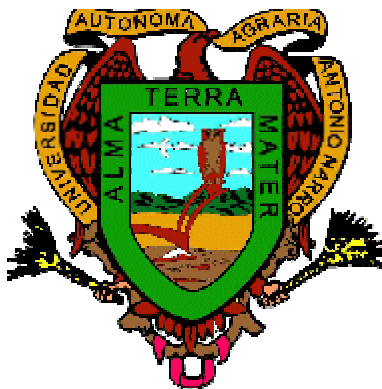


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**ESTUDIO ANATÓMICO DE Agave tequilana WEBER CON FERTILIZACIÓN
Na/K Y APLICACIÓN DE INDUCTORES DE RESISTENCIA**

Por : **ELIZABETH SÁMANO GARDUÑO**

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de :

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2003

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

**ESTUDIO ANATÓMICO DE Agave tequilana WEBER CON FERTILIZACIÓN
Na/K Y APLICACIÓN DE INDUCTORES DE RESISTENCIA**

**POR :
ELIZABETH SÁMANO GARDUÑO**

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**

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

**DRA. HORTENSIA ORTEGA ORTÍZ
ASESOR EXTERNO**

**DR. JOSÉ HERNÁNDEZ DÁVILA
SINODAL**

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre de 2003

AGRADECIMIENTOS

A mi “ALMA MATER” por permitirme la oportunidad de formarme en sus aulas.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza, por el apoyo brindado y disposición para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Hortensia Ortega Ortiz, por el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

A la M.C. Francisca Ramírez Godina, por su apoyo y por la revisión de este trabajo de investigación.

Al Dr. José Hernández Dávila, por el apoyo y amistad que me brindó durante mi estancia en la universidad.

A la Laboratorista Leticia Portos, por el apoyo brindado para la realización del trabajo en laboratorio.

A todos mis maestros en especial a los del Departamento de Horticultura, por las enseñanzas, apoyo y amistad que siempre me brindaron.

A la familia Ruelas Chacón por la amistad y el apoyo que me brindaron durante mi estancia en la universidad.

A mis amigos: María de Jesús, Siboney, Araceli, Ofelia, Leopoldo, Deiby, Adriana, Julia, Darío, Alejandro, Uriel, Omar P., Omar C., Nemorio, Jacobo S. (Cocula),... y a toda la generación 99-03 de Horticultura.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Juan Sámano Fuentes

Agustina Garduño de Sámano

Por darme la vida, por quererme, por apoyarme, por creer en mi y sobre todo por el gran amor que siempre me han dado. Gracias por ser mis padres.

A mis hermanos:

Ing. Daniel S. G.

Ismael S. G.

Mónica N.S.

Por la comprensión y el gran apoyo que me han dado siempre para poder llegar a este momento.

A mi tía:

A. Bernardita Sámano Fuentes

Por todo el amor y apoyo que siempre me ha brindado.

A mis primos:

José Antonio Zúñiga, Ing. José Luis Sámano, Cecilia Saavedra y mi sobrina Estrella Sámano, por todo el apoyo y amistad que me han dado.

A toda mi familia que en todo momento me han brindado su apoyo y han estado siempre presente cuando más lo he necesitado. Muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
INTRODUCCION	1
Objetivos	2
REVISION DE LITERATURA	3
Origen	3
Clasificación botánica	3
Características morfológicas	3
Investigación fitosanitaria.....	4
Aspectos relacionados con la nutrición.....	5
Importancia del sodio	5
Importancia del potasio	6
Inductores de resistencia.....	8
Ácido Salicílico (AS).....	8
Efectos del ácido salicílico.....	8
Ácido Salicílico y el control de patógenos.....	9
Poliácido acrílico (PAA).....	10
Quitósán (Q)	10
Complejos interpolielectrolíticos no-estequimétricos.....	12
Estructura anatómica e histológica de la planta.....	13
Estructura de hojas.....	14
Sistema vascular.....	15
Xilema.....	15
Floema	15
Estomas.....	16
Densidad estomática.....	17
Efecto de los factores ambientales sobre los estomas.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Localización geográfica del sitio experimental.....	19
Material biológico	19
Materiales	19
Soluciones nutritivas	20
Inductores de resistencia	21
Agua (Testigo).....	21
Ácido Salicílico (AS).....	21
Poliácido Acrílico (PAA).....	21

Quitosán (Q)	21
Complejo de poliácido acrílico y quitosán (PAA-Q).....	22
Diseño experimental.....	23
Establecimiento del experimento.....	23
Trasplante.....	23
Riegos.....	24
Aplicación de los inductores de resistencia.....	24
Control fitosanitario.....	25
Toma de muestras y descripción.....	25
Tratamiento de muestras para microscopia.....	26
Procedimiento.....	26
Fijación.....	26
Deshidratación.....	27
Infiltración e inclusión.....	27
Corte en microtomo.....	28
Fijación de los cortes en los portaobjetos.....	28
Coloración.....	28
Selección de muestras para fotografía.....	30
Microfotografía.....	30
VARIABLES EVALUADAS.....	31
Densidad estomática en haz y envés.....	31
Densidad celular en haz y envés.....	31
Índice estomático en haz y envés.....	31
Anatomía de hojas.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	47
LITERATURA CITADA.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del poliácido acrílico (PAA)	21
2	Estructura química del quitosán (Q)	21
3	Estructura química del complejo poliácido acrílico y quitosán (PAA-Q)	22
4	Espectro de infrarrojo del complejo PAA-Q	22
5	Croquis de ubicación de tratamientos	23
6	Corte transversal (40 x) de hojas de agave con diferentes tratamientos y con solución A (Douglas normal).	40
7	Corte transversal (40 x) de hojas de agave con diferentes tratamientos y con solución B (Douglas modificado).	41
8	Corte transversal (10 x) de hojas de agave con diferentes tratamientos y con solución A (Douglas normal).	43
9	Corte transversal (10 x) de hojas de agave con diferentes tratamientos y con solución B (Douglas modificado).	44

INDICE DE CUADROS

Figura		Página
1	Composición y concentración de la solución Douglas o testigo (Solución A)	20
2	Composición y concentración de la solución Douglas + Na (Solución B)	20
3	Calendario de aplicación de los pesticidas para el control de plagas y enfermedades	25
4	Comparación de medias de la variable densidad celular en el envés con respecto a muestreo, solución y tratamiento	33
5	Comparación de medias de la variable densidad celular en el haz con respecto a muestreo, solución y tratamiento	34
6	Comparación de medias de la variable densidad estomática en el envés con respecto a muestreo, solución y tratamiento	36
7	Comparación de medias de la variable densidad estomática en el haz con respecto a muestreo, solución y tratamiento	37
8	Comparación de medias de la variable índice estomático en el envés con respecto a muestreo, solución y tratamiento	38

**9 Comparación de medias de la variable índice
estomático en el haz con respecto a muestreo, 39
solución y tratamiento**

INTRODUCCIÓN

El agave (*Agave tequilana* Weber) es utilizado como materia prima para la industria del tequila; se consumen cerca de 800,000 toneladas al año, siendo una fuente de ingresos para 11,000 productores. En los últimos años, la superficie del cultivo ha aumentado considerablemente al pasar de 25,189 ha en 1990 a 66,283 ha en 1995, y para 1998 sólo en el estado de Jalisco había 62,000 ha.

