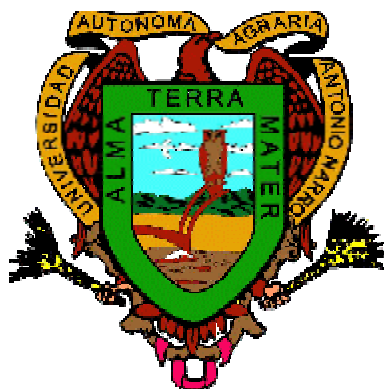


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**MICROMORFOLOGÍA EPIDÉRMICA Y ANATOMÍA DE *Agave tequilana* Weber CON
DIFERENTE FERTILIZACIÓN Na/K Y APLICACIÓN DE INDUCTORES DE
TOLERANCIA.**

Por: **JESET JIMÉNEZ PÉREZ**

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Mayo 2005.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

**MICROMORFOLOGÍA EPIDÉRMICA Y ANATOMÍA DE Agave tequilana Weber CON
DIFERENTE FERTILIZACIÓN Na/K Y APLICACIÓN DE INDUCTORES DE
TOLERANCIA.**

**POR:
JESET JIMÉNEZ PÉREZ**

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 ORTÍZ
ASESOR EXTERNO**

**M.C. FRANCISCA RAMIREZ GODINA
SINODAL**

**M.C. FELIPE ABENCERRAJE RODRIGUEZ
SINODAL**

**M. C. ARNOLDO OYERVIDES GARCÍA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mayo 2005.

Índice de Contenido

	Pagina
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
Objetivo	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
Factores que limitan su crecimiento	4
Temperatura	4
Luminosidad	4
Sanidad	4
Fertilización	5
Importancia del sodio	6
Importancia de potasio	6
Ácido salicílico (AS)	7
Efecto del ácido salicílico (AS)	8
Ácido salicílico y control de patógenos	8
Poliácido acrílico (PAA)	9
Quitósán (Q)	10
Complejos interpolielectrolíticos no-estequiométricos (CPEN)	11
Complejo poliácido acrílico-quitósán (PAA-Q)	11
Estomas	12
Densidad estomática	14
Índice estomático	14
Estructura de hojas	14
Estructura anatómica e histológica de la planta	15
Sistema vascular	16
Xilema	17
Floema	17
Factores ambientales que afectan los estomas	17
III. MATERIALES Y METODOS	19
Localización geográfica del sitio experimental	19
Material biológico	19
Materiales	19
Soluciones nutritivas	19
Inductores de resistencia	21

Agua (testigo)	21
Ácido salicílico (AS)	21
Poliácido acrílico (PAA)	21
Quitósán (Q)	22
Complejo poliácido acrílico-quitósán (PAA-Q)	22
Diseño experimental	23
Establecimiento del experimento	24
Trasplante	24
Riegos	24
Aplicación de inductores de resistencia	25
Control fitosanitario	25
Toma de muestras y estudio estomático	26
Tratamiento de muestras para análisis histológico	27
Procedimiento	27
Fijación	27
Deshidratación	27
Infiltración e inclusión	27
Cortes en el micrótopo	28
Fijación de los cortes en los portaobjetos	28
Coloración	28
Selección de muestras para fotografía	29
Microfotografías	29
VARIABLES EVALUADAS	30
Anatomía de las hojas	30
Densidad estomática	30
Densidad celular	30
Índice estomático	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
V. CONCLUSIONES	48
VI. LITERATURA CITADA	50

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
3.1.	Estructura del ácido salicílico (AS) -----	21
3.2.	Estructura del poliácido acrílico (PAA) -----	21
3.3.	Estructura del quitosán (Q) -----	22
3.4.	Estructura del complejo poliácido acrílico-quitosán (PAA-Q)-	22
3.5.	Espectro de infrarrojo del complejo (PAA-Q) -----	23
3.6.	Croquis de los tratamientos -----	24
4.7.	Corte transversal testigo solución A y B. a 50x y 200x -----	31
4.8.	Corte transversal testigo y AS solución A y B. a 50x -----	32
4.9.	Corte transversal testigo y AS solución A y B. a 200x -----	33
4.10.	Corte transversal testigo y PAA solución A y B. a 50x -----	34
4.11.	Corte transversal testigo y PAA solución A y B. a 200x -----	35
4.12.	Corte transversal testigo y PAA-Q solución A y B. a 50x ----	36
4.13.	Corte transversal testigo y PAA-Q solución A y B. a 200x ---	37
4.14.	Corte transversal testigo y Q solución A y B. a 50X -----	38
4.15.	Corte transversal testigo y Q solución A y B. a 200X -----	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro		pagina
3.1.	Solución "A" Douglas Na/K 0.09 -----	20
3.2.	Solución "B" Douglas Na/K 0.63 -----	20
3.3.	Control de plagas y enfermedades -----	26
4.4.	Medidas de las áreas de los haces vasculares -----	40
4.5.	Medias densidad estomática en el haz -----	42
4.6.	Medias densidad estomática en el envés -----	43
4.7.	Medias densidad de células tabloides en el haz -----	44
4.8.	Medias densidad de células tabloides en el envés -----	45
4.9.	Medias índice estomático en el haz -----	46
4.10.	Medias índice estomático en el envés -----	47

RESUMEN

El agave azul se ha convertido en un cultivo importante, debido a la gran demanda de tequila. Por otra parte se encuentra actualmente sometida a grandes problemas derivados al parecer de patógenos que causan enormes pérdidas entre los productores, por lo que se ha buscado la manera de establecer nuevas plantaciones en diferentes estados y a la vez buscar alternativas para lograr plantas más sanas mediante una buena fertilización, riegos y la aplicación de inductores de resistencia que inducen la tolerancia al estrés abiótico modificando la morfogénesis y la composición química, siendo el objetivo de esta investigación documentar los valores promedio de densidad e índice estomático de la epidermis foliar de las plantas por medio de microscopía. Se manejaron 60 plantas en un invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista Saltillo, Coahuila, México localizado a 25° 22' latitud norte y 101° 00' longitud oeste y a una altura de 1742 msnm con una temperatura promedio de 19.8°C. Aplicándose soluciones Douglas con un balance Na/K de 0.09 y 0.63 a una razón de 1 L/ planta dos veces por semana (Factor a); además de la aplicación por aspersion a toda la planta de 5 inductores de resistencia a razón de 20 mL/planta (Factor b). Los tejidos fueron colectados del punto medio entre la base y el ápice de la hoja más joven totalmente expandida, las muestras se fijaron y procesaron. El estudio comprendió describir la organización de las células tabloides, la densidad e índice estomáticos. Se llevaron a cabo tres muestreos a diferentes fechas y se obtuvieron los promedios para cada variable en ambas superficies foliares (haz y envés). Los mejores resultados se obtuvieron con la solución nutritiva Douglas con un balance Na/K de 0.63. En cuanto a los tratamientos el quitosán fue el mejor en densidad estomática en el haz y en el envés un incremento de 12.83% y 9.47% respectivamente, siendo para el testigo (agua) el valor más alto en densidad de células tabloides en el haz e incrementando un 2.66% para el complejo poliácido acrílico-quitosán en el envés y obteniendo en índice estomático en el haz y en el envés un 14.28% en quitosán y 10.71% en poliácido acrílico respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

El agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) tiene su centro de origen en México y hay 136 especies conocidas, pero solamente una reúne las características para la elaboración del tequila, por ello su cultivo es importante en el estado de Jalisco, México, además de esto existe una demanda insatisfecha de *Agave tequilana* y a diferencia de otros cultivos requiere de 6 a 8 años para su maduración. Debido a la demanda de tequila, de 1990 a 1997 la superficie de cultivo aumento de 50,000 a 62,000 ha. Pero después de 1997 se redujo en un 26.5 % y en el año 2000 a 45,000 ha. Esta disminución se atribuye a diferentes causas; principalmente a plagas y enfermedades (CRT, 2000) como el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, el piojo harinoso *Pseudococcus* sp., el gusano blanco *Acetrocneme (Aegiale) hesperiaris* (Wlk), la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* y la pudrición del cogollo causada por *Erwinia* sp. (Flores, 2000). Por lo que el Consejo Regulador del Tequila considera que es necesario incrementar la superficie del cultivo a 100,000 ha.

Una adecuada fertilización del agave tequilero con potasio y calcio, proporciona altos rendimientos, plantas más sanas y piñas o cabezas con alto contenido de azúcares. Por otro lado la nutrición balanceada con sodio en especies del desierto se relaciona con una buena productividad. Por otra parte la aplicación de inductores de resistencia constituye una alternativa para el manejo de enfermedades. Dichos inductores pueden ser compuestos de bajo peso molecular como el ácido salicílico, o bien compuestos de alto peso molecular como el quitosán.

La resistencia sistémica inducida permite la adaptación de las plantas a diversos tipos de estrés incluyendo la presencia de patógenos. En diferentes trabajos se ha señalado que la aplicación exógena de quitosán permite aumentar las lecturas de transcriptos de los genes relacionados con la patogénesis, disminuyendo la susceptibilidad al daño del patógeno presente. Aunque, en la mayoría de ellos no se reporta el efecto sobre la morfogénesis y la productividad de la planta.

Debido a que existe poca información acerca de la modificación en la fertilización del *Agave tequilana* y del efecto de la aplicación exógena de inductores de resistencia, se pretende implementar una tecnología para el mejor manejo de la nutrición y la fitosanidad, con impacto en la productividad y en el tiempo de cosecha de la planta. Por ello, es necesario tener conocimiento de las características morfológicas y fisiológicas de la epidermis vegetal.

En el presente estudio se documentan los valores promedio de densidad e índice estomático, así como las características anatómicas de la epidermis foliar de la planta de *Agave tequilana* Weber por medio de microscopia.

Objetivo

Determinar la densidad y el índice estomático en el haz y el envés y los cambios en la anatomía vascular de las hojas de *Agave tequilana* Weber tratadas con dos soluciones nutritivas con diferente balance Na/K y con la aplicación de inductores de tolerancia.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Agave tequilana Weber var. Azul

Factores que limitan su crecimiento

Temperatura

La temperatura puede influir en los procesos fisiológicos básicos, como fotosíntesis y respiración, que determinan en gran parte la cantidad de azúcares que se forman en las hojas y que posteriormente se almacenan en la piña. Trabajos previos en especies CAM como en *A. tequilana*, *Opuntia ficus-indica* y *Stenocereus queretaronensis*, han revelado que las temperaturas cálidas reducen la fotosíntesis e incrementan la respiración (Nobel *et al.*, 1998; Pimienta-Barrios *et al.*, 2000). También se ha encontrado que el *A. tequilana* es una planta sensible al daño por temperaturas bajas (- 7°C), Nobel *et al.* (1998).

Luminosidad

La luz es un factor ambiental importante para la realización de la fotosíntesis en las plantas CAM (Gibson y Nobel, 1986). Sin embargo la evaluación estacional de la actividad fotosintética de *A. tequilana* en Arandas, Jalisco revelo que el valor más alto de fotosíntesis se obtuvo en septiembre de 1998, el mes con el promedio diario más bajo de Flujo fotosintético de fotones (FFF) con $512 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una tasa de asimilación neta diaria de CO₂ alta con $763 \text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ con temperaturas promedio día/noche frescas (22/16°C), (Ruíz-Corral *et al.*, 2002).

Sanidad

Investigadores de la U. de G. y del CP reportaron como agente causal de la pudrición del tallo a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa* y de la pudrición del cogollo a las bacterias *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas sp.* El Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la U. de G. evaluó en

campo diferentes moléculas para el problema de pudrición del cogollo encontrando buenos resultados al aplicar sulfato de cobre pentahidratado. El CRT, el CIATEJ, BASF México y BUCMAN LABORATORIES realizaron un trabajo de laboratorio para corroborar la presencia de *E. Carotovora* y *F. oxysporum* en hijuelos asintomáticos de Agave.

En cuanto al mejoramiento genético el CIATEJ cuenta con grandes cantidades de embriones producto de mutagénesis, los cuales resistieron las presiones de toxinas de algunos patógenos, además desarrolló investigaciones y técnicas dirigidas a la propagación “*in vitro*” para obtener gran cantidad de plantas de agave resistentes o tolerantes a patógenos (Aguirre, 2000).

Fertilización

El agave es un cultivo capaz de adaptarse a suelos delgados poco profundos, pedregosos e inapropiados para otros cultivos; sin embargo no por ello se debe creer que es una planta con bajo requerimiento de nutrientes. En suelos con un alto contenido calcáreo y un buen contenido de nutrientes, se alcanza una buena calidad y un rendimiento alto. Suelos arenosos muy pobres, pueden proporcionar rendimientos remunerativos solo si se fertilizan con potasio y cal. La extracción total estimada de nutrientes que realiza la planta durante su período de aprovechamientos de 6 años y para una población de 3,200 plantas/ha es de: 284 Kg de N, 108 Kg de P₂O₅, 614 Kg de K₂O, 84 Kg de Mg y 780 Kg de Ca. La elevada extracción de calcio implica el porque esta planta rinde bien en suelos especialmente calizos y con un pH del suelo entre 7.0 a 8.0. Una deficiencia de calcio puede causar síntomas posiblemente de virus (moteado de hoja), así como la pudrición del tallo esta asociada con la mala nutrición en base al calcio. La adecuada fertilización potásica constituye una buena alternativa para lograr plantas mas sanas, piñas o cabezas con mayor contenido de azúcares y menor dureza de sus fibras (Chirinos, 2000).

