

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



RESPUESTAS EN CRECIMIENTO Y ANATOMÍA EPIDÉRMICA DE MAÍCES

BAJO ESTRÉS CON NaCl

Por:

RUTH VANESSA DÁVILA SALINAS

T E S I S

Presentada como requisito parcial para

obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre del 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

**RESPUESTAS EN CRECIMIENTO Y ANATOMÍA EPIDÉRMICA DE MAÍCES BAJO
ESTRÉS CON NaCl**

Por:

RUTH VANESSA DÁVILA SALINAS

T E S I S

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador
como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Aprobada por:

DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA
ASESOR PRINCIPAL

DR. FROYLÁN RINCÓN SÁNCHEZ
SINODAL

M.C. ALBERTO SANDOVAL RANGEL
SINODAL

DR. VALENTÍN ROBLEDO TORRES SINODAL

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

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre del 2004

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
Estrés	4
Estrés Salino	5
Plantas halófitas y glicófitas	8
Tolerancia a la salinidad	8
Estomas	9
La densidad estomática	10
Factores que influyen sobre la densidad estomática	12
Generalidades del cultivo	12
III. MATERIALES Y METODOS	14
Ubicación del área experimental	14
Descripción del área experimental	14
Material genético utilizado	14
Establecimiento del experimento	15
Diseños experimentales	16
Variables Evaluadas	17
Densidad estomática, de células tabloides e índice Estomático	17

Biomasa	18
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Densidad estomática e índice estomático	19
Biomasa	22
V. CONCLUSIONES	26
LITERATURA CITADA	27

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
3.1	Solución Douglas (1976) aplicada a los genotipos de maíz.	15
4.1	Promedio de la densidad estomática (DE), densidad estomática de las células tabloides (DCT) e índice estomático (IE) en ocho genotipos de maíz sometidos a estrés salino.	19
4.2	Significancia entre las variables evaluadas de DE, DCT e IE en ocho genotipos de maíz, en dos ambientes, con y sin salinidad, inducido con NaCl.	21
4.3	Promedio del peso seco aéreo (PSA) y de la raíz (PSR) y total (PST) en ocho genotipos de maíz (g / planta-1).	23
4.4	Significancia entre variables evaluadas de peso seco (PSA), (PSR), (PST) en dos ambientes, con y sin salinidad, inducido con NaCl.	24

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
---------------	---------------	-------------

2.1	Homeostasis celular durante la adaptación al estrés salino.	7
2.2	Esquema de las partes del estoma (abierto y cerrado)	9
3.1	Modelo esquematizado de los intervalos de estrés y recuperación en ocho genotipos de maíz.	16
3.2	Impresiones foliares en porta objetos para analizar en microscopio compuesto.	17
3.3	Muestras de tejido vegetal en ocho genotipos de maíz en estufa de secado.	18
4.1	Respuestas promedio de la DE adaxial y abaxial de las plantas con solución + NaCl.	20
4.2	Respuestas promedio de la DCT adaxial y abaxial de las plantas con solución + NaCl.	20
4.3	Promedio de estomas en lado adaxial y abaxial de las hojas de ocho genotipos de maíz bajo tratamiento, con y sin NaCl.	21
4.4	Valores de PSR de ocho genotipos de maíz sometidos a tratamientos con solución nutritiva + NaCl.	42
4.5	Valores de PSA de ocho genotipos de maíz sometidos a tratamientos con solución nutritiva + NaCl.	43

AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme la luz de mi vida; el amor de mis padres Julia y Roberto, el de mis hermanos Magda, Fiore, Viole, Mary, Rober, Seth, el amor de mi novio Edgar y de toda mi familia, amigos y por mostrarme las vías apropiadas para el logro de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi Alma Mater.

A mi maestro y asesor Dr. Adalberto Benavides Mendoza que con su conocimiento y comprensión me apoyo siempre en la realización de mi trabajo.

A el Dr. Froylán Rincón Sánchez por proporcionarme material, apoyo y la revisión de mi tesis.

A mi maestro Dr. Valentín Robledo Torres por su ayuda en la revisión de este trabajo.

A mi maestro M.C. Alberto Sandoval Rangel por su palabra siempre positiva y la revisión de este trabajo de tesis.

A la maestra M.C. Francisca Ramírez Godina y a la laboratorista Lety Portos por el apoyo en el laboratorio de citogenética.

A mi cuñado M.C. Arturo Guevara Villanueva por apoyarme y alentarme a seguir adelante en mi formación profesional.