Una adecuada fertilización en 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 relacionan con una buena productividad. En algunas especies el sodio puede reemplazar en cierto porcentaje al potasio.

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 la transcripción de los genes relacionados con la patogénesis, disminuyendo la susceptibilidad al daño del patógeno presente. Así mismo, en la mayoría de ellos no se reporta el efecto sobre la morfogénesis y productividad de la planta.

El agave tequilero se encuentra actualmente sometido a grandes problemas derivados al parecer de patógenos que causan enormes pérdidas entre los productores, 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 que existe poca información acerca de la modificación en la fertilización de *Agave tequilana* y del efecto de la aplicación externa de inductores de resistencia, se pretende implementar una tecnología económica para el mejor manejo de la nutrición y la fitosanidad, con impacto en la productividad y en el tiempo de cosecha de la planta.

En particular la respuesta anatómica ha sido poco estudiada. Este trabajo se realizó para generar información acerca de la respuesta de la anatomía epidérmica foliar y de los complejos vasculares de las hojas. Dicha información será integrada en un modelo actualmente en construcción que intenta agrupar este tipo de adaptaciones morfológicas en el conjunto de respuestas adaptativas llevadas a cabo por la planta en un entorno particular.

OBJETIVOS

1. Determinar la respuesta de la densidad e índice estomático en el haz y el envés de las hojas de *Agave tequilana* Weber a dos soluciones nutritivas con diferente balance Na/K y con aplicación de inductores de resistencia.
2. Estudiar los cambios en la anatomía vascular de hojas bajo las condiciones descritas en el párrafo anterior.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen

El agave tequilero (*Agave tequilana* Weber) al parecer tiene su centro de origen en México, debido a que en esta región se encuentra la mayor variabilidad y número de especies (SEPSA, 1999). El género *Agave* fue el principal elemento en la dieta de los primeros mexicanos desde el año 7,000 A. de C hasta el año 1,500 A. de C., además de alimento los agaves les proporcionaban fibras, bebida, abrigo y productos misceláneos naturales (ITESM, 2000).

Clasificación botánica

El agave tequilero pertenece al Reino Plantae, División Angiospermae, Clase Monocotyledoneae, Orden Liliales, Familia Agavaceae, Subfamilia Agavoideae, Género *Agave*, Subgénero *Euagave*, Sección *Rigidae*, Especie *tequilana* Weber (Granados, 1993)

Características morfológicas

El *Agave tequilana* Weber Azul es una planta suculenta de dimensiones cercanas a 1.5 metros de alto por 1.5 metros de diámetro. Sus necesidades de agua son moderadas, y una vez que está establecida en el campo requiere de exposición plena al sol. Su reproducción es por rizomas a partir del cuarto año y en su madurez emite un largo meristemo apical en forma de espiga, que al florear y producir semillas, la planta muere (CRIT, 1997).

Presenta hojas color azul- verdoso o glaucas, delgadas y casi planas, de 1.25 m de largo y 8 a 10 cm de ancho; la espina terminal es de color rojo oscuro, de 2 cm; los dientes son rojizos triangulares, de 3 a 4 mm y separados a una distancia de 1 a 1.5 cm, el margen que los une es ligeramente blanquecino. El tiempo que tarda en llegar al estado de madurez industrial es aproximadamente de 6 a 8 años (Granados, 1993). Las flores son blanco amarillento, en forma de panícula piramidal apareciendo en la extremidad del qurote. El fruto es una cápsula triangular con numerosas semillas (CRIT, 1997).

Investigación Fitosanitaria

En 1997 dio inicio el “programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva *Agave tequilana*”, con la firma del convenio entre CONACYT, Gobierno del Estado de Jalisco y el Consejo Regulador del Tequila (CRT), y la participación de siete instituciones de investigación: Universidad de Guadalajara (U. de G.), Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ), Centro de Investigación en Óptica A. C. (CIO), Centro de Investigación en Matemáticas (CIMAT), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); CINVESTAV-Irapuato, Colegio de Postgraduados (CP); con tres líneas de investigación: fitopatología, ecofisiología y mejoramiento genético.

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, encontró buenos resultados al aplicar sulfato de cobre pentahidratado. Asimismo 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 a 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).

Aspectos relacionados con la nutrición

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 C_4 , en las cuales genera CO_2 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 C_4 en especial cuando crecen en concentraciones de CO_2 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 CO_2 , no se observa ninguna deficiencia, o si se aplica sodio en atmósferas con concentraciones altas de CO_2 , las plantas muestran poca o ninguna respuesta dado que el CO_2 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 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. Estas dos condiciones (reducción en la fotosíntesis e incremento en la respiración), presentes cuando existe deficiencia de K, reducen la acumulación de carbohidratos, por ende disminución en el crecimiento y producción de la planta (AGROPECT star, 2002).

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

El potasio es el principal responsable del transporte de los azúcares que el *Agave tequilana* Weber elabora en sus pencas para ser luego movilizados a la piña y ser almacenados ahí (Cruz 2002).

Además el K es importante en la descomposición de los carbohidratos, un proceso que provee de energía a la planta para su crecimiento, ayuda a controlar el balance iónico, es importante en la translocación de metales pesados como el hierro (Fe), 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).

Manejo de la 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 sólo si se fertilizan con potasio y cal. La extracción total de nutrientes estimada que realiza la planta durante su período de aprovechamiento de 6 años y para una población de 3200 plantas/ha es de: 284 kg de N, 108 kg de P_2O_5 , 614 kg de K_2O , 84 kg de Mg y 780 kg de Ca. La elevada extracción de calcio implica el por qué esta planta rinde bien en suelos especialmente calizos y con un pH de entre 7.0 a 8.0. Una deficiencia de calcio puede causar síntomas posiblemente de virus (moteado de hoja), así mismo la pudrición del tallo está asociado con la mala nutrición en base a calcio. La adecuada fertilización potásica constituye una buena alternativa para lograr plantas más 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.

Inductores de resistencia

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 ortobenzóico 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 floración y tuberización, así como compuesto termogénico y alelopático, entre otras (Raskin, 1992).

El ácido salicílico aplicado de forma exógena en 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 RSA, tales como el 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)

El poliácido acrílico (PAA) y sus copolímeros han recibido recientemente un intenso interés porque son muy usados como agentes espesantes para látex y adhesivos, así como ingredientes para la formulación de productos farmacéuticos, cosméticos, recubrimientos y en químicos para la agricultura. Entre las propiedades de interés del PAA se encuentran el comportamiento especial de la viscosidad en soluciones. Muchos investigadores han estudiado extensamente los cambios conformacionales y los enlaces de hidrógeno de las cadenas macromoleculares que son responsables de los cambios de pH, fuerza iónica, temperatura y a la fuerza de corte. Los enlaces de hidrógeno en el PAA juegan un papel importante en las propiedades que exhibe éste. En un estudio reciente de espectroscopía Raman del PAA y sus análogos monoméricos indican que la disociación de los grupos COOH en especies libres es más desfavorable para el PAA que para compuestos modelo de unidades repetitivas de éste. A fin de explicar esta diferencia, los investigadores proponen que algunos enlaces de hidrógeno cooperativos podrían existir en soluciones acuosas de PAA (Dong, 1997).