Laboratorios A & L de México (2000) basándose en numerosos análisis foliares efectuados en agave, han establecido los rangos normales que debe presentar la planta cuando se encuentra bien nutrida y con un perfil óptimo de rendimiento. El nivel de nutrientes foliar adecuado para un Agave de 5 a 6 años de edad es de: 1.50-3.50 % de N; 0.10-0.20 % de P; 1.80-3.00 % de K; 3.0-4.0 % de Ca; 0.50-1.0 % de Mg; 0.10-0.25 % de S; 50-200 ppm de Fe; 30-100 ppm de Mn; 8-20 ppm de Cu; 15-50 ppm de Zn y de 20-80 ppm de B.

Importancia del sodio

El sodio no es un elemento esencial, pero se considera como un micronutriente, pues existen evidencias de que el sodio es necesario para numerosas especies del desierto, como *Atriplex vesicaria* (Salisbury, 1994).

Salisbury, (1994) menciona que el sodio es necesario para el funcionamiento de las plantas con ciclo C₄ en las cuales genera CO₂ y las células de la vaina del haz para ser reducido a carbohidratos, sobre esta base podría decirse que el sodio es esencial para las especies C₄ en especial cuando crecen en concentraciones de CO₂ relativamente bajas como las que existen en el aire normal. Pero si no se aplica sodio a las plantas en atmósferas con concentraciones altas de CO₂, no se observa ninguna deficiencia, o si se aplica sodio en atmósferas con concentraciones altas de CO₂, las plantas muestran poca o ninguna respuesta dado que el CO₂ penetra por difusión en las células de la vaina del haz.

Satti *et al.*, (1996) mencionan que en bajas cantidades el sodio estimula el crecimiento y el desarrollo de las plantas, valores muy altos se relacionan negativamente con la productividad y la calidad.

Importancia del potasio

Se considera un elemento esencial para las plantas, ya que tiene una influencia directa sobre su metabolismo, de manera que su presencia resulta determinante para continuar el ciclo biológico y no puede ser reemplazado por otro (Pérez *et al.*, 1994).

El potasio es vital para la fotosíntesis. Cuando existe deficiencia de K, la fotosíntesis se reduce y la respiración de la planta se incrementa. Cuando se presentan estas dos condiciones (reducción en la fotosíntesis e incremento en la respiración), existe deficiencia de K y por ende disminución en el crecimiento y en la producción de la planta (AGROPECT star, 2002).

El potasio es un mineral activador de enzimas que contribuye de manera importante al potencial osmótico de las células y, por consiguiente a su presión de turgencia (Salisbury, 1994).

Además el K ayuda a controlar el balance iónico, es importante en la translocación de metales pesados como el hierro, ayuda a la planta a resistir los ataques de plagas y enfermedades, mejora la resistencia de la planta a las sequías y heladas; además está involucrado en la activación de más de 60 sistemas enzimáticos que regulan las principales reacciones metabólicas de la planta (AGROPECT star, 2002).

Ácido salicílico (AS)

El ácido salicílico es muy conocido gracias al extenso uso clínico de la aspirina o ácido acetilsalicílico. El nombre de ácido salicílico proviene de *Salix*, el árbol cuyas hojas y corteza tradicionalmente se utilizaban como cura para el dolor y la fiebre, y del cual Johann Buchner en 1828 aisló la salicina. En 1874 se inició la producción comercial de AS en Alemania, mientras que el nombre comercial de aspirina, aplicado al ácido acetilsalicílico fue propuesto en 1898 por la Bayer Company (Raskin, 1992).

El ácido salicílico se obtiene por medio del tratamiento de la sal de un fenol con dióxido de carbono, que produce el reemplazamiento de un hidrógeno anular por el grupo carboxilo, conociéndose esta reacción con el nombre de Kolbe, mediante la cual se obtiene el ácido ortobenzoico o ácido salicílico (López, 1984).

Efectos del ácido salicílico (AS)

Entre los principales efectos del ácido salicílico en las plantas se encontró la inhibición de la germinación o del crecimiento de la raíz y el coleoptilo (Saxena y Rashid, 1980), lo que provoca cierre de estomas y reducción de la transpiración (Larque-Saavedra, 1975), mantiene turgente los estomas y los pulvinolos (Saeedi *et al.*, 1984), altera la permeabilidad de los tilacoides (Bell, 1981), aumenta la vida de anaquel en las flores cortadas, probablemente por un efecto combinado de inhibición en la biosíntesis del etileno y la celulasa en los tejidos (Ferrarese *et al.*, 1996) y de la acidificación del medio. Se sabe que el AS presenta propiedades de retraso de la senescencia (Bourbouloux *et al.*, 1998), es inductor de la floración y tuberización así como compuesto termogénico y alelopático, entre otras (Raskin, 1992).

El ácido salicílico aplicado de forma exógena a una concentración de 10^{-2} a 10^{-8} M aumentó la biomasa de plantas de soya (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998) y el rendimiento de trigo (López *et al.*, 1998). Además se demostró su importancia en las reacciones de defensa contra los patógenos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Asimismo, el AS se relaciona con la adaptación de las plantas a los ambientes extremos, y esto pudiera convertir a este compuesto y sus derivados en herramientas para el manejo agronómico del estrés (Benavides, 2002).

Ácido salicílico y el control de patógenos

La aplicación exógena de ácido salicílico (AS) da lugar a una respuesta de resistencia sistémica adquirida (RSA) por lo cual se dice que el AS funciona como activador o inductor de este proceso. De hecho en el tabaco la aplicación de AS o de partículas del Virus del Mosaico del Tabaco (VMT) da lugar a la inducción de prácticamente las mismas proteínas de defensa (Kang *et al.*, 1998).

Un nuevo enfoque en el control y prevención de enfermedades es el uso de compuestos activadores de la resistencia sistémica adquirida (RSA), tales como el ácido salicílico (AS), sus derivados y sus análogos funcionales. Estos activadores o inductores no tienen un efecto directo sobre el patógeno, protegen a la planta

desencadenando las cascadas de señales que activan la RSA, actuando así de forma diferente a los agroquímicos convencionales (Gorlach *et al.*, 1996; Stichter *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1999; Gullino *et al.*, 2000).

Poliácido acrílico (PAA)

Los poliácidos acrílicos, sus copolímeros con otros monómeros y sus sales metálicas, todos ellos hidrofílicos, se utilizan en numerosas aplicaciones, algunas de las cuales son las siguientes: tratamiento general de aguas y de aguas residuales, aditivos para aguas de calderas, su uso como pañales superabsorbentes, resinas de intercambio iónico, adhesivos industriales, aplicación en perforaciones petrolíferas y en agricultura, en las industrias textil, cosmética, papelera, cerámica y del cemento, así como en la liberación controlada de medicamentos.

Es evidente que la aplicación de estos polímeros está directamente relacionada con su estructura química, funcionalidad y masa molecular. Los poliácidos acrílicos se usan parcialmente neutralizados y, puesto que la sal ionizada interacciona con mayor número de moléculas de agua que los grupos ácido sin neutralizar, se produce la mayor viscosidad o mayor grado de hinchamiento al aumentar el pH de la disolución acuosa, siendo esta característica de gran utilidad cuando se pretende usar estos polímeros como espesantes o absorbentes.

El mercado del poliácido acrílico puede dividirse de la forma siguiente: 52.9% para polímeros superabsorbentes; 18.4% como aditivos de detergentes; 17.1% para dispersantes industriales; 7.8% como productos químicos para el tratamiento de aguas (principalmente inhibidores y captadores) y 3.8% como componentes espesantes y para revestimientos. Geográficamente, el 48.2% del poliácido acrílico se utiliza en USA y Canadá; el 31.3% en Europa Occidental y el 20.5% en Japón.

Con respecto al mercado, el crecimiento medio esperado se aproxima al 7% anual, con fuertes incrementos en los sectores de superabsorbentes y aditivos para detergentes.

Quitosán

El quitosán (poli-D-glucosamina) es un polisacárido de cadena lineal y se obtiene mediante la desacetilación extensiva de la quitina. Es un homopolímero presente en el caparazón de los crustáceos, moluscos, en la cutícula de los insectos y como constituyente de la pared celular de muchos hongos (Rathke *et al.*, 1994). Es un polímero catiónico de alto peso molecular, soluble en ácidos orgánicos (Miranda *et al.*, 2002) biocompatible, biodegradable, de baja toxicidad (Cárdenas *et al.*, 2002) y puede utilizarse como agente antifúngico o bien como inductor de respuesta de defensa de las plantas (Shigemasa, 1995).

Los grupos amino libres del quitosán le confieren propiedades importantes como polielectrolito lineal con alta densidad de carga (la carga positiva interactúa fuertemente con la carga negativa para dar un compuesto neutro), es un excelente floculante, se adhiere a superficies cargadas negativamente, aditivo para el cabello y la piel (Mikheikin *et al.*, 1997).

Cárdenas *et al.* (2002) utilizaron quitosán para el encapsulamiento de pesticidas, logrando obtener biocidas con 1-2% de ingrediente activo en las microesferas, con esto eliminaron el uso de grandes cantidades de pesticidas, el efecto de la dilución por lluvia y el riesgo de contaminación de las capas subterráneas del suelo.

Karasuda *et al.* (2002) asperjaron quitinasa sobre un cultivo de fresa, una semana después de la aplicación se logró controlar el mildiu *Sphaerotheca humuli*.

Salvador *et al.* (1999) recubrieron aguacate Hass con quitosán y lograron conservar el fruto en buen estado hasta por 6 meses, logrando además inhibir el crecimiento de microorganismos que causan la antracnosis y la pudrición del pedúnculo.

Para el tratamiento de semillas se utilizó quitosán como un agente antifúngico y como un inductor de genes que ayuda a la planta a la resistencia contra

enfermedades. Otro de sus usos es como nematocida, la quitina estimula el crecimiento de los microorganismos y las enzimas en el suelo. Las enzimas destruyen los huevos de nematodos que atacan el algodón, hortalizas, árboles frutales y cítricos (Meron Biopolymers, 1997).

Hadwiger *et al.* (1984) e Hidalgo *et al.* (1996) comprobaron que el quitosán induce una mayor germinación y rendimiento de los cultivos de cereal y tomate.

Complejos interpolielectrolíticos no-estequiométricos (CPEN).

Los complejos interpolielectrolíticos no-estequiométricos (CPEN) son el producto de las interacciones entre las macromoléculas de cargas opuestas. Estas interacciones iónicas son de una naturaleza cooperativa distinta que es la responsable de la estabilidad relativamente alta de los CPEN con respecto a su disociación en los polielectrolitos que lo constituyen. Es conocido que la estabilidad de los CPEN depende drásticamente de la concentración de las sales de bajo peso molecular en el sistema. La unión de las macromoléculas de cargas opuestas conduce a la liberación correspondiente de los iones pequeños que fueron previamente asociados a los poliiones. Por consiguiente el equilibrio es favorecido hacia la disociación del CPEN a concentraciones altas de sal, pero a favor de la formación del CPEN a concentraciones bajas de sal. Los CPEN son compuestos macromoleculares anfifílicos, ya que contienen sitios hidrofóbicos e hidrofílicos. Los sitios formados por la unión de las contrapartes poliiónicas son lo bastante hidrofóbicos por el apantallamiento mutuo de las cargas de los poliiones. Los sitios hidrofílicos son las unidades del polielectrolito que no están involucradas en las interacciones iónicas entre las macromoléculas de cargas opuestas (Pergushov, 1996).

Complejo Poliácido acrílico-Quitosán (PAA-Q).

El complejo de poliácido acrílico-quitosán se comporta como un activador específico dependiendo del peso molecular del quitosán. Además de que activa al mismo tiempo los mecanismos de defensa en la planta como fue observado un efecto positivo en el crecimiento de plantas de lechuga y en el peso del bulbo de la cebolla las

cuales fueron sometidas a estrés hídrico y salinidad; donde se usaron aplicaciones del complejo de poliácido acrílico-quitosán (PAA_L-Q) al 0.1 % (v/v) con PAA de bajo peso molecular en agua con 5 g·L⁻¹ de NaCl (Benavides *et al.*, 2004).

Ortega *et al.*, (2003 a) demostraron que los complejos de poliácido acrílico de peso molecular alto y quitosán (PAA_H-Q) y poliácido acrílico de peso molecular bajo y quitosán (PAA_L-Q), tuvieron un efecto positivo en el número de semillas germinadas y emergidas de cebolla y lechuga; así como el peso, el crecimiento y la biomasa cuando el sustrato fue inoculado con diferentes patógenos como *Fusarium oxysporium* y *Phytophthora capsici*.

Estomas

Los estomas son aperturas en la epidermis rodeadas por dos células oclusivas y la abertura situada entre ellas. Mediante cambios de forma, las células oclusivas controlan el tamaño de la apertura. Esta apertura conduce al interior de un amplio espacio intercelular llamado *cámara subestomática*, que continua con los espacios intercelulares del mesófilo.