A mis maestros, amigos y todos aquellos que me brindaron una sonrisa, un gesto amable y algún consejo en mi camino universitario.
GRACIAS ¡

DEDICATORIA

A mis padres Julia Salinas y Roberto Dávila

A mis hermanas Mary, Viole, Fiore y Magda

A mis hermanos Seth y Rober

y familias.

Con mucho cariño y admiración a cada uno, por esa valentía, por la esperanza, la honestidad, la alegría, el coraje, por esa fuerza, el trabajo y el amor tan grande que llevamos en el corazón para afrontar esta vida unidos.

Con mucho amor a Edgar Stavros Kalionchiz Quezada por compartir las alas de la libertad, por ser mi luz, mi apoyo, mi felicidad, mi consejero y el amor de mi vida tan llena de bendiciones.

A Aldo, Anahí, Desireé, Claudia, Estela, Lucy, Martha, Daniel, Jemima, el Doc Benavides, siempre están en mi corazón.

DIOS LOS BENDIGA ;

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las respuestas en crecimiento y los ajustes en la anatomía de la epidermis de hoja en plántulas de ocho genotipos de *Zea mays* L. (un criollo, una población mejorada y la progenie de su cruce y retrocruces, provenientes del sur de Coahuila) sometidos a estrés con NaCl (375 mM) aplicado en la solución nutritiva. Las plantas fueron cultivadas en macetas con turba

canadiense como sustrato. Los promedios para los números de células epidérmicas (estomáticas) fueron de 148.60 por mm^{-2} para la densidad estomática adaxial y 276.15 por mm^{-2} para la abaxial; 1176.02 células tabicadas por mm^{-2} para la superficie adaxial y 1453.44 por mm^{-2} para la abaxial. Los índices estomáticos fueron de 11.22% y 15.98% para las superficie adaxial y abaxial, respectivamente. Los resultados mostraron que al aplicar el estrés salino disminuyó la densidad estomática abaxial en 34 estomas por mm^{-2} , no encontrándose relación entre esta respuesta y el promedio de peso seco de las plantas. La aplicación de NaCl disminuyó el peso de la parte aérea de la planta en un 21.8% pero aumentó el de la raíz en 16.6%. Se observaron diferencias en la tolerancia a la salinidad entre los genotipos de maíz, encontrando que los híbridos F1 mostraron aumento atribuible a la heterosis.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son incapaces de ir en busca de las condiciones adecuadas para su desarrollo, es por esto que están sometidas frecuentemente a situaciones desfavorables y expuestas a estrés de diferentes clases. La respuesta de las plantas al estrés conlleva cambios fenotípicos de adaptación que conferirán una mayor resistencia a ese estrés.

Aproximadamente el 20% de la superficie terrestre utilizada para el cultivo en el mundo se encuentra afectada por niveles de salinidad que superan la tolerancia de las especies de cultivos tradicionales. Este

porcentaje va en aumento a una tasa de 0.5% anual, debido fundamentalmente a bajas precipitaciones, alta superficie de evaporación, irrigación con aguas salinas y por las prácticas tradicionales de cultivo que favorecen el incremento de la concentración de sales en el suelo. Este estrés salino afecta directamente el rendimiento de los cultivos, inhibe su óptimo desarrollo y en algunos casos puede conducir a la muerte. Una de las sales que causa mayor perjuicio es el cloruro de sodio.

La reducción del crecimiento que experimentan las plantas cuando crecen en condiciones salinas se atribuye a efectos osmóticos que generan déficit hídrico y el resultante estrés oxidativo; al efecto de iones específicos que dan lugar al desequilibrio nutricional o bien a un efecto tóxico directo.

Para tolerar la salinidad, las plantas cuentan con mecanismos como el ajuste osmótico y la concentración de osmolitos, al regular el movimiento de iones hacia ciertos tejidos, ya sea a través del cierre estomático (Yeo, 1998), producción de

compuestos antioxidantes (Hernández y Almansa, 2002) o regulación de la entrada de iones en el flujo del xilema (Clarkson, 1991).

Dado que las vías bioquímicas primarias, como el ciclo de Krebs, fotosíntesis y glicólisis son especialmente sensibles al déficit de agua inducido por la salinidad, el efecto general es reducir la tasa de crecimiento para tener hojas más pequeñas, menor altura y en ocasiones menor cantidad de hojas (Larcher, 1995).