Quitósán

El quitósán (poli-D-glucosamina) es un polisacárido de cadena lineal y se obtiene mediante la desacetilación extensiva de la quitina, un homopolímero presente en los caparazones de crustáceos, moluscos, en las cutículas de los insectos y como constituyente de las paredes celulares 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).

El quitosán es soluble en disoluciones de ácidos orgánicos, insoluble en solventes orgánicos, es soluble en soluciones de ácido clorhídrico y nítrico en concentraciones entre 0.15 a 1.1%, pero insoluble a concentraciones del 10%. Es insoluble en ácido sulfúrico y ligeramente soluble en ácido ortofosfórico al 0.5%. El mejor solvente para el quitosán es el ácido fórmico, en el que se obtienen soluciones en concentraciones de 0.2 al 100% (Shirai *et al.*, 1996).

Los grupos amino libres del quitosán le confieren propiedades importantes como polielectrolito lineal con alta densidad de carga, es un excelente floculante, se adhiere a superficies cargadas negativamente, aditivo para el cabello y la piel, quelante de iones metálicos (fierro, cobre), de metales tóxicos (cadmio, mercurio, plomo, cromo y níquel) y de radionuclidos (plutonio, uranio) (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 que se aplicó, 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 los microorganismos que causan la antracnosis y la pudrición del pedúnculo.

El quitosán se utilizó para el tratamiento de semillas como un agente antifúngico y como un inductor de genes que ayudan 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

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 poliones. 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 poliónicas son lo bastante hidrofóbicos por el apantallamiento mutuo de las cargas de los poliones. Los sitios hidrofílicos son las unidades del polielectrolito que no están involucradas en las interacciones iónicas entre las macromoléculas de cargas opuestas (Pergushov, 1996).

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; una delgada capa de cera secretada por la misma epidermis, que ayuda a proteger a la planta de la deshidratación y a 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; por lo tanto, éste es, principalmente, 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 manojito 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) y en las cuales 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).

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 a que se refiere 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).

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 conductivo 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, sin embargo con el floema no tiene gran valor comercial (a excepción de las fibras comerciales), son menos detallados los estudios hechos sobre los elementos del

floema. El floema consta de elementos cribosos, células acompañantes, fibras, esclereidas y células parenquimatosas (Esau, 1972).

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.

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 empalizada que a través del parénquima esponjoso. (Fahn, 1978).

Densidad estomática

La frecuencia o densidad estomática, que es el número de estomas por unidad de área (mm^2), presenta una gran componente de variación ambiental, 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).

Efecto de los factores ambientales sobre los estomas

Los estomas de la mayoría de las plantas se abren al amanecer y se cierran al anochecer, permitiendo la entrada de CO_2 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 CO_2 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 CO_2 causan que los estomas se abran; por lo tanto, la remoción de CO_2 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 CO_2 durante la noche y esto también causa la apertura estomática. Si se aplica CO_2 en hojas de plantas que no sean suculentas, sus estomas se abren ampliamente, incluso de noche. Contrariamente, las concentraciones muy altas de CO_2 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 CO_2 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 CO_2 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).

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; localizada 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 80 plantas de *Agave tequilana* Weber obtenidas en forma de hijuelos de primera generación.

Materiales

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

Soluciones nutritivas

Cuadro 1. Composición y concentración de la solución Douglas ó Testigo (Solución A).

Compuesto	Dosis (g /100 Lts 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

Balance sodio/ potasio de 0.09

Cuadro 2. Composición y concentración de la solución Douglas + Na (Solución B).

Compuesto	Dosis (g/100 Lts 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

Balance sodio / potasio de 0.63

Inductores de resistencia:

Agua (testigo).

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

Poliácido acrílico (PAA). (Figura 1). 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.

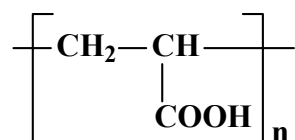


Figura 1.- Estructura química del poliácido acrílico (PAA)

Quitosán. (Figura 2). Polisacárido natural marca CarboMer, obtenido a partir del caparazón de los cangrejos. Peso molecular promedio de 650,000 determinado en el CIQA por viscosimetría usando una mezcla de solventes: ácido acético 0.2M/ acetato de sodio 0.1M a una temperatura de 30°C.

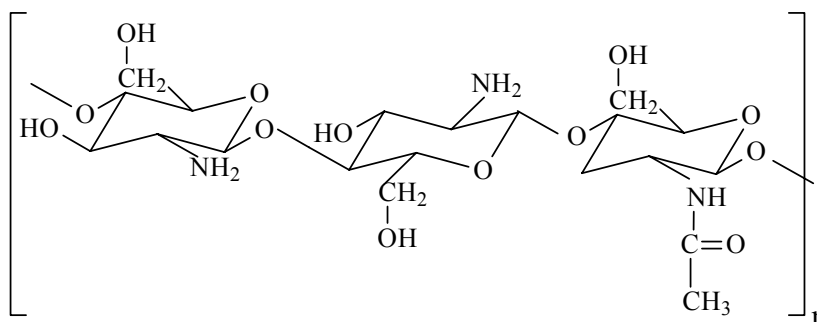


Figura 2. Estructura química del quitosán.

Complejo de poliácido acrílico y quitosán. (Figura 3). 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 KNO_3 para ayudar a la formación del complejo.

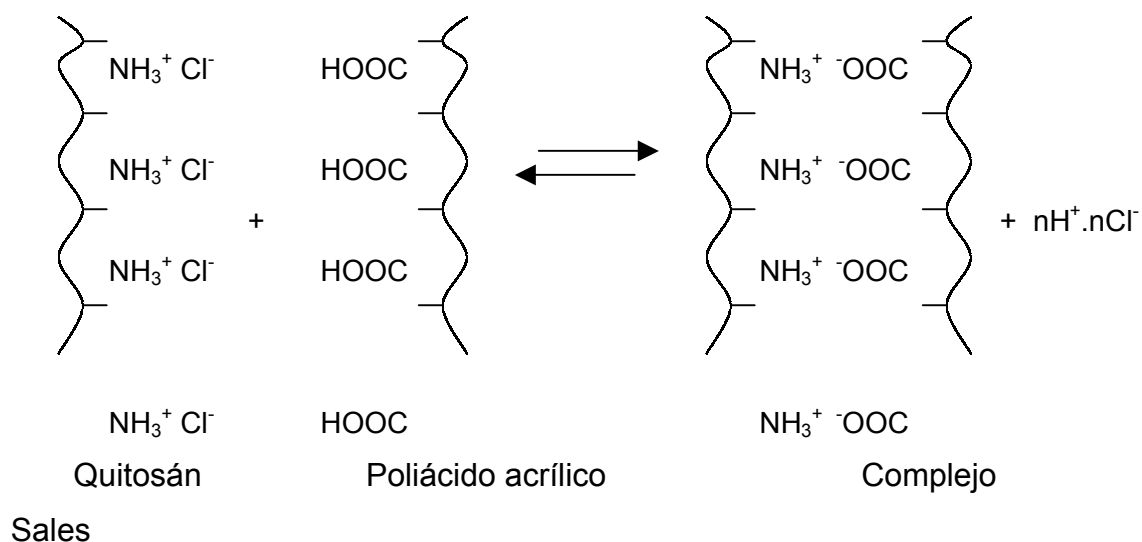


Figura 3. Estructura química del complejo de poliácido acrílico y quitosán.