En muchas plantas, dos ó más células adyacentes a las oclusivas parecen estar asociadas funcionalmente a ellas y se distinguen por su morfología de otras células epidérmicas, se les llama *células anexas o adjuntas*. Las células oclusivas son generalmente de forma arriñonada vistas de frente y engrosamiento de la membrana en los bordes superior e inferior.

Gentry y Sauck (1978) incluyen dentro del complejo estomático a las células adjuntas que las rodean. Este complejo esta comprendido por cuatro células epidérmicas (dos células polares y dos células laterales) asociadas a las células oclusivas. Salisbury (1992), se refiere a este complejo como “aparato estomático”. Este concepto incluye a las células oclusivas y junto a cada una de ellas, la presencia de

una o varias células epidérmicas modificadas conocidas con el nombre de células subsidiarias o accesorias, anexas o adjuntas (Esau, 1977).

Los estomas son muy frecuentes en las partes verdes aéreas de las plantas, particularmente en las hojas. En las hojas verdes se presentan en una o ambas caras de la hoja, pero principalmente sobre la superficie abaxial. (Esau, 1976).

Volkens (1887) observó que en algunas plantas desérticas los estomas de los órganos fotosintéticos están cerrados permanentemente durante la estación estival. El cierre es originado algunas veces por el engrosamiento adicional y cutinización de las paredes de las células estomáticas, otras por un bloqueo resinoso de los estomas hundidos y otras por capas de cera que los taponan.

En las hojas el agua no es conducida sólo por las venas y extensiones de la vaina del haz, sino también por las células del mesófilo y la epidermis. El transporte de agua hacia la epidermis es mucho mayor a través del tejido en empalizada que a través del parénquima esponjoso (Fahn, 1978).

Las especies del género *Agave* poseen epidermis típicas de plantas adaptadas a condiciones de aridez, con cutícula gruesa, revestimiento ceroso y estomas complejos. En promedio se ha registrado que la cutícula mide de 3 a 15 μm de espesor (Nobel, 1988).

La cutícula de la superficie foliar de las especies del género *Agave* esta interrumpida por la presencia de poros estomáticos, los estomas formados por un par de células oclusivas y la abertura situada entre estas son canales de comunicación e intercambio gaseoso (Willmer, 1983). Los estomas en *Agave* se presentan en ambas superficies de la hoja, (Gentry y Sauck, 1978; Nobel, 1988).

Densidad estomática

La frecuencia o densidad estomática, que es el número de estomas por unidad de área (mm^2), presenta una gran variación, por lo que puede diferir entre plantas de la misma especie, entre hojas de la misma planta y entre sectores de una misma hoja (Esau, 1972).

Comparativamente, la densidad estomática de las especies del género *Agave* es inferior a la densidad presente en otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas. En estos grupos los valores comunes alcanzan de 100 a 300 estomas mm^{-2} , en maíz, alfalfa y tomate la densidad estomática adaxial (haz) oscila entre 25 y 169, mientras que en la superficie abaxial (envés) los valores van de 23 a 203 estomas mm^{-2} (Verdugo *et al.*, 1999). En otras especies como el manzano es posible encontrar valores superiores a 1,000 estomas mm^{-2} (Rodríguez-Aranda *et al.*, 2002). Para el trigo (*Triticum aestivum*) se reportaron rangos de 84 a 132 y de 74 a 95, adaxial y abaxial, respectivamente (Benavides *et al.*, 2003).

Índice estomático

Número de estomas por cada 100 células epidérmicas

Estructura de las hojas

En muchas hojas las estructuras de sostén no están tan desarrolladas como en el tallo, y gran parte de la robustez de tales hojas depende de la disposición de las células y tejidos. Las hojas de las monocotiledóneas forman relativamente gran cantidad de esclerénquima, en forma de fibras, en asociación con los haces vasculares. La epidermis puede tener células largas de membrana gruesa, situadas por encima de los cordones del esclerénquima, de forma que todo éste y los haces vasculares forman a manera de vigas que atraviesan el espesor del limbo.

La epidermis ofrece considerable sostén debido a su disposición compacta y a sus membranas relativamente gruesas impregnadas de cutina y con una fuerte cutícula dispuesta encima de la superficie externa. (Esau, 1976).

Estructura anatómica e histológica de la planta

Los componentes morfofisiológicos que regulan en parte la transpiración de las plantas se encuentran en las hojas. Los elementos principales de las hojas son la epidermis y la cutícula. La primera es la envoltura de una sola capa de células que regula el movimiento de agua y gases a través de la superficie de la hoja. En la parte inferior de la epidermis se encuentran generalmente numerosos estomas que regulan tanto la pérdida de agua en forma de vapor como la entrada de CO₂ para la fotosíntesis.

La cutícula se encuentra sobre la epidermis y es una delgada capa de cera secretada por la misma epidermis, que ayuda a proteger a la planta de la deshidratación y algunos patógenos (Lira, 1994).

El mesófilo, o parte media de la hoja, es el sistema fundamental de la misma. Se pueden reconocer dos componentes principales del mesófilo: el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso. El primero consiste de células en una pared delgada de forma cilíndrica y alargada con numerosos cloroplastos; lo que representa el tejido fotosintético de la hoja. El parénquima en empalizada está formado de células empaquetadas, unidas unas con otras, con espacios muy pequeños de aire entre ellas. Las células de pared delgada que forman el parénquima esponjoso son de forma muy irregular y se ubican desordenadamente en el interior de la hoja, formando grandes paquetes de aire que crean una continuidad gaseosa en el interior del mesófilo. Es aquí donde ocurre el intercambio de CO₂ y O₂ (Lira, 1994).

Atravesando el mesófilo de la hoja, se encuentran los tejidos conductores de agua y nutrientes, formados por venas muy notorias que, en parte, constituyen el

xilema y el floema de la planta. Cada vena está rodeada de tejido parenquimatoso, el cual forma un manojo de células a su alrededor.

Las monocotiledóneas tienen más o menos la misma cantidad de estomas en el haz (superficie adaxial) y en el envés de las hojas (superficie abaxial) donde las células son elongadas (Lira, 1994).

La apertura de los estomas se debe a que las células guarda se hinchan cuando entra agua a su interior. Puede suponerse que, cuando estas células se hinchan, el estoma se cerrará en lugar de abrirse; sin embargo, los estomas funcionan al revés, debido a la anatomía de sus paredes celulares. Las microfibrillas de celulosa que forman la pared celular se encuentran alrededor de la circunferencia de las células guarda; su orientación es radial, desde el exterior de la célula centro del estoma. Este arreglo de las microfibrillas se denomina *micelación radial*. Cuando la célula guarda se expande como consecuencia de la absorción del agua, no se incrementa mucho en diámetro, pero sí se alarga; por lo tanto, la célula guarda forma una curvatura parcial debido a su unión con una compañera en ambos extremos (Lira, 1994).

Sistema vascular

La disposición de los haces vasculares, esto es, la *venación*, imprime una apariencia característica de las hojas. En las monocotiledóneas, los haces longitudinales pueden ser casi del mismo grosor o presentar tamaños distintos, alternando las venas más grandes con las más pequeñas. Los haces más grandes contienen xilema y floema en cantidad comparable a la de los haces del pecíolo o de la traza foliar (Esau, 1976).

Cuando la transpiración aumenta, la demanda de un suministro mayor de agua hacia las hojas se transmite a las raíces mediante un descenso en el potencial hídrico de la savia del xilema, lo cual causa un aumento en la absorción. A la inversa, cuando la absorción de agua se reduce, la información llega rápidamente a las hojas en forma de un descenso del potencial hídrico de la savia del xilema, que causa una pérdida de turgencia en las células guarda y consecuentemente los estomas se cierran.

Esto tiene por resultado un descenso de compensación en la pérdida de agua por transpiración. En conjunto, el sistema o tejido conductor continuo de las plantas funciona con bastante eficacia para transportar agua, nutrientes y los fotosintatos elaborados en las plantas (Lira, 1994).

Xilema. El xilema es el principal tejido conductor de agua y sirve también como tejido de sostén. La conducción de agua es en dirección acropeta. El xilema es un tejido complejo constituido por varios tipos de células: elementos traqueales, fibras y parénquima (Esau, 1972).

Floema. El floema es el principal tejido conductor de material alimenticio, efectuándose la conducción en direcciones basipeta o acropeta. Al igual que el xilema, el floema es un tejido complejo constituido por diferentes elementos, cribosos, células acompañantes, fibras, esclereidas y células parenquimatosas, sin embargo no tiene gran valor comercial a excepción de las fibras comerciales (Esau, 1972).

Factores ambientales que afectan los estomas

Los estomas de la mayoría de las plantas se abren al amanecer y se cierran al anochecer, permitiendo la entrada de CO₂ durante el día para el proceso fotosintético. Los estomas se abren completamente en aproximadamente una hora, mientras que se cierran gradualmente en el transcurso de la tarde. Los estomas se cierran más rápidamente si las plantas se ponen directamente en la oscuridad. Ciertas plantas suculentas, nativas de ambientes áridos y secos (cactus), actúan de una manera opuesta: abren sus estomas en la noche, fijan dióxido de carbono en ácidos orgánicos en la oscuridad y cierran sus estomas durante el día. Esta manera de absorber CO₂ a través de los estomas abiertos durante la noche y conservar agua es muy adecuada, debido a la poca o nula transpiración durante el día. (Lira, 1994).

La densidad lumínica influye no sólo en la velocidad de apertura de los estomas, sino también en la abertura total del poro.

Las bajas concentraciones de CO₂ causan que los estomas se abran; por lo tanto, la remoción de CO₂ de las células del parénquima y el mesófilo durante la fotosíntesis es la principal razón de que los estomas de la mayoría de las especies se abran con la luz. Por otro lado, las plantas suculentas fijan CO₂ durante la noche y esto también causa la apertura estomática. Si se aplica CO₂ en hojas de plantas que no sean suculentas, sus estomas se abren ampliamente, incluso de noche. Contrariamente, las concentraciones muy altas de CO₂ provocan el cierre de los estomas durante el día y la noche. (Lira, 1994).

El potencial total de agua en el tejido de las hojas también ejerce un poderoso control sobre la apertura y cierre de los estomas. A medida que el potencial hídrico decrece (y se incrementa la tensión hídrica), el estoma se cierra. Este efecto predomina sobre los niveles bajos de CO₂ o sobre la luz brillante; es de gran valor para las plantas pues los protege de la sequía.

Las altas temperaturas generalmente promueven el cierre estomático; esto puede deberse a la tensión hídrica o al incremento en la respiración, que tiende a aumentar la concentración de CO₂ en el interior de la hoja. Sin embargo, en algunas plantas adaptadas al desierto las temperaturas altas causan que los estomas se abran en lugar de cerrarse.

Los vientos fuertes incrementan la transpiración, que promueve pérdidas de agua por las hojas y que los estomas tiendan a cerrarse. Por el contrario, las brisas suaves causan una mayor apertura de los estomas. (Lira, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización Geográfica del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en un invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” (UAAAN), en Buenavista Saltillo, Coahuila, México; localizado entre los paralelos 25°22’ de latitud norte y los meridianos 101°103’ de longitud oeste y a una altura de 1743 msnm.

Material biológico

Se utilizaron 60 plantas de *Agave tequilana* Weber obtenidas en forma de hijuelos de primera generación.

Materiales

Se utilizaron macetas plásticas de 20 L con turba canadiense como sustrato. Como fertilizantes se aplicaron dos soluciones nutritivas con diferente balance sodio/potasio de acuerdo con lo descrito por Douglas (1976). Asimismo, se utilizaron cinco inductores de resistencia descritos más adelante.

Soluciones nutritivas

La composición química de las soluciones nutritivas usadas en este trabajo se muestra en los cuadros 3.1. y 3.2.

Cuadro 3.1. Composición y concentración de la solución Douglas o testigo (Solución A). Balance sodio/ potasio de 0.09

Compuesto	Dosis (g /100 L de agua)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	17.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5
KNO_3	12.5
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005
H_3BO_3	0.025
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{H}_2\text{Mo}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.00005
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.5

Cuadro 3.2. Composición y concentración de la solución Douglas + Na (Solución B). Balance sodio / potasio de 0.63.

Compuesto	Dosis (g/100 L de agua)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5
KNO_3	10.0
NaNO_3	7.5
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005
H_3BO_3	0.025
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{H}_2 \text{Mo}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.00005
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.5

Inductores de resistencia:

Agua (testigo).

Ácido salicílico. Figura 1. AS grado reactivo (Marca ALQUIME) proporcionado por el Laboratorio del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".

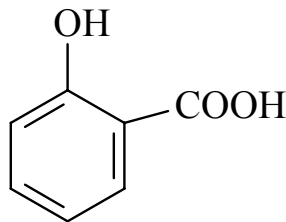


Figura 3.1. Estructura química del ácido salicílico.

Poliácido acrílico (PAA). Figura 2. Polímero sintetizado en solución en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), con un peso molecular viscosimétrico (Mv) de 212,000 determinado por viscosimetría usando como solvente el 1,4-dioxano a 30°C en un viscosímetro Ubbelohde.

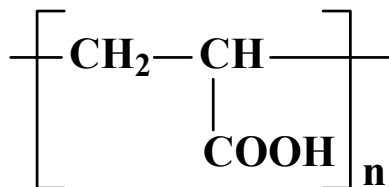


Figura 3.2. Estructura química del poliácido acrílico.

