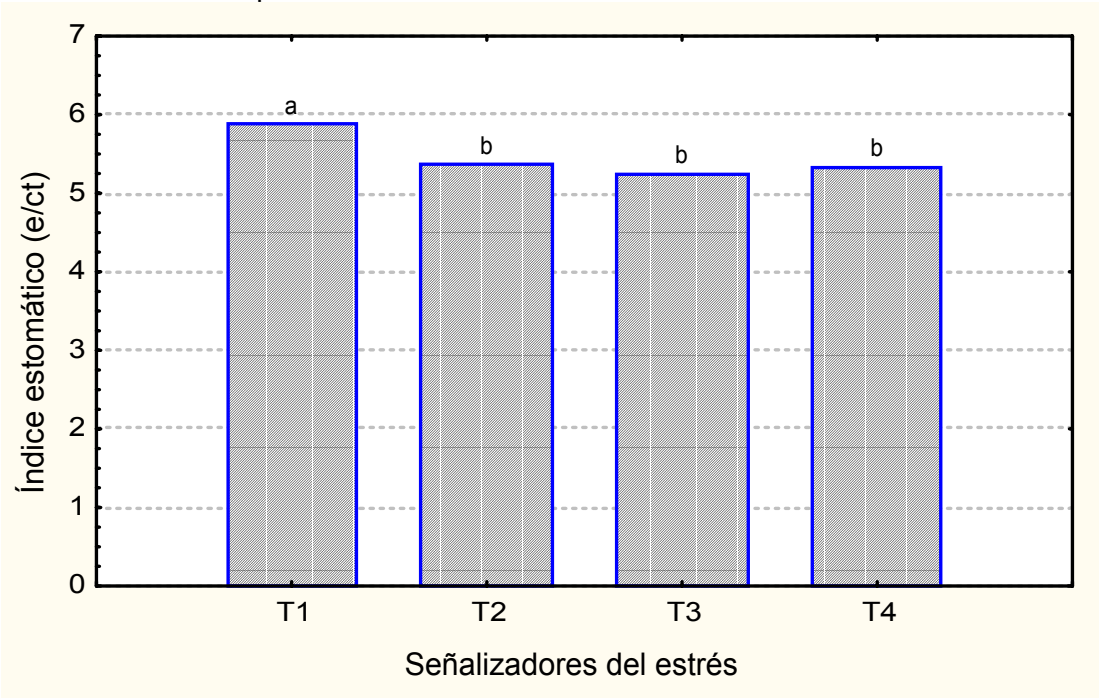


Figura 2 . Respuestas de los cultivos hortícolas en general, a las aplicaciones de los señaladores del estrés en base al índice estomático en el haz de las hojas