El espectro de infrarrojo (Figura 4) para caracterizar el complejo (PAA – Q) 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 ($-\text{NH}_4^+$).

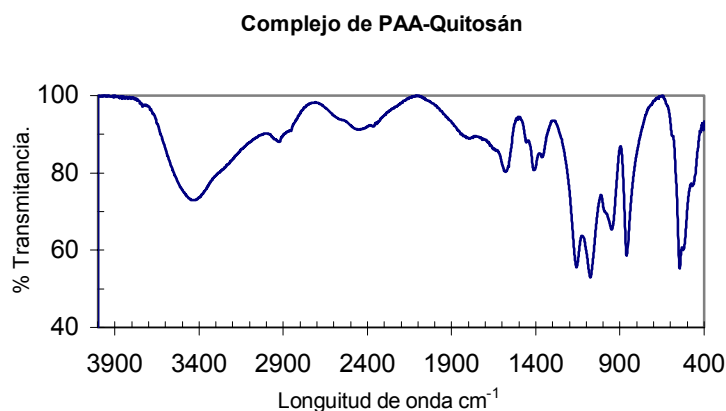


Figura 4. Espectro de infrarrojo del Complejo PAA-Quitosán.

Diseño experimental

Para esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar, usando dos soluciones nutritivas: Douglas y Douglas enriquecida con sodio (Cuadro 1 y 2), 5 tratamientos con inductores de resistencia y 8 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

El área total ocupada para este experimento fue de 27 m². La ubicación de los tratamientos se encuentra en la siguiente figura:

—————→ N

SOLUCIÓN A									SOLUCIÓN B								
Tratamiento	Repeticiones								Tratamiento	Repeticiones							
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
4	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	3	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X	4	X	X	X	X	X	X	X	X
1	X	X	X	X	X	X	X	X	2	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	5	X	X	X	X	X	X	X	X

Figura 5. Croquis de ubicación de tratamientos

Trasplante

El trasplante se realizó el 10 de febrero del 2002 en macetas de 10 kg, haciéndose la inducción del enraizamiento con raizal. Las macetas se colocaron a una distancia de 0.9 m entre hileras y de 0.3 m entre plantas. El 6 de octubre se

modificó la distancia a 1 m entre líneas y 0.4 m entre plantas, incrementándose el área ocupada a 32 m².

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 aspersion 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 160 ml / 8 plantas.
- 2.- Ácido salicílico 10⁻⁴ M (0.038 g / litro) 160 ml / 8 plantas.
- 3.- Complejo PAA–Quitósán al 1%, 160 ml / 8 plantas.
- 4.- Poliácido acrílico al 0.05%, 160 ml / 8 plantas.
- 5.- Quitósán al 0.05% en ácido acético al 1%, 160 ml / 8 plantas.

Control fitosanitario

El siguiente cuadro muestra las diferentes plagas y enfermedades que se presentaron durante el periodo del experimento, así como su control.

Cuadro 3.- Calendario de aplicación de los pesticidas para el control de plagas y enfermedades.

Plagas y enfermedades	Control	Fecha de aplicación	Dosis
Cochinilla rosada (<i>Macconellicoccus hirsutus</i>)	Temik granulado	9 / junio / 2002 27/ noviembre / 2003	3g /planta
Pudrición posiblemente causado por: <i>E. carotovora</i> y <i>Fusarium sp</i>	Cupertrón Fungimycin agrícola 5%	9 / septiembre / 2002 10 / septiembre / 2002 16 / enero / 2003 12 / abril / 2003	6ml /1.5 Lts de agua 3 g /1.5 Lts de agua.

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

Toma de muestras y Descripción

La toma de muestras se realizó en mayo de 2002, octubre de 2002 y en mayo de 2003, eligiéndose 3 plantas al azar por cada tratamiento haciéndose un total de 30 plantas. En cada planta se tomaron impresiones foliares en el haz y en el envés de la hoja más juvenil totalmente expandida (hojas con orientación al oriente) utilizando la técnica de poliestireno-xilol (R. K. Maití, comunicación

personal). Para ello, en una caja petri se disolvió poliestireno en una pequeña cantidad de xilol hasta alcanzar la consistencia de aceite para cocinar. El poliestireno en forma líquida 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 4 campos del microscopio elegidos al azar.

Tratamiento de muestras para microscopía.

Para realizar este trabajo, las muestras se tomaron en octubre de 2003. Los cortes y los 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 el control de temperatura.

Procedimiento

Para el trabajo de microtoma se realizaron cortes transversales de la hoja mas juvenil totalmente expandida con orientación al oriente.

Fijación

Las muestras se colocaron en fijador inmediatamente después de su colecta en el sitio experimental, se clasificaron por tratamiento y se conservaron a temperatura ambiente hasta que se inició el trabajo de laboratorio.

El efecto del fijador es conservar los tejidos con un mínimo de alteraciones. Se utilizaron frascos de 250 ml que contenían el fijador FAA (ácido acético glacial 5 cm³, alcohol al 70 %, 90 cm³, formaldehído 36.40 %, 5 cm³).

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 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 elevó 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 pusieron en los moldes, colocándose 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.

Corte en Micrótomó

Posteriormente se montó la muestra sobre una platina previamente calentada para fijar la muestra, se le hicieron cortes a la muestra para quitar el exceso de parafina. La platina con la muestra se colocó en el micrótomó, nivelando y orientando la muestra hacia la cuchilla previamente limpia. La escala del micrótomó se graduó a 10 micras y dando vuelta a la manivela se sacó una tira larga de muestras de tejido con parafina de los cortes transversales con 10 micras de grosor.

Fijación de los Cortes en los Portaobjetos

Sobre un portaobjetos limpio se untó uniformemente adhesivo de Haupt (1 g de gelatina, 15 cm³ de glicerina, 2 g de metabisulfito de sodio por cada 100 cm de agua destilada). Con un gotero se aplicó una gota de formalina y se colocó encima una tira de parafina con 2 ó 3 cortes de muestra dependiendo del tamaño del tejido, enseguida se retiró el adhesivo de los lados de la muestra con un trapo limpio, luego se calentó suavemente la preparación pasándola sobre la flama de un mechero de alcohol, con el objeto de que los cortes se extendieran y se fijaran bien al portaobjetos; esto se realizó con mucho cuidado para evitar que la parafina se derritiera y el tejido se deshiciera. Las preparaciones duraron una semana para que quedaran bien fijadas, enseguida se les puso la identificación con un plumón en un extremo del portaobjetos.