Quitosán. Figura 3. Polisacárido natural marca CarboMer, obtenido a partir de caparazones de cangrejo. Peso molecular promedio de 650,000 determinado en el CIQA por viscosimetría en ácido acético 0.2M/ acetato de sodio 0.1M a una temperatura de 30°C.

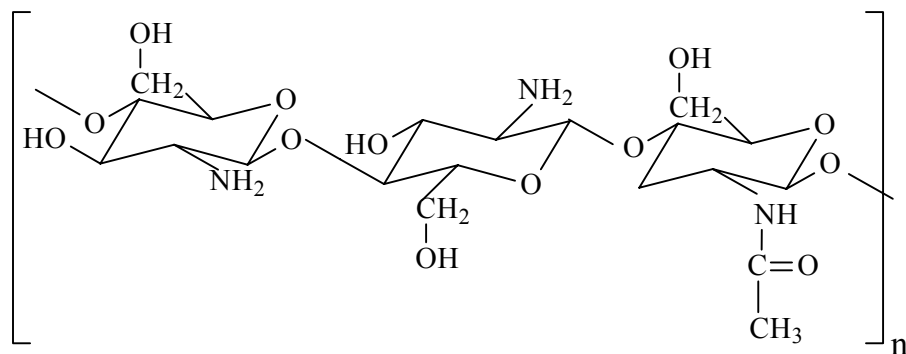


Figura 3.3. Estructura química del quitosán.

Complejo de poliácido acrílico y quitosán. El complejo (PAA-Q) fue preparado en el CIQA con una composición de 0.3, pH de 7.4 en agua al 1%. Para su aplicación en las plantas además se agregó KNO₃ para ayudar a la formación del complejo (Figura 4).

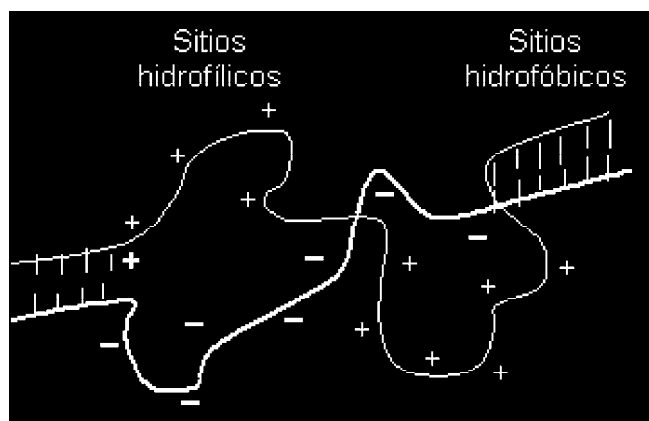


Figura 3.4. Estructura química del complejo de poliácido acrílico y quitosán.

El espectro de infrarrojo para caracterizar el complejo (PAA-Q) (Figura 5) muestra las señales características del polianión (PAA) a 1400 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} para el carboxilato ($-\text{COO}^-$) y para el polication (Quitósán) a 2500 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} el grupo amonio ($-\text{NH}_4^+$).

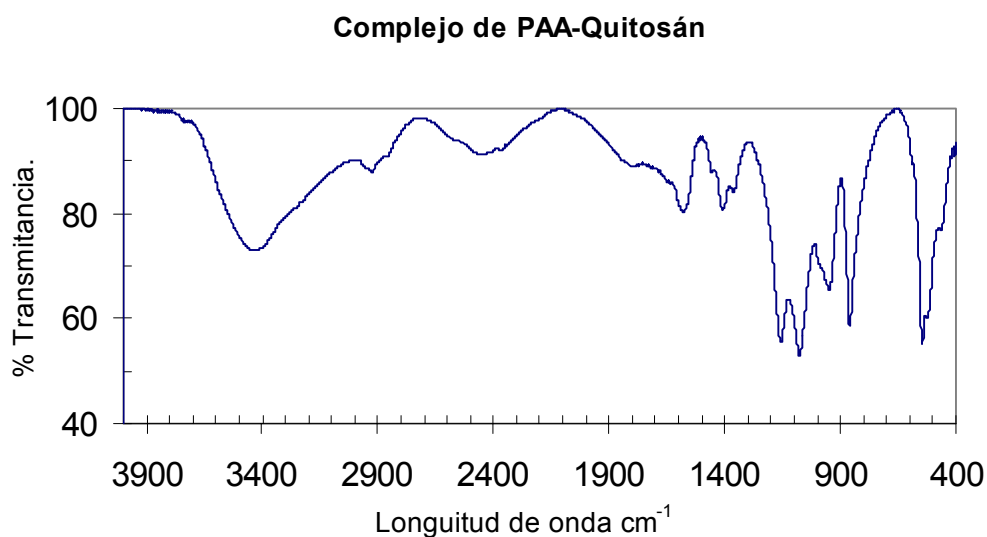


Figura 3.5. Espectro de infrarrojo del Complejo PAA-Quitósán.

Diseño experimental

Para esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar, usando dos soluciones nutritivas: Douglas y Douglas enriquecida con sodio (Cuadro 3.1. y 3.2.), 5 tratamientos con inductores de resistencia y 6 repeticiones por tratamiento, cada planta representaba una repetición. Los datos fueron analizados con análisis de varianza y prueba de medias de tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el Programa Statistica.

Establecimiento del experimento

—————→ N

SOLUCIÓN A							SOLUCIÓN B						
	Repeticiones							Repeticiones					
Tratamiento	1	2	3	4	5	6	Tratamiento	1	2	3	4	5	6
4	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	3	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	4	X	X	X	X	X	X
1	X	X	X	X	X	X	2	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	5	X	X	X	X	X	X

Figura 3.6. Croquis de ubicación de los tratamientos.

Trasplante

Se realizó el 10 de febrero del 2002 en macetas de 20 L, haciéndose la inducción del enraizamiento con raizal. Se le daba más espacio cada que incrementaban el área de cobertura de la planta.

Riegos

El primer riego de trasplante fue el día 10 de febrero del 2002 con agua corriente y se aplicó 1 litro por planta. A partir del 21 de abril del 2002 y hasta el 10 de mayo del 2003 se aplicaron las soluciones nutritivas vía riego, aplicando 1 litro de solución / planta dos veces por semana. Las aplicaciones se interrumpieron en dos ocasiones: la primera del 29 de noviembre del 2002 al 16 de enero del 2003 y la segunda del 15 de febrero al 15 de marzo del mismo año. Se utilizó un tonel de 200 litros para preparar cada solución.

Aplicación de los inductores de resistencia

Se hicieron 5 tratamientos de los cuales se usaron 4 inductores de resistencia que se aplicaron mediante aspersión foliar cada 15 días, a partir del 21 de abril del 2002 y hasta el 10 de mayo del 2003. Las aplicaciones se suspendieron en dos ocasiones: la primera del 29 de noviembre del 2002 al 16 de enero del 2003 y la segunda del 15 de febrero al 15 de marzo del mismo año.

Las concentraciones de uso para cada tratamiento fueron las siguientes:

- 1.- Agua 120 mL / 6 plantas.
- 2.- Ácido salicílico 10^{-4} M (0.038 g / litro) 120 mL / 6 plantas.
- 3.- Complejo PAA–Quitósán al 1%, 120 mL / 6 plantas.
- 4.- Poliácido acrílico al 0.05%, 120 mL / 6 plantas.
- 5.- Quitósán al 0.05% en ácido acético al 1%, 120 mL / 6 plantas.

Control fitosanitario

Para el control de las malezas se colocó acolchado plástico de color negro bajo las macetas para evitar que estas emergieran. Las malezas que salieron en cada maceta se eliminaron manualmente.

Las plagas y enfermedades que se presentaron durante el periodo del experimento y su control se presentan en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Calendario de aplicación de los pesticidas para el control de plagas y enfermedades.

Plaga	Control	Fecha de aplicación	Dosis
<i>Macconellicoccus hirsutus</i>	Estreptomicina	14 / agosto / 2003	1 g /planta
<i>E. carotovora</i> y <i>Fusarium sp</i>	Sulfato de cobre pentahidratado	9 / septiembre / 2003	5 mL /1 L de agua

Toma de muestras para estudio estomático

La toma de muestras se realizó el 03 de octubre, 05 de diciembre 2003 y el 19 de enero 2004, en donde se eligieron 2 plantas al azar por tratamiento haciendo un total de 20 plantas por muestreo. En cada planta se tomaron impresiones foliares en el haz y en el envés de la hoja mas juvenil totalmente expandida (hojas con orientación al oriente) utilizando cemento PVC común transparente superior. El cemento en forma liquida se aplica sobre la superficie foliar y se deja secar. La muestra es extraída con un trozo de cinta adhesiva transparente, la cual se adhiere posteriormente sobre un portaobjetos de vidrio el cual se observa al microscopio. En cada impresión foliar se realizaron conteos de estomas y células tabloides en 3 campos del microscopio elegidos al azar.

Para determinar la densidad estomática se saca primero el diámetro del campo visual (ocular) para esto se divide el diámetro del ocular entre el objetivo, (10x / 40x) el cual se utiliza para sacar el área. Se procede para transformar con un regla de tres para determinar el número de estomas (mm²).

Los cortes y análisis histológicos se realizaron en el Laboratorio de Citogenética ubicado en el Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN; los principales materiales utilizados fueron : un micrótopo de mano “820” Spencer, American Optical, microscopio compuesto Carl Zeiss de fotografía, estufa GCA Precisión Scientific THELCO modelo 18, para control de la temperatura.

Tratamiento de muestras para análisis histológico

Para el trabajo de microtomía se realizaron cortes transversales de la hoja más juvenil totalmente expandida con orientación al oriente por tratamiento. El procedimiento se compone de varias etapas que se explican a continuación.

Fijación

Se utilizaron frascos de 50 mL que contenían el fijador FAA (ácido acético glacial 5 cc, alcohol al 70 %, 90 cc, formaldehído 36.40 %, 5 cc). El efecto del fijador es conservar los tejidos con un mínimo de alteraciones. Las muestras se colocaron en el fijador inmediatamente después de su colecta en el sitio experimental, se clasifico por tratamiento y se conservaron a temperatura ambiente.

Deshidratación

Consiste en quitar el agua de los tejidos fijados y endurecidos. El procedimiento consistió en pasar los cortes por diferentes soluciones deshidratantes, de mayor a menor concentración. Las soluciones fueron de alcohol etílico al 50%, 60%, 70%, 85%, 96% más eosina, alcohol 96°, siguiendo con alcohol etílico absoluto I, alcohol absoluto II, alcohol absoluto más xilol a diferentes proporciones (3:1, 1:1, 1:3). Todo esto se realizó con intervalos de dos horas.

Infiltración e inclusión

Los cortes se colocaron en frascos con xilol puro, se agregó parafina y se metieron en la estufa a 35°C por 24 horas, después de este tiempo se les agregó más parafina y se elevó la temperatura de la estufa a 45°C, después de esto se hizo el cambio a parafina pura, luego la temperatura se elevó a 55°C por 24 horas; en el último paso de la infiltración se agregó más parafina y se aumentó la temperatura a 60°C por 24 horas.

Se utilizaron moldes de aluminio, se vació parafina en éstos y con la ayuda de una aguja de disección se extrajeron los cortes de los frascos y se colocaron en los moldes, colocando un tratamiento por molde. Cuando la parafina estaba casi sólida, se

colocaron las etiquetas hechas de cartoncillo especificando el tratamiento y se dejaron a temperatura ambiente a solidificar.

Cortes en el micrótopo

Se monta la muestra sobre una base de metal y se coloca en el micrótopo de mano "820" Spancer, éste se nivela y se orienta hacia la cuchilla previamente limpia. El micrótopo se graduó a 15 micras y dando vuelta a la manivela se obtenía una tira larga de parafina con los cortes transversales de la hoja.

Fijación de los cortes en los portaobjetos

Sobre un Portaobjetos limpio se untó uniformemente adhesivo de Haupt (1 g de gelatina, 15 cc de glicerina, 2 g de metabisulfito de sodio por cada 100 mL de agua destilada). Con un gotero se aplicó una gota de formalina y se colocó encima una tira de parafina con 2 cortes de muestra, enseguida se retiró el exceso de adhesivo con un trapo limpio luego se calentó suavemente la preparación pasándola sobre la flama de un mechero de alcohol, esto con el objeto de que los cortes se extendieran y se fijaran bien al portaobjetos, teniendo cuidado para evitar que la parafina se derritiera y el tejido se deshiciera o quemara. Las preparaciones duraron una semana para que quedaran bien fijadas, se colocaron en gradillas y se identifican.

Coloración

Se prepararon una serie de reactivos, en frascos Coplin con una capacidad para ocho portaobjetos cada uno. Se colocaron las preparaciones de manera que el tejido quedara orientado a una sola dirección en este caso a la izquierda para identificar la muestra, ya que al meterla al alcohol y al estar todas orientadas al mismo lado, al momento de tomarlas con las pinzas no se maltrata al tejido de la preparación siguiente.