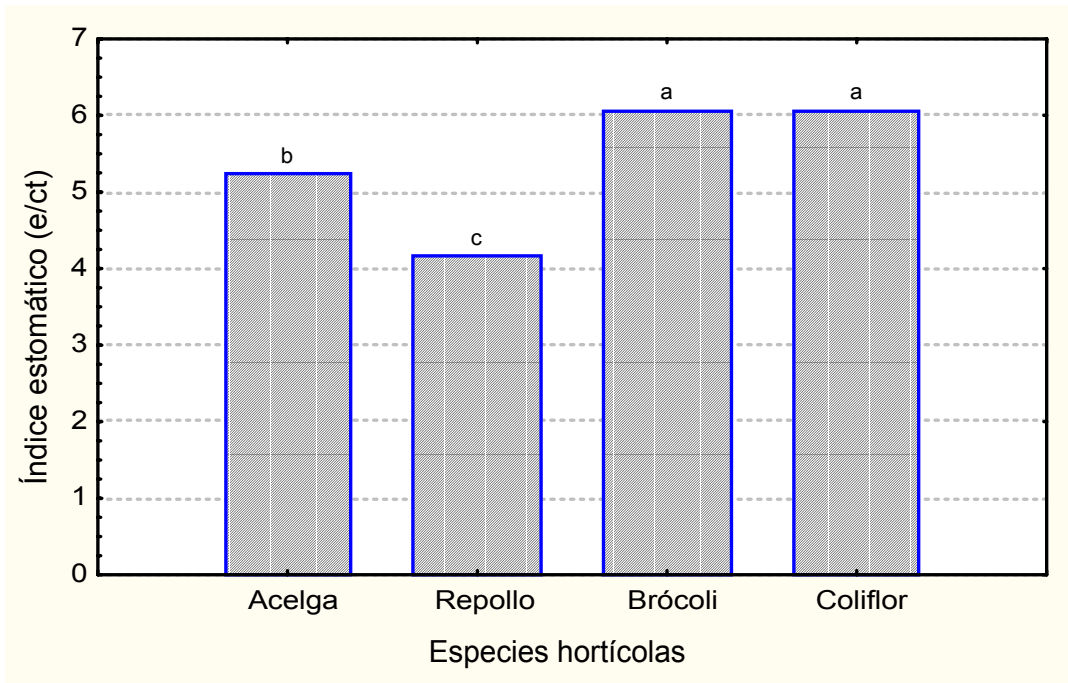


Figura 3. Efecto general de los señalizadores del estrés en el índice estomático del envés en los cultivos hortícolas

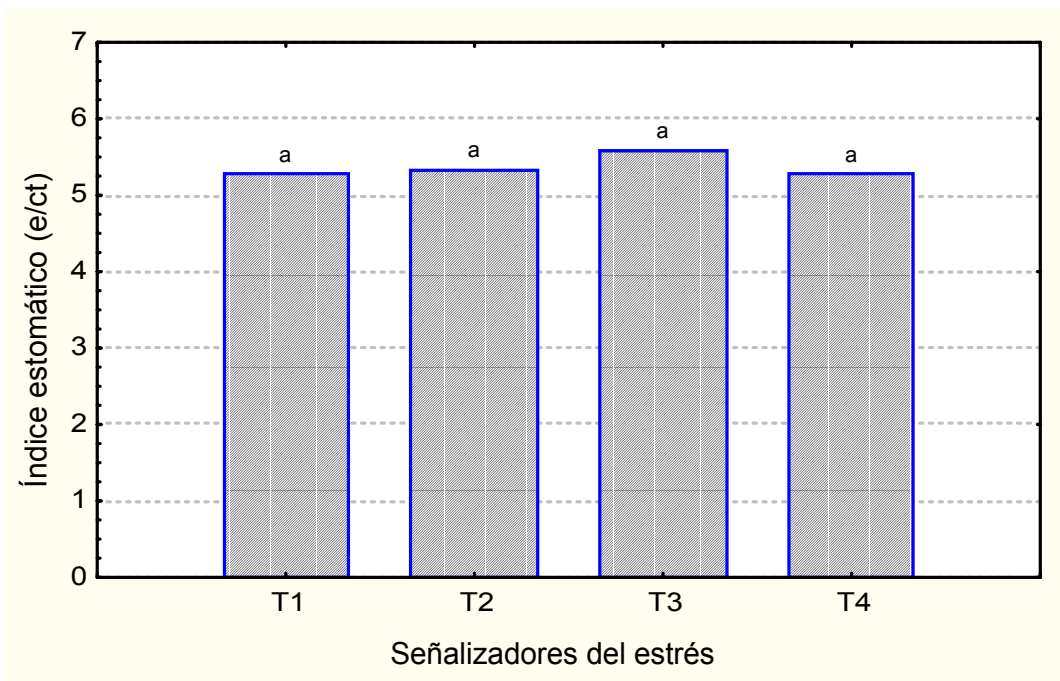


Figura 4. Respuesta de las especies hortícolas en general en cuanto al índice estomático en el envés de las hojas de acuerdo a los diferentes señalizadores de estrés.

CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos en el experimento y bajo las condiciones establecidas en el mismo se tiene que las aplicaciones de AS $10^{-6}M$ incrementan las densidades estomáticas y de célula tabloides tanto en el haz como en el envés de las hojas de las especies tratadas en el experimento (Acelga, coliflor, Brócoli y Repollo); así como el índice estomático en el haz de las hojas de coliflor y repollo y en el envés de las hojas de brócoli. Por otra parte las aplicaciones de AB $10^{-6}M$ incrementan las densidades celulares y estomáticas en acelga, mientras que para coliflor sólo la aumenta en células tabloides en el haz de las hojas; así como también en el aumentan el índice estomático en el envés de coliflor y repollo, sin embargo o disminuye en brócoli y por último las aplicaciones de Q incrementan el número de células estomas por célula tabloide tanto en el haz como en el envés en acelga y en brócoli solo incrementó la densidad de células en el envés tal como lo hizo en haz pero en repollo.y por último en la variable en la variable de índice estomático en el haz actúo de manera negativa; mientras que en coliflor y repollo incrementó el índice estomático en el envés de las hojas.