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 hacia la derecha, esto 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.

Con las pinzas, las preparaciones se pasaron por los primeros tres frascos que contenían xilol puro I, xilol puro II, xilol puro III (que se utiliza para quitar la parafina que lleva la muestra) por un tiempo de 10 minutos en cada uno ; posteriormente se cambiaron a frascos con alcohol etílico absoluto a 96 %, 85 %, 70 %, 60 % y 50 % por 5 minutos en cada frasco. Después de enjuagarlas en agua destilada, se pasan a una solución colorante de safranina (1 g de safranina en 100 cm³ de agua destilada), donde duran un tiempo mínimo de 3 horas y máximo de 24 horas; posteriormente se les dieron una serie de lavados con agua normal, agua destilada, alcohol etílico al 50 %, alcohol etílico 60 %, alcohol etílico 70 %, alcohol etílico 85 %, alcohol etílico 96 %. Enseguida las preparaciones se pasaron a una solución colorante verde rápido (0.5 verde rápido en 100 cm³ de alcohol 96°) por un tiempo de 5 segundos, se pasaron a los enjuagues de alcohol etílico 96°, alcohol absoluto I, alcohol absoluto II, y se pasaron a xilol puro I, xilol puro II, xilol puro III por 10 minutos en cada uno de los frascos (para completar el proceso de deshidratación). Después de sacar las muestras del ultimo frasco se escurrieron y se llevó a cabo el proceso del montaje colocándole a las preparaciones unas gotas de resina, tratando de poner las gotas sobre los cortes y colocándoles el cubreobjetos; se quitaron los excesos de las gotas con una toalla de papel, se dejaron secando en las gradillas por una semana aproximadamente.

Selección de Muestras para Fotografía

Las preparaciones montadas y secas, se observaron en el microscopio para seleccionar los campos que se deseaba fotografiar en el microscopio óptico, 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 pudieran observar los tejidos de interés. Una vez seleccionadas las muestras se marcaron y se llevaron al proceso siguiente.

Microfotografía

A los tejidos seleccionados se les tomó microfotografías a dos aumentos, 200x y 50x. Por último se realizaron las comparaciones de las fotografías.

Variables evaluadas

Características epidérmicas

Densidad estomática en el haz y en el envés de la hoja

Para medir esta variable se hizo un conteo del número de estomas por unidad de área (mm^2) en el haz y en el envés de la hoja.

Densidad celular en el haz y en el envés de la hoja

Es el numero de células tabloides por unidad de área en el haz y en el envés de la hoja.

Índice estomático en el haz y en el envés de la hoja

Se refiere al número de estomas por cada célula tabloide. Para esta variable también se realizó un conteo de estomas y células tabloides colocando las laminillas en un microscopio compuesto.

Anatomía de hojas

Es el análisis y comparación cualitativa de la estructura microscópica de los tejidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características Epidérmicas

Densidad celular en el envés

Para esta variable (Cuadro 4) se observa que la densidad de las células tabloides en el envés es diferente en cada uno de los muestreos, ya que presentan diferencias altamente significativas. En el muestreo 2 se tuvo el mayor número de células tabloides, seguido del muestreo 1 y después del muestreo 3, lo cual puede deberse por las condiciones que se presentaron dentro del invernadero y que influyeron en esta variable.

En cuanto a las soluciones A y B, los resultados mostraron diferencias altamente significativas entre ellas en los tres muestreos, ya que con el tratamiento B se tuvo el mayor número de células que en el A.

Entre los tratamientos, no se presentaron diferencias significativas, aunque el complejo PAA-Q fue el que presentó el valor más alto en relación con los demás tratamientos, tal vez porque influye en la formación de células en el envés de la hoja. El AS presentó el valor más bajo.

Cuadro 4. Comparación de medias de la variable densidad celular en el envés con respecto a muestreo, solución y tratamiento.

FACTOR	DENSIDAD CELULAR EN EL ENVÉS
MUESTREOS	
1	1957.28 b
2	2084.28 a
3	1857.11 c
SOLUCIÓN	
A	1915.83 b
B	2016.62 a
TRATAMIENTOS	
Testigo	1983.34 a
AS	1910.89 a
PAA	1947.27 a
Q	1988.44 a
PAA-Q	2001.18 a

Densidad celular en el haz

En esta variable (Cuadro 5) se observa que se tuvieron diferencias altamente significativas, porque en el muestreo 2 se tuvo el mayor número de células que en el 1 y 3, ya que éstos no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Para las soluciones A y B, se muestran diferencias altamente significativas, ya que en la solución B se obtuvo el mayor número de células que en el A. Tal vez la cantidad aplicada de Na incrementa la densidad de células en la hoja.

En cuanto a los tratamientos sí se tuvieron algunas diferencias, ya que en el tratamiento 3 (PAA-Q) se tuvo el mayor número de células en el haz, seguido de los tratamientos 5 (Q), el 1 (testigo), y el 4 (PAA); el tratamiento 2 (AC. SALIC), fue el que tuvo el menor número de células tabloides.

Es probable que el tratamiento T3 (PAA-Q) en combinación con la solución A y con la solución B, tenga efectos positivos en la formación de biomasa, y por lo tanto se tenga un número mayor de células (González, 2003)

Al aplicar ácido cítrico en diferentes concentraciones en hojas de tomate, la densidad celular fue mayor en el envés en los diferentes rangos de conductividad eléctrica, pero es menor en el haz en los diferentes tratamientos. (Cruz, 2003).

Cuadro 5. Comparación de medias de la variable densidad celular en el haz con respecto a muestreo, solución y tratamiento.

FACTOR	DENSIDAD CELULAR EN EL HAZ
MUESTREOS	
1	1615.80 b
2	1702.98 a
3	1593.51 b
SOLUCIÓN	
A	1599.60 b
B	1675.26 a
TRATAMIENTOS	
Testigo	1634.98 ab
AS	1597.08 b
PAA	1627.06 ab
Q	1641.77 ab
PAA-Q	1686.28 a

Densidad estomática en el envés

Para esta variable (Cuadro 6) se obtuvieron diferencias altamente significativas, ya que en el primer muestreo se obtuvo el mayor número de estomas en comparación de los muestreos 2 y 3.

Para las soluciones, la solución B obtuvo mayor diferencia significativa, ya que presenta el mayor número de estomas con relación a la solución A.

En cuanto a los tratamientos, no se obtuvieron diferencias significativas, aunque el complejo PAA-Q presentó el valor más alto, seguido del testigo. El Q fue el que presentó el valor más bajo.