Las preparaciones se pasan por los primeros tres frascos que contenían xilol puro I, xilol puro II, xilol puro III (que se utilizan para quitar la parafina) por 10 minutos en cada uno. Posteriormente se pasan en frascos con alcohol etílico absoluto al 96%, 85%, 70%, 60% y 50% por 2 minutos en cada frasco, después de enjuagarlas en agua

destilada, se pasan a una solución de safranina (1 g de safranina en 100 mL de agua destilada), donde duran un tiempo mínimo de 1 hora y máximo de 24 horas.

En seguida, por unos cuantos segundos se hizo una serie de enjuagues: agua normal, agua destilada, alcohol etílico al 50%, 60%, 70%, 85% y al 96%. Posteriormente las preparaciones se pasaron a una solución colorante verde rápido (0.5 verde rápido en 100 mL de alcohol 96°) por un tiempo de 10 segundos, luego se lavan en alcohol etílico 96°, alcohol absoluto y carbol-xilol y xilol puro se dejan por 10 minutos. Después de sacar las muestras del último frasco se escurrieron y se montaron colocándole a las preparaciones unas gotas de bálsamo de Canadá como pegamento, tratando de poner las gotas enmarcando los cortes y colocándoles el cubreobjetos, se quitaron los excesos de pegamento con una toalla de papel, se dejaron secando en las gradillas por una semana aproximadamente.

Selección de Muestras para Fotografía

Ya que las preparaciones estuvieron montadas y secas, se observaron en el microscopio para seleccionar las mejores preparaciones, para esto se observó que no estuvieran rotos los tejidos ni los bordes doblados o dañados en exceso, que no estuvieran sobre coloreados y que se vieran los tejidos de interés, una vez seleccionadas se marcaron y se llevaron al proceso siguiente.

Microfotografías

Utilizando una cámara digital se procedió a tomar las microfotografía de las preparaciones montadas y previamente seleccionadas se tomaron a dos aumentos 50x y 200x, una foto por tratamiento, por último se hizo una comparación anatómica entre tratamientos.

Variables evaluadas

Anatomía de las hojas

Se realizó mediante las micrográficas tomadas de los tejidos a 50x y 200x, se procedió a hacer el análisis y comparaciones cualitativas de células y haces vasculares entre tratamientos.

Densidad estomática

La densidad estomática, es el número de estomas por unidad de área (mm^2), se observó en el microscopio a 40x. Para determinarla se saca primero el diámetro del campo visual (ocular) para esto se divide el diámetro del ocular entre el objetivo, (10x / 40x) el cual se utiliza para sacar el área. Se procede a transformar con una regla de tres para determinar el número de estomas por (mm^2).

Densidad celular

La densidad celular, es el número de células tabloides por unidad de área (mm^2), se observó en el microscopio a 40x.

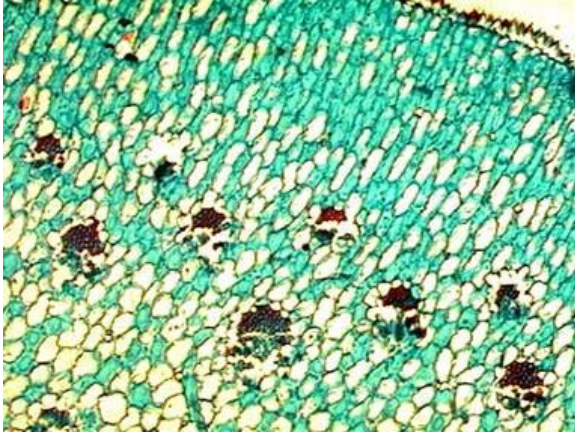
Índice estomático

Estomas por cada 100 células epidérmicas, para determinar esta variable se realizó el conteo de estomas y células tabloides y se determinó mediante la fórmula siguiente:

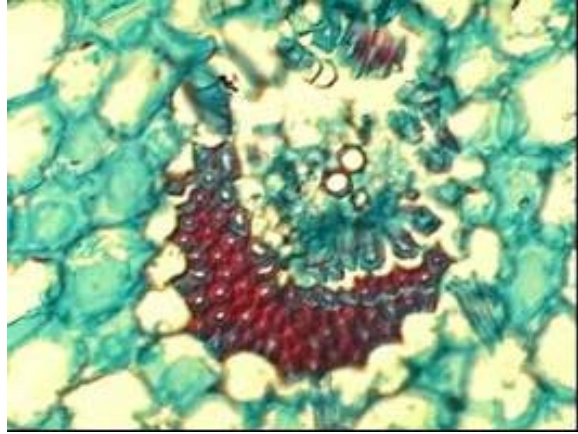
$$\text{Índice Estomático} = \frac{\text{No. Estomas}}{\text{No. Estomas} + \text{Cel. Tabloides}} \times 100$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

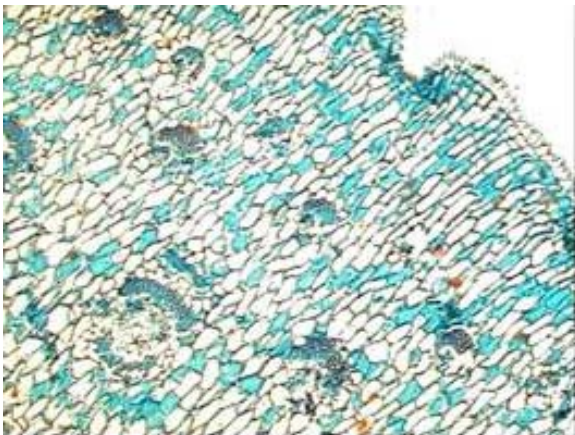
Anatomía de las hojas



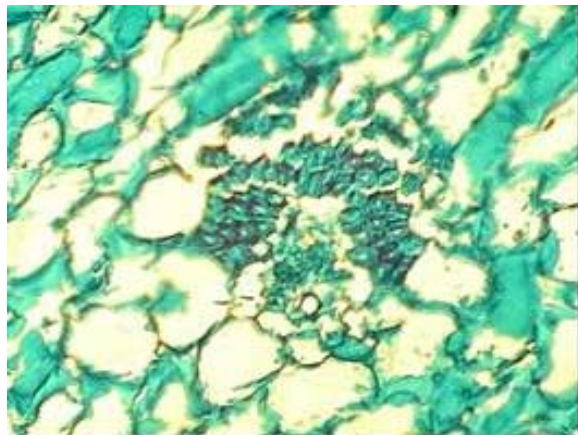
Tratamiento 1(testigo). Solución A. 50x.



Tratamiento 1(testigo). Solución A. 200x.



Tratamiento 1(testigo). Solución B. 50x.

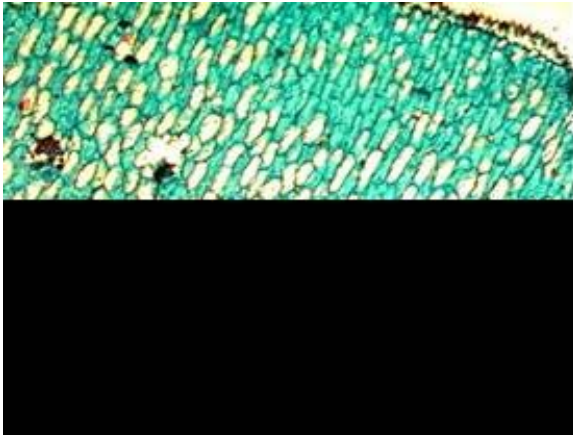


Tratamiento 1(testigo). Solución B. 200x.

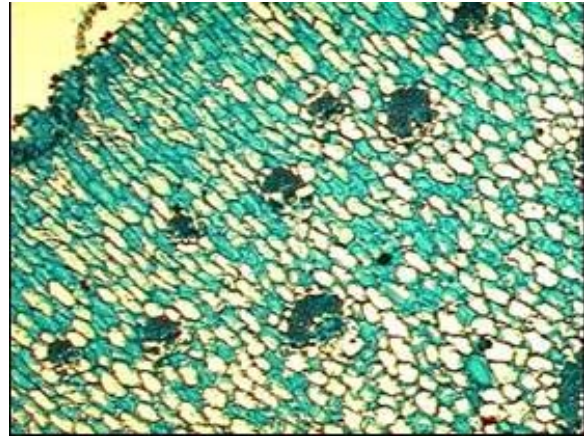
Al observar las muestras a 50 aumentos (50x) tratadas con la solución A, las células son ovaladas alargadas y un poco más grandes, que cuando son tratadas con la solución B que son alargadas y más pequeñas, por lo que no se nota mucho la diferencia en cuanto a grupos de haces vasculares.

En el caso de las muestras observadas a 200 aumentos, los haces vasculares de la solución A, igualmente son redondas y grandes y se nota que la longitud es mayor en comparación a la solución B que son células un poco alargadas y pequeñas.

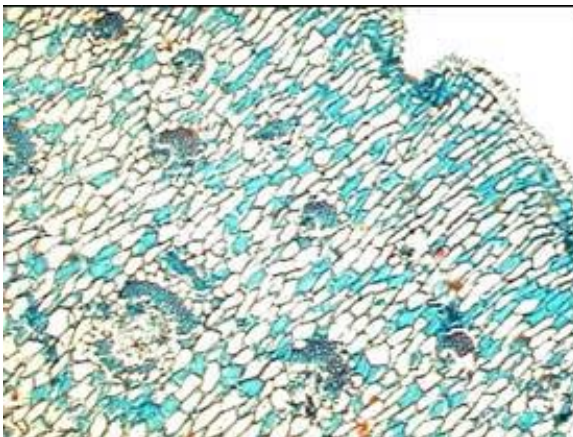
Figura 4.7. Corte transversal de hojas de agave del testigo solución A y B. a 50x y 200x.



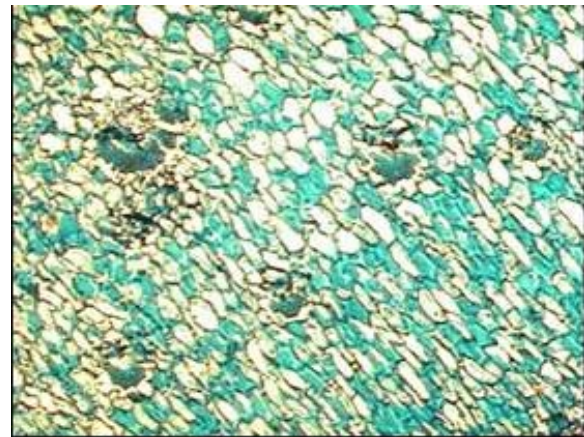
Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 50x.



Tratamiento 2 (AS). Solución A. 50x.



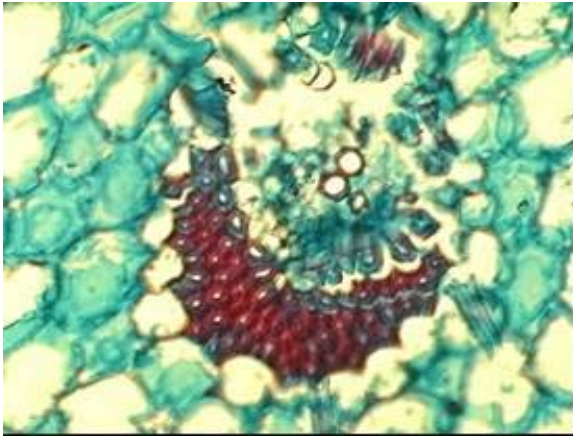
Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 50x.



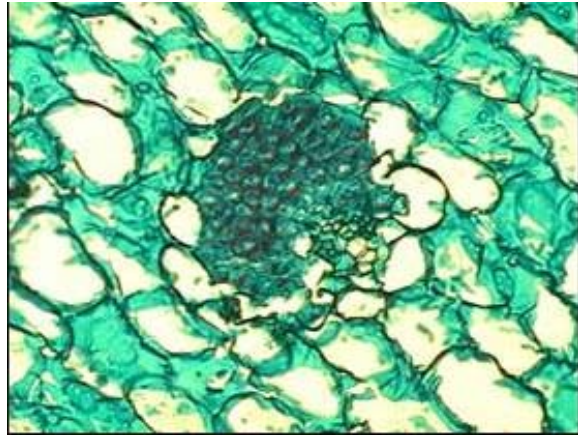
Tratamiento 2 (AS). Solución B. 50x.

En el caso del AS podemos observar que las muestras tratadas con la solución B las células son redondas, grandes y hay menos grupos de células vasculares, en comparación con el testigo y el AS de las tratadas con la solución A que son células pequeñas con mas grupos de haces vasculares.

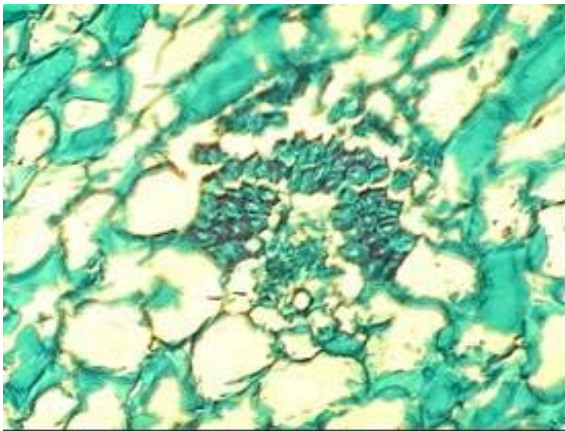
Figura 4.8. Corte transversal de hojas de agave testigo y AS de la solución A y B. a 50x.