Además de tales ajustes fisiológicos, las plantas hacen frente al estrés mediante cambios en la morfología y anatomía los que modifican la coordinación entre diferentes órganos o tejidos, incrementan la habilidad para capturar o conservar recursos, o aumentan su tolerancia al factor causante del estrés; por ejemplo, la modificación de la densidad o el índice estomáticos que ocurre frente a

algunos tipos de estrés (Kakani *et al.*, 2003; Neogy *et al.*, 2003; Benavides-Mendoza *et al.*, 2004).

Los procesos de crecimiento son especialmente sensibles a la salinidad y por ello constituyen un criterio sencillo para determinar el grado de estrés por salinidad, así como de la habilidad de una planta para adaptarse a dicha situación. Las etapas más sensibles son la germinación y el crecimiento de las plántulas. Los experimentos de exposición al estrés salino son sencillos y útiles para estudiar los mecanismos de recuperación de esas plantas (Tattini *et al.*, 2002; Hernández y Almansa, 2002).

Al contrario de lo que ocurre en especies adaptadas al hábitat salino, de las que existe información fisiológica y bioquímica acerca de los mecanismos de respuesta y adaptación, en muchos cultivos básicos y hortícolas aún se conoce poco de su respuesta a la salinidad. Por ello se planteo lo siguiente:

Objetivos

Estudiar las respuestas en crecimiento y los ajustes en la anatomía de la epidermis en plántulas de ocho genotipos de maíz (*Zea mays* L.) sometidos a ciclos de exposición y posterior recuperación frente a alta concentración de NaCl en la solución nutritiva. Se postulo que los cambios epidermales se asocian con las deferencias de crecimiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Estrés

El estrés en las plantas significa la presencia de uno o varios factores externos que ejercen una influencia negativa sobre el crecimiento vegetal.

Según sea la naturaleza del factor causante del estrés, se puede distinguir entre estrés biótico (producido por seres vivos) y abiótico (producido por condiciones ambientales).

Las cualidades anatómicas y morfológicas de una planta pueden llegar a modificarse debido a estas características de su entorno ambiental o medio de crecimiento en el que se encuentra. Este, es muy variado ya que existen diversos factores a los que se expone para llegar a sobrevivir; estos son los relacionados con los medios óptimos de desarrollo de las plantas, pero si llegan a cambiar, las plantas tienden a presentar un estrés, es decir, un estado de decaimiento, de bajo rendimiento y no sobrevivencia, pero algunas otras plantas llegan a vivir gracias a su grado de adaptabilidad, de evolución y mejoramiento.

La presencia de estrés en nuestras plantas se puede percibir por sus cambios en características fenotípicas ideales. El significado literal de la palabra “estrés” es restricción, pero el concepto mas enfocado hacia el área biológica es el que se refiere a “conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones optimas”. (Benavides-Mendoza et al., 2002).

Las plantas, durante su desarrollo están sometidas constantemente a las condiciones cambiantes del medio que las rodea. Cuando las condiciones no son favorables, la planta responde a estos cambios para desviarla de su óptimo

funcionamiento y se presentan alteraciones en los procesos fisiológicos y en el desarrollo de la planta.

Estrés salino

En los últimos años, el estrés salino en plantas provocado por cloruro de sodio (NaCl) ha sido un tema de estudio, tanto desde el punto de vista fisiológico, molecular y genético. Desde la perspectiva fisiológica el resultado de altos niveles de cloruro de sodio sobre las plantas considera dos componentes principales: un componente osmótico y uno iónico.

Componente osmótico

Este efecto se refiere a la privación del agua por la disminución del potencial osmótico de ésta en el suelo originado por la presencia de sales disueltas. Esto produce en la planta una disminución de la capacidad de las raíces para absorber agua del medio.

Componente iónico

Este componente se relaciona con el efecto tóxico que provoca la disminución de la razón Potasio (K^+) / Sodio (Na^+) a nivel celular y es propio de este tipo de estrés. La presencia de iones salinos en los tejidos de las plantas, a niveles de concentración superiores a los tolerados origina lesiones características en ellas, dependiendo de la naturaleza y concentración de los iones.