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 pero en ausencia de relación con la densidad estomática en *Tradescantia* (Boesth *et al*, 1996). Del mismo modo, la respuesta de disminución en la densidad estomática se reportó como un carácter de aclimatación para restringir la pérdida de agua en un gradiente de altitud. (Schoettle y Rochelle, 200).

Cuadro 6. Comparación de medias de la variable densidad estomática en el envés con respecto a muestreo, solución y tratamiento.

FACTOR	DENSIDAD ESTOMÁTICA EN EL ENVÉS
MUESTREOS	
1	157.29 a
2	130.84 b
3	130.89 b
SOLUCIÓN	
A	136.07 b
B	143.28 a
TRATAMIENTOS	
Testigo	141.76 a
AS	137.73 a
PAA	138.88 a
Q	134.88 a
PAA-Q	145.11 a

Densidad estomática en el haz

En esta variable (Cuadro 7), se observan diferencias altamente significativas entre los muestreos, ya que en los muestreos 1 y 3 se obtuvo mayor número de estomas que en el muestreo 2, tal vez sea debido a las condiciones climáticas que se presentaron en el momento de realizar el muestreo.

En cuanto a las soluciones, no hubo diferencias significativas, pero al comparar las medias la solución B presenta el valor más alto.

Entre tratamientos, no hubo diferencias significativas, pero el complejo PAA-Q fue el que presentó el valor más alto, seguido del AS y el Q. El PAA presentó el valor más bajo.

Cuando se aplicó AS a una concentración de 1×10^{-4} en chile serrano, se tuvo un número más bajo de estomas en comparación con la aplicación de AS a una concentración de 1×10^{-5} , que tuvo los valores más altos (Salazar, 2001).

La densidad estomática se modifica por la luz y el CO_2 , pero hasta donde se sabe no existe reporte del AS sobre la densidad estomática; esto podría explicar lo reportado por Larqué en 1988, quien encontró que la aplicación del AS disminuye la transpiración en el frijol.

Cuadro 7. Comparación de medias de la variable densidad estomática en el haz con respecto a muestreo, solución y tratamiento.

FACTOR	DENSIDAD ESTOMÁTICA EN EL HAZ
MUESTREOS	
1	150.38 a
2	140.69 b
3	150.88 a
SOLUCIÓN	
A	146.41 a
B	148.22 a
TRATAMIENTO	
Testigo	146.24 a
AS	149.07 a
PAA	141.71 a
Q	148.24 a
PAA-Q	150.78 a

Índice estomático en el envés

En esta variable (Cuadro 8) se tuvieron diferencias altamente significativas entre los muestreos. En el muestreo 1 se tuvo un mayor índice de estomas, seguido del muestreo 3 y por último el 2.

Para las soluciones, no se encontraron diferencias significativas. En ambas, el índice estomático es prácticamente igual.

En cuanto a los tratamientos, no se tuvieron diferencias significativas. En este caso, el testigo fue el que tuvo el valor más alto, seguido del AS y el complejo PAA-Q. El Q presentó el valor más bajo.

Para el caso de la aplicación de AS en chile serrano a una concentración de 1×10^{-4} aumentó el índice estomático en el envés. Aplicándolo a una concentración de 1×10^{-3} , este índice disminuyó (Salazar, 2001).

Cuadro 8. Comparación de medias de la variable índice estomático en el envés con respecto a muestreo, solución y tratamiento.

FACTOR	INDICE ESTOMATICO EN EL ENVÉS
MUESTREOS	
1	7.50 a
2	6.00 c
3	6.65 b
SOLUCIÓN	
A	6.71 a
B	6.72 a
TRATAMIENTOS	
Testigo	6.84 a
AS	6.80 a
PAA	6.71 a
Q	6.43 a
PAA-Q	6.80 a

Índice estomático en el haz

Para esta variable (Cuadro 9) se tienen diferencias altamente significativas, ya que los muestreos 1 y 3 presentan un mayor índice estomático en el haz en comparación con el muestreo 2, que presenta un índice más bajo.

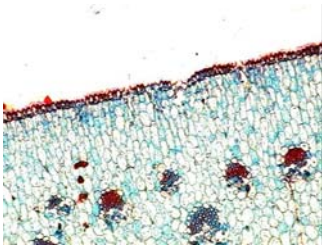
En cuanto a las soluciones, no se presentaron diferencias significativas, pero con la solución A se presentó el mayor índice estomático en el haz que con la solución B.

En los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas, pero el AS presentó el valor más alto. El PAA tuvo el valor más bajo. Esto no concuerda con Salazar (2001), quien encontró que al aplicar AS a una concentración de 1×10^{-4} , tuvo un índice estomático más bajo en relación con la concentración 1×10^{-5} , que tuvo el valor más alto.

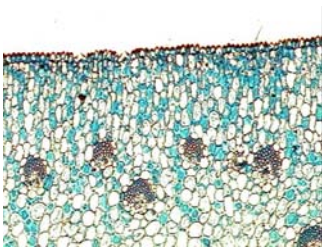
Cuadro 9. Comparación de medias de la variable índice estomático en el haz con respecto a muestreo, solución y tratamiento.

FACTOR	INDICE ESTOMATICO EN EL HAZ
MUESTREOS	
1	8.59 a
2	7.70 b
3	8.75 a
SOLUCIÓN	
A	8.49 a
B	8.21 a
TRATAMIENTOS	
Testigo	8.39 a
AS	8.63 a
PAA	8.08 a
Q	8.37 a
PAA-Q	8.27 a

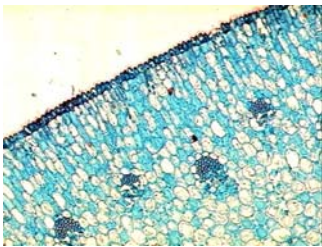
Anatomía de hojas



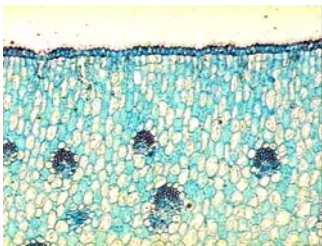
Tratamiento 1 (Testigo)



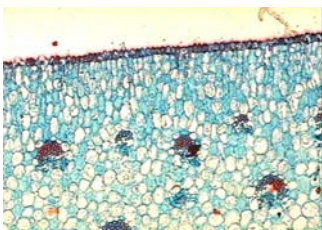
Tratamiento 2 (AS)



Tratamiento 4 (PAA)

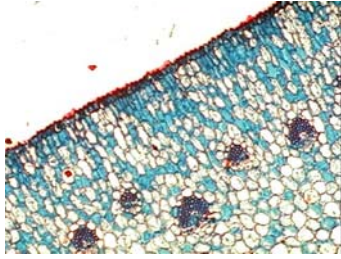


Tratamiento 5 (Q)

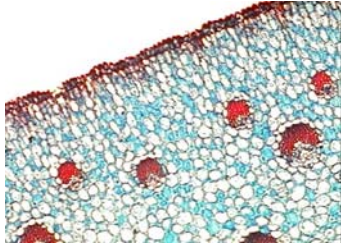


Tratamiento 3 (PAA-Q)

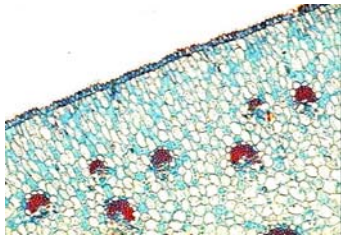
Figura 6.- Corte transversal (50x) de hojas de agave con diferentes tratamientos y con solución A (Douglas normal).