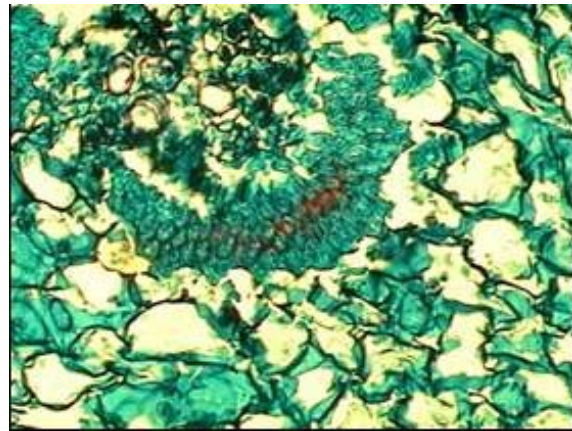
Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 200x.



Tratamiento 2 (AS). Solución A. 200x.



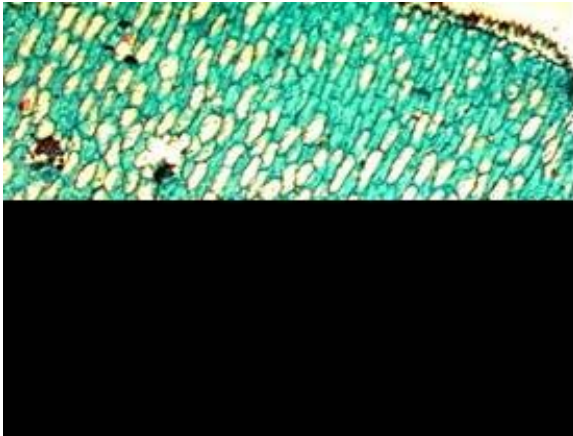
Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 200x.



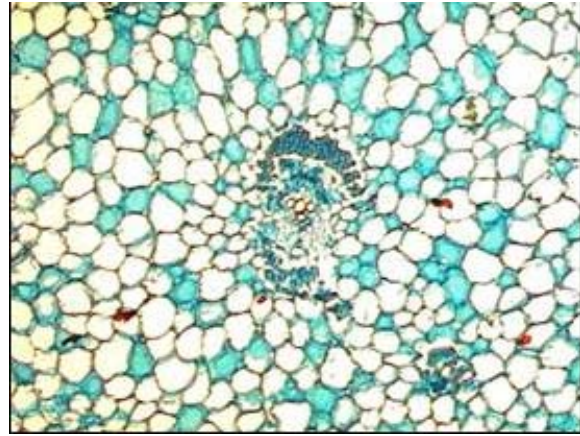
Tratamiento 2 (AS). Solución B. 200x.

Se puede observar que los haces vasculares con mayor longitud la encontramos en AS con la solución B, seguido del testigo con la solución A, donde la forma de las células son redondas y presentan más densidad en comparación al testigo con la solución B y al AS con la solución A.

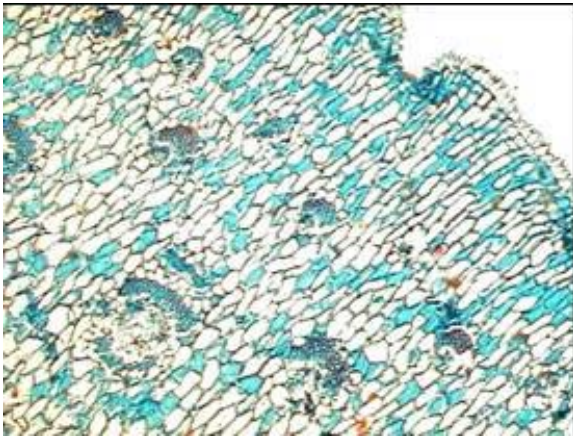
Figura 4.9. Corte transversal de hojas de agave testigo y AS de la solución A y B. a 200x.



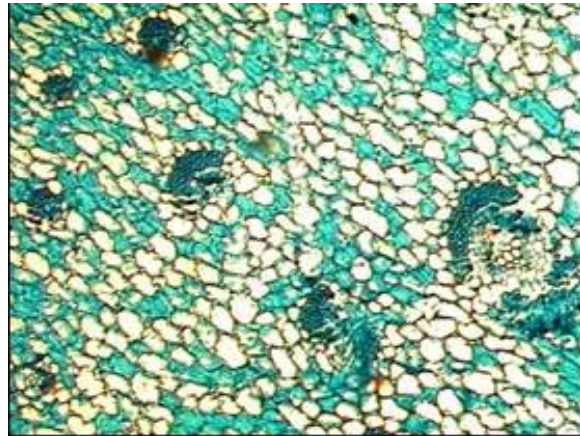
Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 50x.



Tratamiento 4 (PAA). Solución A. 50x.



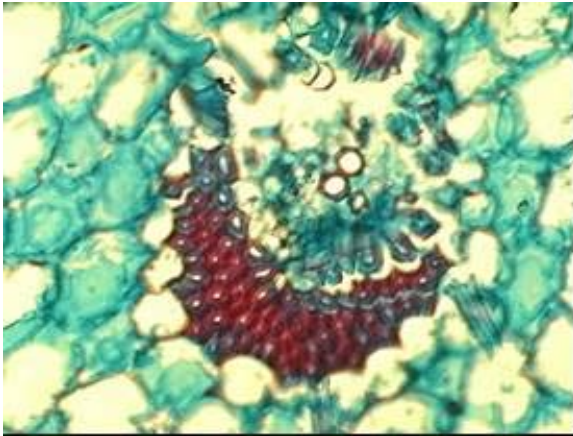
Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 50x.



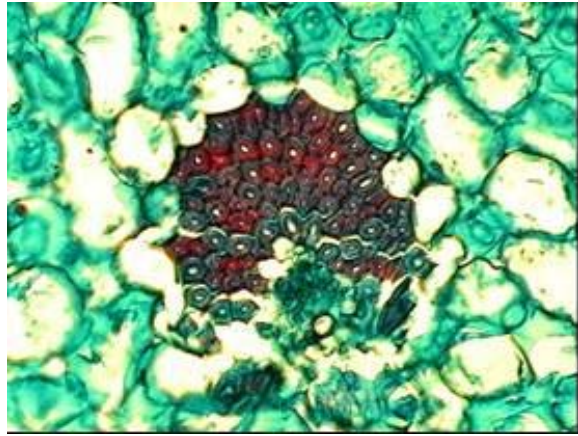
Tratamiento 4 (PAA). Solución B. 50x.

Podemos observar que hay gran diferencia en las plantas tratadas con PAA con la solución B, las células son redondas y grandes y con mas grupos de haces vasculares, seguido del tratamiento de PAA con la solución A, en comparación con los testigos, donde se observan células ovaladas y con un menor grupo de haces vasculares.

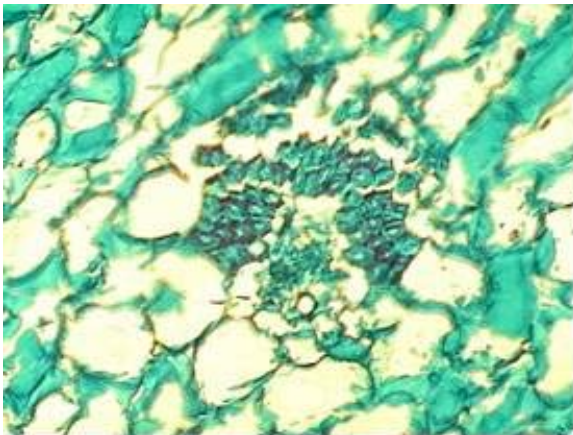
Figura 4.10. Corte transversal de hojas de agave testigo y PAA de la solución A y B. a 50x.



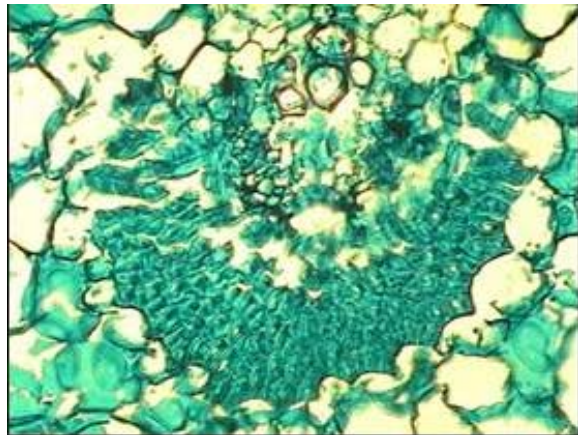
Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 200x.



Tratamiento 4(PAA). Solución A. 200x.



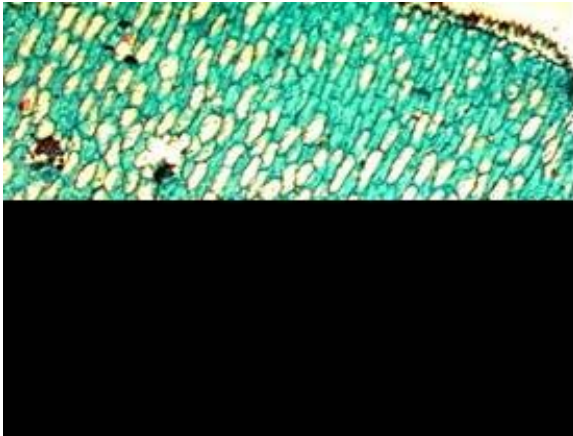
Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 200x.



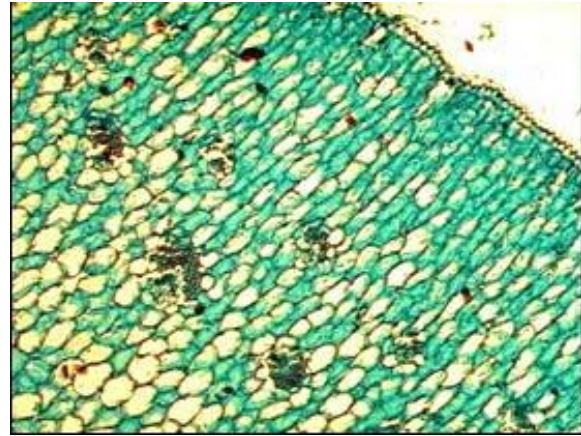
Tratamiento 4(PAA). Solución B. 200x.

Podemos observar, que las plantas tratadas con el PAA y la solución B, los haces vasculares son alargados y en mayor densidad y con una mayor longitud, en comparación con las tratadas con el PAA y la solución A y los testigos, donde se presentan células redondas.

Figura 4.11. Corte transversal de hojas de agave testigo y PAA de la solución A y B. a 200x.



Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 50x.



Tratamiento 3 (PAA-Q). Solución A. 50x.



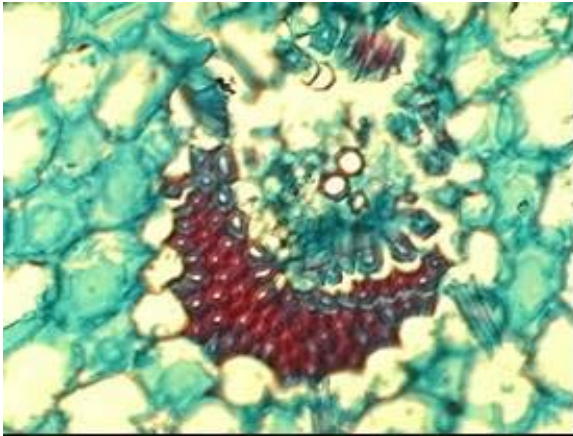
Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 50x.



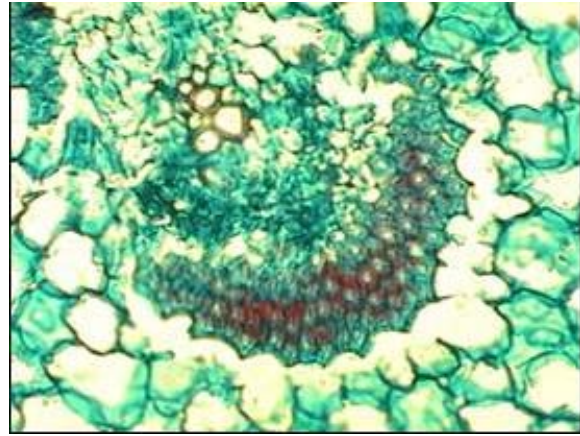
Tratamiento 3 (PAA-Q). Solución B. 50x.

Las plantas tratadas con el complejo PAA-Quitósán y la solución B, se observan células redondas y grandes con un menor grupo de haces vasculares, seguido por el tratamiento de PAA-Quitósán con la solución A, en comparación con las muestras testigo donde se observan células alargadas y pequeñas con más grupos de células vasculares.