El aumento en los niveles de NaCl en el medio lleva consigo un incremento en el influjo de sodio (Na^+) a las raíces y su distribución por toda la planta. El ingreso sin control de iones de Na^+ por transporte pasivo ocurre como resultado de la generación de un gradiente electroquímico muy elevado entre ambos lados de la membrana celular de las raíces. Los iones Na^+ ingresan al interior del citoplasma gracias a la presencia de canales y transportadores catiónicos en la membrana plasmática, los cuales son bastante inespecíficos frente a un alza en la razón Na^+/K^+ en el medio. La disminución en el contenido de iones K^+ en el citoplasma trae como consecuencia una desestabilización en el potencial de

membrana, la inactivación de enzimas y un efecto perjudicial sobre una serie de procesos fisiológicos. El restablecimiento de la homeostasis iónica, no es un problema de fácil solución para las plantas, ya que a diferencia de las células animales, ellas carecen de transportadores de sodio, tales como las Na⁺-ATPasas, por lo que deben recurrir a las H⁺-ATPasas o H⁺-pirofosfatasa para generar un gradiente electroquímico de protones que permitan el intercambio de H⁺ por Na⁺ y también de otros iones y metabolitos.

Muchos síntomas fisiológicos asociados a la toxicidad de los iones a partir de determinados niveles críticos son: interferencias causadas por ellos en el metabolismo, disminución o inhibición de la actividad enzimática o alteraciones en la funcionalidad de la membrana, inhibición de la fotosíntesis repercusión en los mecanismos de transporte y selectividad así como derivación de parte de la energía metabólica de la planta para su inversión en procesos distintos al crecimiento.

El efecto más común de la salinidad sobre las plantas es la inhibición del desarrollo (reducción de la productividad) por los factores ya mencionados, pero también existe un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales a partir de un determinado nivel crítico de concentración. Este efecto se produce de dos maneras:

- 1) La fuerza iónica del sustrato tiene un efecto directo sobre la absorción y translocación de nutrientes.
- 2) La interacción directa del Cl⁻ y el Na⁺ sobre la absorción y translocación de nutrientes dentro de la planta

En condiciones salinas, también pueden surgir problemas con la disponibilidad de micronutrientes, aunque la influencia de la salinidad sobre las concentraciones de los mismos en las plantas depende tanto de ellas como del micronutriente considerado.

Las plantas disponen de complejos mecanismos moleculares de respuesta a estos efectos de la salinidad, que incluyen biosíntesis de solutos compatibles, control del flujo hídrico, transporte de iones para reestablecer la homeostasis

(Figura 2.1) así como también cambios anatómicos-morfológicos para contrarrestar los efectos de las sales. Estos cambios pueden ser importantes en la eficiencia del uso del agua y la tolerancia de las plantas a las sales.

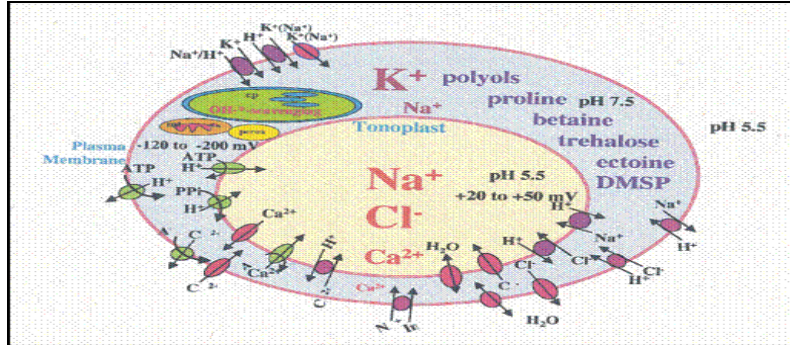


Figura 2.1 Homeostasis celular durante la adaptación a estrés salino.

El efecto general de la salinidad es reducir la tasa de crecimiento en hojas y en raíz (longitud y biomasa) aunque la parte radical puede ser más delgada o más gruesa, igualmente la tasa de maduración puede ser mayor o menor. El grado en el cual el crecimiento es disminuido difiere grandemente entre especies y en menor extensión entre cultivares dentro de la misma especie. La severidad de la respuesta a la salinidad depende de la interacción con otras variables ambientales como la humedad, temperatura y radiación (Benavides-Mendoza., et al, 2002).

Plantas halófitas y glicófitas

Las plantas pueden ser clasificadas en dos grupos, según su capacidad para tolerar la salinidad: halófitas y glicófitas. Las plantas halófitas, se caracterizan por poseer una alta tolerancia a la salinidad, condición que en algunos casos esta dada por la presencia de estructuras especializadas, como glándulas excretoras o vesículas almacenadoras de sales, lo que no presentan las glicófitas. Sin embargo, en la mayoría de los casos la diferencia entre estas plantas esta determinada por la expresión diferencial de genes, que de forma coordinada provocan cambios en el metabolismo celular, protegiendo la planta de la acción

osmótica y tóxica de la sal asegurando un adecuado nivel de división y expansión celular, durante el tiempo que perdure el estrés.