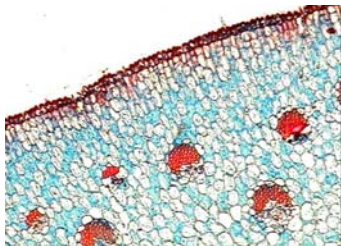
Tratamiento 1 (Testigo)



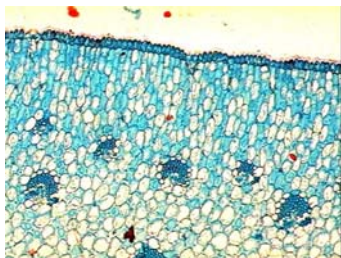
Tratamiento 2 (AS)



Tratamiento 4 (PAA)



Tratamiento 5 (Q)



Tratamiento 3 (PAA-Q)

Figura 7 .Corte transversal (50x) de hojas de agave con diferentes tratamientos y con solución B (Douglas modificado).

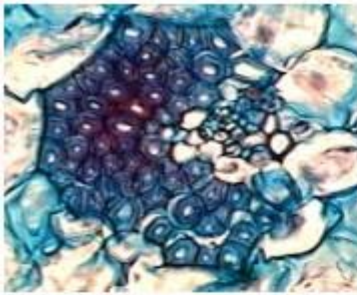
En base a la figura 6, se puede notar claramente las diferencias de los tratamientos con la solución A (Douglas normal), ya que el testigo, AS, PAA y Q, las células se ven más grandes y alargadas, aunque sobresalen las del PAA.

En el complejo PAA-Q, las células son grandes y redondas en comparación con los demás tratamientos.

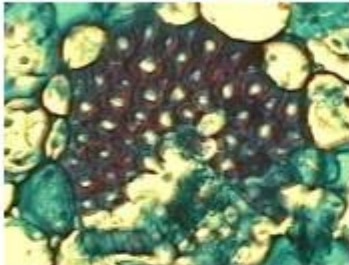
Los haces vasculares en el testigo y en el de AS se observan más grandes, los del complejo PAA-Q se ven de un tamaño mediano y los del Q tienen un tamaño pequeño.

En la figura 7 se puede notar que en el testigo y en el del AS las células se observan más grandes y redondas en comparación con los demás tratamientos. Con los tratamientos Q, PAA y el complejo PAA-Q se observan pequeñas.

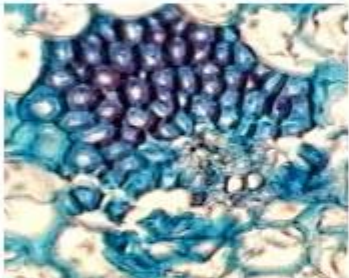
Con el tratamiento AS los haces vasculares se observan más grandes. En el testigo, PAA-Q, y Q, los haces tienen una forma mediana. Con el complejo PAA se ven más pequeños.



TRATAMIENTO 1 (TESTIGO)
SOLUCIÓN A (DOUGLAS NORMAL)
200X



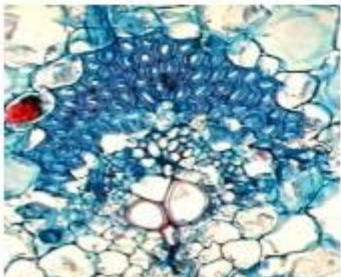
TRATAMIENTO 2 (AC. SALIC.)
SOLUCIÓN A
200X



TRATAMIENTO 4 (PAA)
SOLUCIÓN A
200X

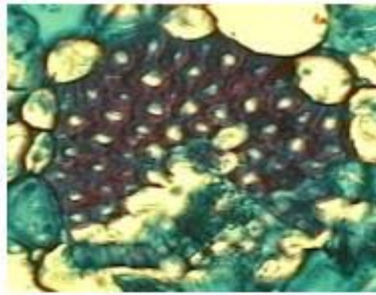


TRATAMIENTO 5 (Q)
SOLUCIÓN A
200X

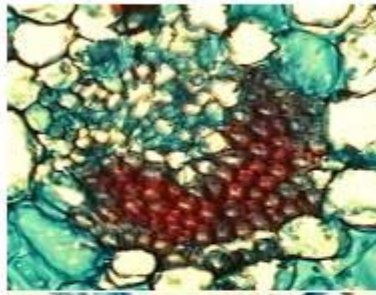


TRATAMIENTO 3 (PAA-Q)
SOLUCIÓN A
200X

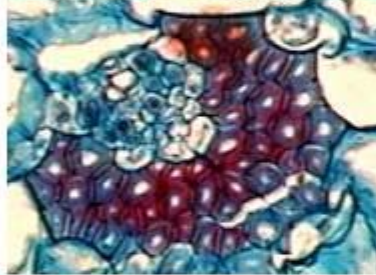
Figura 8. Corte transversal (200x) de hojas de agave mostrando haces vasculares con diferentes tratamientos y con solución A (Douglas normal)



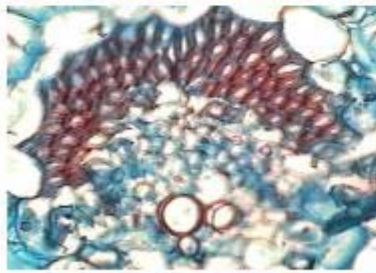
TRATAMIENTO 1 (TESTIGO)
SOLUCIÓN B (DOUGLAS
MODIFICADO)
200X



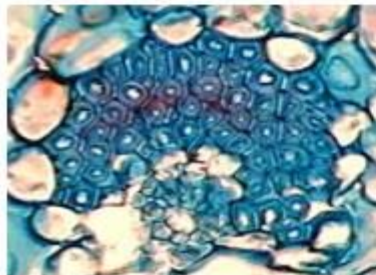
TRATAMIENTO 2 (AC. SALIC.)
SOLUCIÓN B
200X



TRATAMIENTO 4 (PAA)
SOLUCIÓN B
200X



TRATAMIENTO 5 (Q)
SOLUCIÓN B
200X



TRATAMIENTO 3 (PAA-Q)
SOLUCIÓN B
200X

Figura 9. Corte transversal (200x) de hojas de agave mostrando haces vasculares con diferentes tratamientos y con solución B (Douglas modificado).

En cuanto a los haces vasculares, en la figura 8 se muestran los tratamientos con la solución A (Douglas normal). En el testigo, en el AS y en el PAA se observa que las células de los haces son más grandes. En el Q y en el complejo PAA-Q, éstas células se ven pequeñas y del mismo tamaño.