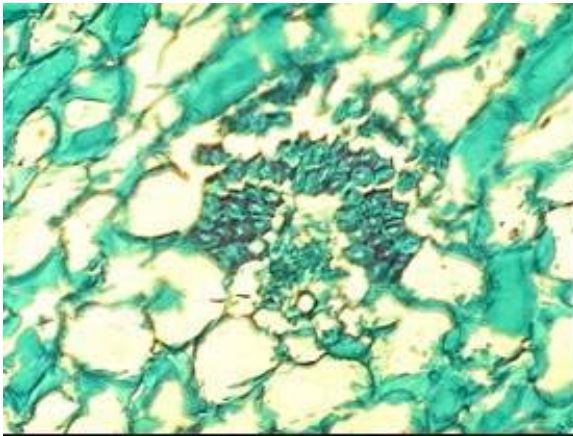
Figura 4.12. Corte transversal de hojas de agave testigo y (PAA-Q) de la solución A y B. a 50x.



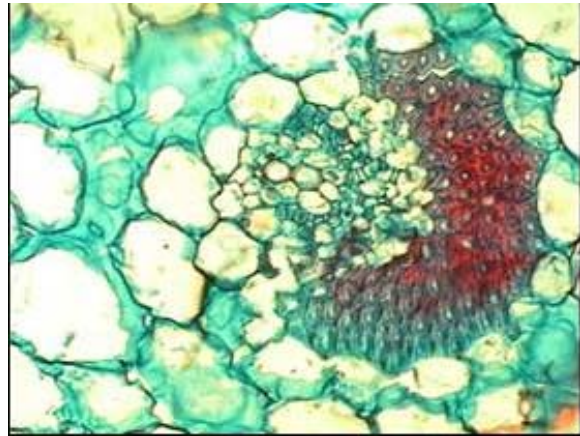
Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 200x.



Tratamiento 3 (PAA-Q).Solución A. 200x.



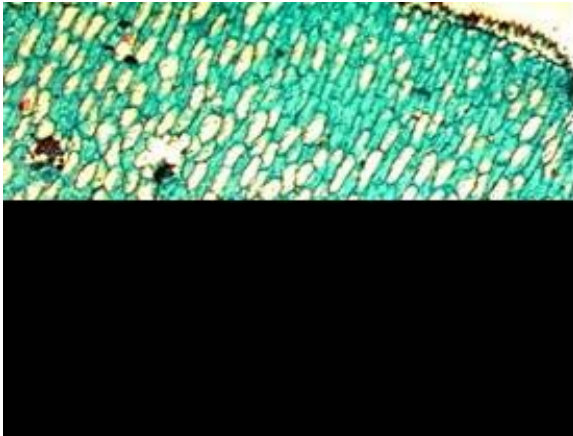
Tratamiento 1(Testigo).Solución B. 200x.



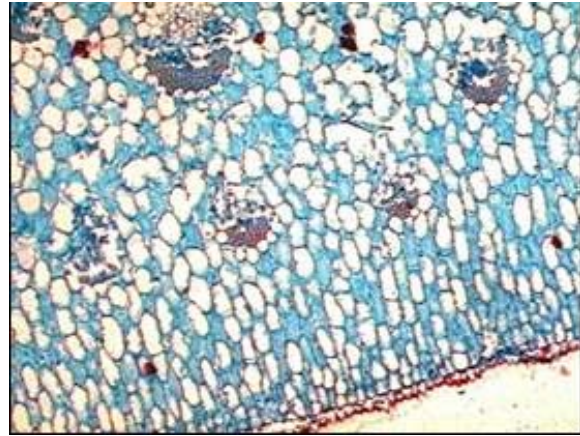
Tratamiento 3 (PAA-Q). Solución B. 200x.

Las plantas tratadas con el complejo de PAA-Quitósán y la solución B, encontramos una mayor cantidad de haces vasculares y una mayor longitud, en comparación con las tratadas con el complejo de PAA-Quitósán y la solución A y los testigos.

Figura 4.13. Corte transversal de hojas de agave testigo y (PAA-Q) de la solución A y B. a 200x.



Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 50x.



Tratamiento 5 (Q). Solución A. 50x.



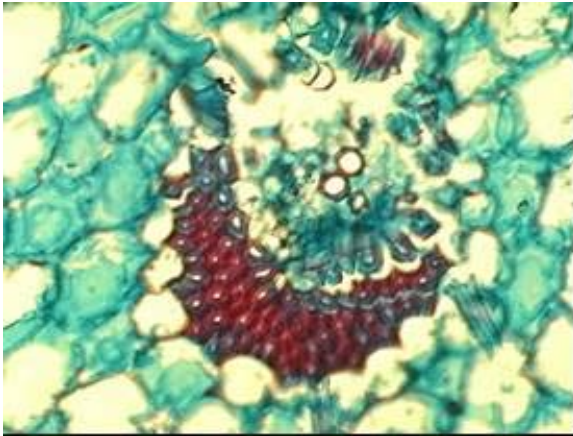
Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 50x.



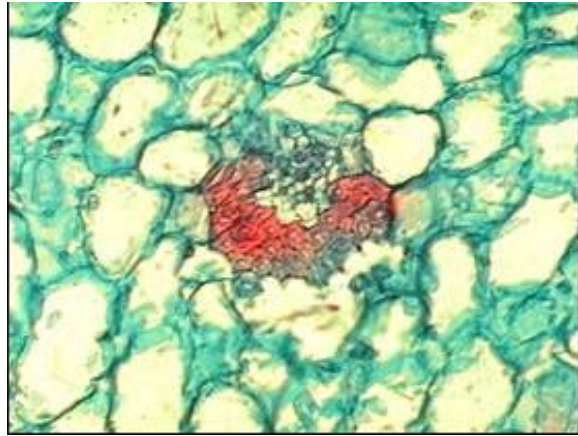
Tratamiento 5 (Q). Solución B. 50x.

Se observa que las muestras tratadas con Quitosán y la solución B, encontramos células redondas y grandes con más haces vasculares, seguida por las muestras tratadas con la solución A, en comparación con los testigos que tienen células alargadas pequeñas y con más grupos de haces vasculares.

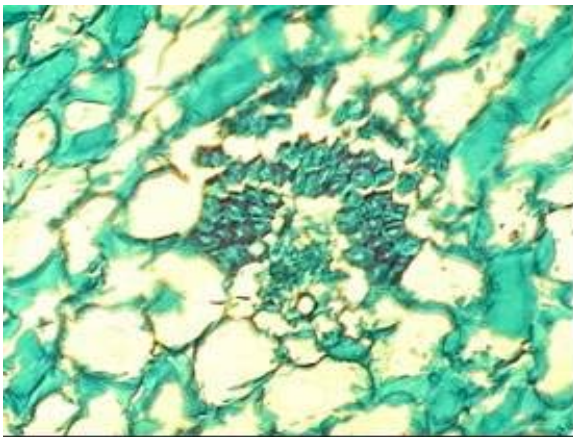
Figura 4.14. Corte transversal de hojas de agave testigo y Q de la solución A y B. a 50x.



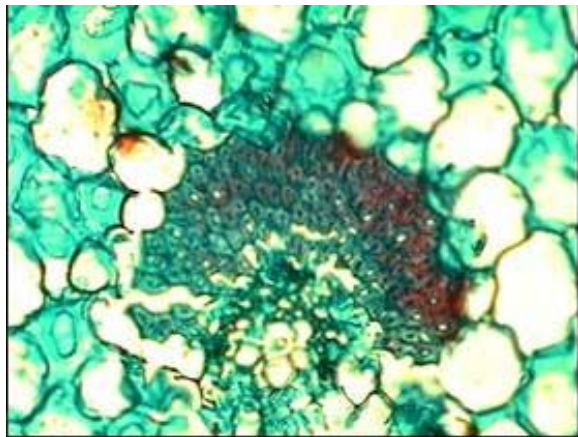
Tratamiento 1(Testigo). Solución A. 200x.



Tratamiento 5 (Q). Solución A. 200x.



Tratamiento 1(Testigo). Solución B. 200x.



Tratamiento 5 (Q). Solución B. 200x.

En las muestras tratadas con Quitosán y la solución B, según se observa en la figura x, los haces vasculares son ovalados con mayor densidad y por lo tanto mayor longitud, seguido por el testigo con la solución A, en comparación con las plantas tratadas con el Quitosán y la solución A y las plantas testigo con la solución B que presentan células en menor cantidad.

Figura 4.15. Corte transversal de hojas de agave testigo y Q de la solución A y B. a 200x.

Cuadro 4.4. Medidas (mm.) de las áreas de los haces vasculares.

Solución A Douglas normal				
Tratamiento	Ancho	Largo	Área	% cambio
1 Agua	0.061	0.15	0.00718	0.00
2 AS	0.059	0.11	0.00509	-29.07
3 PAA-Q	0.065	0.19	0.00969	34.97
4 PAA	0.082	0.13	0.00837	16.50
5 Quitosán	0.036	0.11	0.00311	-56.72

Solución B Douglas + Na				
Tratamiento	Ancho	Largo	Área	% cambio
1 Agua	0.045	0.12	0.00424	0.00
2 AS	0.061	0.16	0.00766	80.74
3 PAA-Q	0.059	0.17	0.00787	85.74
4 PAA	0.091	0.22	0.01572	270.74
5 Quitosán	0.074	0.18	0.01046	146.67

Solución A vs B				-40.98
-----------------	--	--	--	--------

Características epidérmicas

Densidad estomática en el haz

En las soluciones existe diferencia altamente significativa como se puede observar en las plantas tratadas con la solución B tenemos el valor mas alto, lo que nos indica que hay mayor densidad de células que en las plantas tratadas con la solución A.

Entre los tratamientos no hubo diferencia significativa, pero podemos decir que el valor más alto con estomas en el haz fue el tratamiento con Qitosán, seguido por el tratamiento con AS y con el valor más bajo es el testigo (agua), según se puede ver en el Cuadro 4.5.

Sámano (2003) reporta que no existe diferencia significativa entre las soluciones, pero comparando las medias presenta el valor más alto la solución B Douglas con un balance Na/K de 0.63. Siendo el mejor tratamiento con el complejo PAA-Q y el valor más bajo para el tratamiento con el PAA.

Salazar (2001) reportó que al aplicar ácido salicílico a una concentración de 10^{-4} M en chile serrano, se tuvo un número más bajo de estomas en comparación con la aplicación de AS a una concentración de 10^{-5} M que tuvo los valores más altos.

La densidad estomática se modifica por la luz y el CO_2 , pero hasta donde se sabe no existe reporte del efecto de soluciones nutritivas sobre la densidad estomática en agave.

Cuadro 4.5. Comparación de medias de la variable densidad estomática en el haz con respecto a la solución y el tratamiento.

Factor	Densidad estomática/haz
Solución A	112.56 b
Solución B	144.26 a
Agua	121.01 a
AS	129.84 a
PAA	127.63 a
PAA-Q	124.75 a
Q	138.83 a
	Significancia
Solución	>0.01
Tratamiento	0.7146

Densidad estomática en el envés

En soluciones existe diferencia altamente significativa ya que el valor más alto con estomas en el envés es la solución B, en comparación a solución A que presenta menos estomas, ver Cuadro 4.6.

Entre los tratamientos no hay diferencia significativa, se observa con mayor densidad estomática en el envés las muestras tratadas con el Quitosán, seguido de las tratadas con el complejo PAA-Q y con menor densidad estomática el testigo (agua).

Sámano (2003) reporta que existe diferencia significativa entre las soluciones, donde el valor más alto se presenta en la solución B, Douglas con un balance Na/K de 0.63. Siendo el mejor tratamiento el complejo PAA-Q y el valor más bajo para el tratamiento con Qitosán.

Se sabe que la densidad estomática y el índice estomático son regulados por factores endógenos y ambientales. Entre los factores ambientales reportados se encuentra la concentración de CO₂, que presenta una relación positiva con el índice estomático (Boesth et al, 1996). Del mismo modo, la disminución en la densidad estomática se reporto como un carácter de aclimatación para restringir la pérdida de agua (Schoetle y Rochelle, 2000).

Cuadro 4.6. Comparación de medias de la variable densidad estomática en el envés con respecto a la solución y el tratamiento.

Factor	Densidad estomática/envés
Solución A	107.33 b
Solución B	131.57 a
Agua	111.85 a
AS	117.96 a
PAA	121.35 a
PAA-Q	122.54 a
Q	153.56 a
	Significancia
Solución	>0.01
Tratamiento	0.7653

Densidad de células tabloides en el haz

Entre soluciones encontramos que hay diferencia altamente significativa en cuanto a densidades de células ya que en B presenta un número mayor en relación a la solución A. Cuadro 4.7.

En los tratamientos no hay diferencia significativa, pero podemos decir que el valor más alto es el testigo (agua), con el valor más bajo el Q.

Sámano (2003) reporta que existe diferencia altamente significativa entre soluciones, el valor más alto es en la solución B Douglas con un balance Na/K de 0.63. Siendo el mejor tratamiento con el complejo PAA-Q, y el más bajo el tratamiento con el AS.

Cuadro 4.7. Comparación de medias de la variable densidad de células tabloides en el haz con respecto a la solución y el tratamiento.

Factor	Densidad de células tabloides / haz
Solución A	1616.97 b
Solución B	2106.31 a
Agua	1901.39 a
AS	1884.76 a
PAA	1828.41 a
PAA-Q	1867.62 a
Q	1826.03 a
	Significancia
Solución	>0.01

Tratamiento	0.9968
-------------	--------

Densidad de células tabloides en el envés

Podemos encontrar diferencia significativa entre las soluciones, ya que las plantas tratadas con la solución B presentan una mayor densidad de células en el envés, en relación las tratadas con la solución A; ver Cuadro 4.8.