En cuanto a xilema y floema se observan mejor en los tratamientos testigo y el complejo PAA-Q. Tal vez al aplicar estos tratamientos en combinación con la solución nutritiva Douglas normal, se ejerce un efecto positivo en estos tejidos para la mejor conducción de agua y nutrientes.

En la figura 9 se observa que con el PAA y el complejo PAA-Q las células se ven más grandes, en el testigo tienen un tamaño mediano y con el AS y el Q tienen un tamaño mediano, aunque en mayor cantidad en éstos dos.

En casi todos los tratamientos se observa una buena abertura de xilema y floema, a excepción del testigo, en donde casi no se aprecian.

Aunque la cantidad y la tasa de fotosintatos son características que originan cambios en la morfología de las plantas, es probable que el factor inductor más importante para determinar las diferencias observadas en las plantas fuera algún cambio en la sensibilidad frente a las citoquininas. Esto pudiera explicar la respuesta general observada en los tejidos en cuanto a tamaño y número de células.

Sperry *et al* . (2002) reportaron que la morfología y crecimiento de las plantas son un reflejo de la habilidad de las mismas para absorber, transportar y acumular agua. En lo que se refiere al transporte, la conductividad hidráulica del agua (depende en buena parte del número y tamaño del lumen de los vasos del xilema) parece ser la característica clave en las relaciones hídricas de las plantas con su ambiente.

CONCLUSIONES

Para el primer muestreo se tuvieron los valores más altos en cuanto a densidad estomática en el haz y en el envés, índice estomático en el haz y en el envés, no así para las demás variables.

En el segundo muestreo se tienen los valores más altos en la densidad celular en el haz y envés.

En el tercer muestreo se tuvo el valor más alto en cuanto a densidad estomática en el haz, aunque estadísticamente es igual al muestreo 1; lo mismo pasa con la variable índice estomático en el haz, en donde tuvo el valor más alto pero estadísticamente es igual al muestreo 1. Para las demás variables no tuvo valores significativos.

Para la solución A (Douglas normal), sólo presentó los valores más altos en el índice estomático en el haz y tuvo el mismo valor que la solución B (Douglas modificado) en el índice estomático en el envés. En las demás variables no presentó modificaciones.

En la solución B (Douglas modificado), sí hubo modificaciones en las variables densidad celular en haz y envés y en densidad estomática en haz y envés en comparación con la solución A (Douglas normal).

En cuanto a tratamientos, el complejo Poliacido acrílico-quitosán fue el que presentó los valores más altos en las variables densidad celular en haz y envés, y densidad estomática en haz y envés.

El testigo sólo tuvo el valor más alto en cuanto a índice estomático en el envés.

El ácido salicílico presentó el valor más alto en la variable índice estomático en el haz.

El Políácido acrílico y el quitosán por separado fueron los tratamientos que presentaron los valores más bajos estadísticamente en casi todas las variables.

En los cortes transversales (50x) y con la solución A, las células se observan que aumentaron su tamaño, sólo con la aplicación de Q no hubo modificaciones. Con la aplicación de AS y en el testigo, los haces vasculares aumentaron su tamaño.

En los cortes transversales (50x) y con la solución B, las células aumentaron su tamaño en el testigo y con la aplicación de AS, no así en los demás tratamientos. Los haces vasculares se ven más grandes con AS.

En los cortes transversales (200x) y con la solución A, las células de los haces vasculares presentan un aumento de tamaño en el testigo, AS y con el PAA. El xilema y floema se observan mejor con la aplicación del complejo PAA-Q y en el testigo.

En los cortes transversales (200x) y con la solución B, las células de los haces vasculares aumentaron su tamaño con la aplicación de PAA y el complejo PAA-Q. En todos los tratamientos se observa una buena abertura de xilema y floema.

LITERATURA CITADA

- AGROPECT star. 2002. Capitulo 5. Potasio. <http://www.agropecstar.com/portal/doctos/agronomia5.htm> (Consultada en junio del 2003).
- 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. Ecofisiología y Bioquímica del Estrés en Plantas. UAAAN. México.
- 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 (CRIT). 1997. 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](http://www.feriavirtual.com.mx/f_5/agavaceas_i.htm) (Consultada en junio del 2003).
- Cárdenas, G., G. Cabrera, P. Casals, C. Von Plessiing, 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> (Consultada en junio del 2003).

Cruz, A. J. 2003. Tesis. Estudio anatómico de tomate y chile en soluciones nutritivas modificadas con ácido cítrico y en distintos ambientes de radiación. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, México.

Cruz, J. E. 2002. Tesis. Fertilización química y orgánica del Agave mezcalero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, México.

Dong, J. Y., Ozaki and K. Nakashima. 1997. Macromoléculas.

Esau, K. 1972. Anatomía Vegetal. Segunda Edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona, España.

Fahn, A. 1974. Anatomía Vegetal. Segunda Edición. Ediciones H. BLUME. Madrid España.

Ferrarese, L., P. Moretto, L. Trainotti, N. Rascio, and G. Casadoro. 1996. Cellulase involvement in the abscission of peach and pepper leaves is affected by salicylic acid. J. Exp. Bot.

González, P. J. N. 2003. Tesis. Efecto de la fertilización Na/K con aplicaciones de inductores de resistencia sobre la productividad de carbohidratos y el crecimiento de *Agave tequilana* Weber. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

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.

- Granados, S. D. 1993. Los agaves en México. UACH.
- 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.
- Hadwiger, L.A., B. Fristensky and R. C. Riggelman. 1984. Chitin, chitosan and related enzymes. J. P. Zikakis Eds, Academic Press Inc., Orlando FL..
- Hidalgo L., W. Argüelles y C. Peniche. 1996. Rev. Protección Vegetal.
- ITESM. 2001. Producción Vegetal. Agave. <http://www.gro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CAgaveGeneralidades.html#Origen>. (Consultada en junio de 2003).
- 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 humuli*, infecting on strawberry. II Simposio Iberoamericano de Quitina.
- Laboratorios A & L de México S. A. de C. V. 2000. Guadalajara, Jalisco, México. <http://www.al-labs.com.mx> (Consultada en junio del 2003).
- 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> (Consultada en junio del 2003).
- Malamy, 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>. (Consultada en junio del 2003).
- Métraux, J.P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-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.
- 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.
- 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.*
- 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 ácido salicílico y sulfosalicílico en la respuesta al estrés del frío de chile serrano (*Capsicum annuum*). Universidad autónoma 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.*

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.

SEPSA. 1999. Boletín informativo. México, tierra de agaves. <http://www.sepsaestudios.com/Especial113.htm>. (Consultada en junio del 2003).

Shigemasa Y., S. Minami. Biotechnol. 1995. Gen. Eng. Rev.

Shirai, M. K. L. I. Guerrero y M. H. Georg. 1996. Ciencia. La quitina, presencia, propiedades y aplicaciones.

Sperry, J.S., U. G. Hacke. R. Oren, J.P.Comstock. 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. 2002. Plant Cell Environ. U.S.A.

Stichter, L., B.N. Mauch-Mani, and J.P. Métraux. 1997. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. .