En relación con los tratamientos no hay significancia, pero se puede decir que tiene un valor alto en la densidad de células tabloides en el envés el tratamiento con el complejo PAA-Q, presentando el valor más bajo de células en el envés el tratamiento con PAA.

Sámano (2003) reporta que existe diferencia altamente significativa entre las soluciones, donde el valor más alto es en la solución B Douglas con un balance Na/K de 0.63. Siendo el mejor tratamiento con el complejo PAA-Q, y el valor más bajo para el tratamiento con AS.

Cuadro 4.8. Comparación de medias de la variable densidad de células tabloides en el envés respecto a la solución y el tratamiento.

Factor	Densidad de células tabloides / envés
Solución A	1746.83 b
Solución B	2179.84 a
Agua	1981.16 a
AS	1948.74 a
PAA	1920.74 a
PAA-Q	2035.30 a
Q	1930.75 a

	Significancia
Solución	>0.01
Tratamiento	0.9901

Índice estomático en el haz

Se presentan valores similares para las dos soluciones; por lo que no tenemos diferencias significativas. Cuadro 4.9.

En los tratamientos tampoco se encontraron diferencias significativas, pero podemos notar que se tiene un valor alto en el tratamiento con Quitosán, siendo el valor más bajo el testigo (agua). Cuadro 4.9.

Sámano (2003) reporta que no existe diferencia significativa entre soluciones, pero el valor más alto se presenta en la solución A Douglas con un balance Na/K de 0.09. Siendo el mejor tratamiento el AS, teniendo el valor más bajo el PAA. Esto no concuerda con Salazar (2001), quien encontró que al aplicar AS a una concentración de 10^{-4} M, tuvo un índice estomático más bajo en relación con la concentración de 10^{-5} M, que tuvo el valor más alto.

Cuadro 4.9. Comparación de medias de la variable índice estomático en el haz con respecto a la solución y el tratamiento.

Factor	Índice estomático/ haz
Solución A	6.57 a
Solución B	6.58 a
Agua	6.18 a
AS	6.50 a
PAA	6.60 a
PAA-Q	6.39 a
Q	7.21 a

	Significancia
Solución	0.9884
Tratamiento	0.0730

Índice estomático en el envés

Encontramos que no hay diferencia significativa entre las soluciones, pero podemos decir que tiene un mayor índice estomático la solución B superando por poco a la solución A. Cuadro 4.10.

En tratamientos foliares no se encontró significancia, pero obtuvo un índice mayor el tratamiento con PAA, siendo el testigo (agua) el valor más bajo. Cuadro 4.10.

Sámano (2003) reporta que no existe diferencia significativa entre las soluciones, siendo el mejor tratamiento el testigo y presentando el valor más bajo el tratamiento con el complejo PAA-Q.

Cuando se aplicó AS en chile serrano a una concentración de 10^{-4} M, aumentó el índice estomático en el envés y a una concentración de 10^{-3} M, este índice disminuyó. Salazar (2001).

Cuadro 4.10. Comparación de medias de la variable índice estomático en el envés con respecto a la solución y el tratamiento.

Factor	Índice estomático/ envés
Solución A	5.83 a
Solución B	5.93 a
Agua	5.50 a
AS	5.85 a
PAA	6.17 a

PAA-Q	5.76 a
Q	6.13 a
	Significancia
Solución	0.6497
Tratamiento	0.2947

V. CONCLUSIONES

- En los cortes transversales a un aumento de 50x entre los testigos (agua) el mejor fue la solución (A) con balance Na/K de 0.09 ya que presentó las células más grandes. Entre los demás tratamientos los mejores fueron los de la solución B con un balance Na/K 0.63, ya que también presentaron células grandes y redondas.
- En los cortes transversales a un aumento de 200x el mejor tratamiento con la solución (B) del balance Na/K de 0.63, es el poliácido acrílico (PAA) teniendo un área de 0.01572 mm², seguido del quitosán (Q) con 0.01046 mm², el complejo de poliácido acrílico-quitosán (PAA-Q) con 0.00787 mm², el ácido salicílico (AS) con 0.00766 mm². Y con un área menor de 0.00718 mm² el testigo (agua) con la solución A balance Na/K 0.09.
- Entre las soluciones, si encontramos diferencias altamente significativas, siendo la de mayor efecto la solución B con balance Na/K 0.63 con un aumento del 21.97% en densidad estomática en el haz, 18.4% en densidad estomática en el envés, 23.23% en densidad de células tabloides en haz, 19.86% en células tabloides en el envés, esto en relación a la solución A balance Na/K 0.09. En cuanto al índice estomático en el haz y en el envés no tuvieron efecto significativo ya que los valores fueron similares, pero respecto a las medias la solución B fue la mejor.

- El quitosán (Q) presento los valores mas altos en cuanto a densidad estomática en el haz y en el envés con un aumento de 12.83% y 9.47% respectivamente y 14.28% en índice estomático en el haz en relación al testigo.
- En cuanto al índice estomático en el envés el mejor se fue con el poliácido acrílico (PAA) con un aumento de 10.71% esto en relación al testigo.
- El complejo poliácido acrílico-quitosán (PAA-Q) incremento 2.66% en la densidad de células tabloides en el envés en relación al testigo.
- El testigo (agua) presento el valor más alto en cuanto a la densidad de células tabloides en el haz.

VI. LITERATURA CITADA

AGROPECT star. 2002. Capitulo 5. Potasio.
<http://www.agropecstar.com/portal/doctos/agronomia5.htm> .

Aguirre, Soto. M. 2000. Servicios Agrotecnicos de los Altos. Manual para Agaveros. Arandas, Jalisco México.

Bell, A. 1981. The physiological role of secondary natural products in the biochemistry of plants, E.E. Conn (ed.). Academic Press, New York.

Benavides, M. A. 2002. Ecofisiologia y Bioquímica del Estrés en Plantas. UAAAN. México.

Benavides, M. A. 2003. Respuesta al estrés y crecimiento de plántulas cuyas semillas fueron irradiadas con láser de baja intensidad. UAAAN. México.

Benavides, M. A., Ortega, O. H., Ramírez, H., Maiti, K. R. 2004. Use of the interpolyelectrolyte complexes of poly(Acrylic acid)-chitosan as inductors of tolerance against stress in horticultural crops. Crops research. pp: 1-8

Bourbouloux, A., P. Raymond, and S. Delrot. 1998. Effects of salicylic acid on sugar and amino acid uptake. J. Exp. Bot.

- Cámara Regional de la Industria Tequilera (CRT). 2000. Revista de la Cámara Regional de la Industria Tequilera. Año 1, Número 1, Agosto de 1997. México. www.feriavirtual.com.mx/f_5/agavaceas_i.htm .
- Cárdenas, G., G. Cabrera, P. Casals, C. Von Plessing, S. P. Miranda. 2002. Encapsulamiento de pesticidas utilizando quitosano. II Simposio Iberoamericano de Quitina. PAQ-7.
- Chirinos, U. H. 2000. Fertilización de *Agave Tequilana* Weber. <http://www.al-labs.com.mx/DOC/2-13.htm> .
- Dong, J. Y., Ozaki and K. Nakashima. 1997. Macromoléculas.
- Esau, K. 1972. Anatomía Vegetal. Segunda Edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona, España.
- Esau, K. 1977. Anatomy of seeds Plants. Segunda Edición. Ediciones, New Cork.
- Fahn, A. 1978. Anatomía Vegetal. Segunda Edición. Ediciones H. BLUME. Madrid España.
- Ferrarese, L., P. Moretto, L. Trainotti, N. Rascio, and G. Casadoro. 1996. Cellulaseinvolvement in the abscission of peach and pepper leaves is affected by salicylic acid. J. Exp. Bot.
- Flores L., H. E. 2000. Informe final del proyecto CONACYT Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul, con énfasis en problemas fitosanitarios

Gentry, H.S. and J.R. Sauck 1978. The estomatal complex in agave: groups Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. Proc. California Acad.

Gibson, A. C., and P. S. Nobel. 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press. Cambridge.

Gorlach, J., S. Volrath, G. Knauf-Beiter, G. Hengy, U. Beckhove, K.H. Kogel, M. Oostendorp, T. Staub, E. Ward, H. Kessmann, J. Ryals. 1996.

Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat.

Gullino, M.L., P. Leroux, and C.M. Smith. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. Crop Protect.

Gutiérrez-Coronado, M.A., C. Trejo-López, and A. Larqué-Saavedra. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant Physiol. Biochem.

Kang, M.K., K.S. Park, and D. Choi. 1998. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco.

Karasuda S., S. Tanake, K. Hiroshi, Y. Yamamoto and D. Koga. 2002. Effect of chitinase against the powdery mildew, *Sphaerotheca homily*, infecting on strawberry. II Simposio Iberoamericano de Quitina.

Larqué-Saavedra, A. 1975. Stomatal closure in response to acetyl salicylic acid treatment. Physiol. Plant.

Lira S. R. H. 1994. Fisiología Vegetal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Editorial Trillas.

- López, B. M. C. 1984. Tesis. Reguladores del crecimiento. V: Estudio de aspersiones de ácido salicílico, saligenina y cinetina en la producción de trigo. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- López, T. R, Camacho R. V. y Gutiérrez C. M. A.1998. Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/16/1/art43-48.pdf> .
- Melamy, J., J.P. Carr, D.F. Klessig, and I. Raskin. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection.
- Meron Biopolymers. 1997. Applications of Chitin <http://www.meronbiopolymers.com>.
- Métraux, J.P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wisps-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum, B. Inverardi. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber.
- Mikheikin, A. N. Alekseev, L. A. Mamaev. 1997. Proceedings of ICONE 5: 5th International Conference on Nuclear Engineering, May 26-30, Nice, France.
- Miranda, C. P., Damián L. V., Galo C. T. 2002. Permeabilidad del vapor de agua y propiedades mecánicas de películas compuestas de quitosán en un modelo de almacenamiento de aguacate. . II Simposio Iberoamericano de Quitina.
- Nobel P.S. 1983. Biophysical Plant Physiology and Ecology. San Francisco/New York.
- Nobel P.S. 1988. Environmental Biology of Agaves and cacto. Cambridge University Press.

- Ortega, O.H., Benavides, M.A., Flores, O.A., Ledesma, P.A. 2003 b. Use of the Interpoleelectrolyte Complexes of Poly(acrylic acid)-Chitosan as Inductors of Tolerance Against Pathogenic Fungi in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. floradade). *Macromolecular Bioscience*. 3, No 10.
- Pérez, G. F., Martínez – J.B. Laborde.1994. *Introducción a la fisiología vegetal*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Pergushov, D. V., V. A. Izumrudov, A. B. Zezin and V. A. Kabanov. 1996. Complejos polielectrolíticos como aglomerantes inteligentes con estabilidad controlada en soluciones Salinas acuosas.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo, E. Yopez, and P. S. Nobel. 2000. Seasonal variation of net CO₂ uptake for cactus pear (*Opuntia Picus-indica*) and pitayo (*stenocereus queretaroensis*) in a semiarid environment *Biotropica*.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*
- Rathke, T. D., S. M. Hudson. 1994. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *Rev. Makromol. Chem. Phys.*
- Rodríguez-Aranda, F.J., A. Benavides-Mendoza, J.J. Galván Luna, H. Ramírez Rodríguez. Cambios en la absorción de minerales y anatomía epidérmico de manzano al aplicar ácidos orgánicos. Memoria del XIX Congreso Nacional de Fitogenetica. Saltillo, Coah. Septiembre 2002.
- Saeedi, S., J. Gaillochet, J. Bonmort y G. Roblin. 1984. Effect of salicylic and acetyl salicylic acids on the scatonastic and photonastic leaflet movement of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiol*.

- Sakamoto, K., Y. Tada, Y. Yokozeki, H. Akagi, N. Ayashi, T. Fujimura, and N. Ichikawa. 1999. Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. *Plant Mol. Biol.*
- Salazar, T. A. M. 2001. Tesis. Efecto de la aplicación de Acido salisilico y sulfasalilico en la respuesta al estrés del frio en chile serrano (*capicum annum*). Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Salisbury, F. B. and Ross, C. W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamerica. México.
- Salvador, L., Susana P. M., Nadia A. y Virginia L. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Rev. Sociedad Química de México*.
- Samano, G. E. 2003. Tesis. Estudio anatómico de Agave tequilana weber con diferente fertilización Na/K y aplicación de inductores de resistencia. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Satti, S. M. E., R. A. Al-Yahyal, and F. Al-said. 1996. Fruit quality and partitioning of mineral elements in processing tomato in response to saline nutrients. *J. Plant Nutr.*
- Saxena, P.K. y A. Rashid. 1980. Differentiation of budcell on the protonema of the moss *Anoectanquium thomsonii*. Effect of aspirin and salicylic acid. *Z. Pflanzenphysiology*.
- Shigemasa Y., S. Minami. *Biotechnol. 1995. Gen. Eng. Rev.*

Verdugo V., A. Rojas, A. De León, B. Zambrano, Barios, E. León, B. Ríos y A. Benavides 1999. Estimación del índice estomático y la frecuencia estomática en cuatro variedades de ajo (*Allium sativa* L.)

Willmer, C.M. 1983. Stomata Longmann Group Limited.