Tolerancia a la salinidad

La resistencia a la salinidad es generalmente expresada en términos de la habilidad inherente de la planta para resistir los efectos de altas cantidades de sales en la zona radical o en los tejidos foliares sin que se presenten efectos adversos.

Adicionalmente, los genes de tolerancia a la salinidad funcionan en concierto como otros genes que tienen influencia sobre caracteres cuantitativos así como sobre la interacción ambiental de los mismos. Se considera por ello la tolerancia a la salinidad es un carácter cuantitativo complejo controlado por muchos genes. En términos de su medición la tolerancia a la salinidad es descrita como una función compleja que marca la disminución en el rendimiento o la productividad a través de un rango de concentraciones salinas (Benavides-Mendoza et al., 2002).

Estomas

En la mayor parte de los ambientes, la concentración de agua en el exterior de las hojas es inferior a la que acontece en su interior, esto causa una pérdida de agua a través de aperturas en las hojas conocidas como estomas que están estructuradas por dos células oclusivas (Figura 2.2).

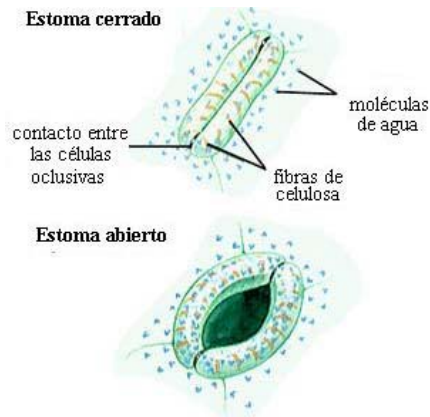


Figura 2.2 Esquema de partes del estoma abierto y cerrado.

Las células oclusivas son células de la epidermis con forma de medialuna que forman el estoma y regulan el tamaño de su apertura, llamada ostíolo. En conjunto, las células oclusivas y anexas (si las hubiera) conforman el aparato estomático.

La hoja está cubierta, en ambos lados, por una capa de células llamadas epidermis, la cual contiene numerosos poros conocidos como estomas, siendo estos más abundantes en la cara inferior de la hoja. A pesar de su pequeño tamaño, estos constituyen una ruta muy eficiente para el intercambio gaseoso, que permite una pérdida de agua en forma de vapor de las células foliares y se difunde con rapidez al aire más seco, que se encuentra en el exterior de la hoja

En ocasiones, los estomas se presentan sólo en la superficie adaxial (haz) de las hojas, pero con frecuencia se les encuentra en ambas superficies, casi siempre con mayor abundancia en la superficie abaxial (envés). Los lirios acuáticos tienen estomas solo en la superficie abaxial (envés) mientras que las plantas que crecen bajo la superficie del agua carecen de ellos. Los pastos por lo común tienen casi la misma cantidad estomática en ambas superficies (Salisbury y Ross, 1994).

La densidad estomática

La cantidad de estomas presentes en la superficie adaxial (haz) en comparación con la abaxial (envés) es característica distintiva de diferentes especies. Las plantas con mayor número de estomas en el haz son llamadas epiestomáticas; las que tienen mayor número en el envés son hipoestomáticas (mayoría de las hortalizas), mientras que aquellas con un número aproximadamente igual de estomas en haz y envés son ambiestomáticas (Gates, 1980). El carácter epiestomático o hipoestomático, se supone es una característica fija, pero fue demostrado que es susceptible de cambiar en ciertas etapas de crecimiento de la planta o en respuesta a estímulos ambientales (Piña, 1994).

A través de los estomas (en la epidermis) circula el CO₂ y el vapor de agua desde el interior de las hojas. Los estomas están en un rango de 20 µm de longitud y el área de los poros es de 0.5 a 1.2% del área foliar (cuando el poro está abierto al máximo). El número de estomas es cerca de uno por cinco células (índice estomático) o de 100 – 450 por mm² (densidad estomática), el número de estomas es significativamente alto en la parte abaxial (abajo), que en la parte adaxial (superior), de la hoja (Nederhoff, 1994).

La densidad estomática, el número de estomas por unidad de área, 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, 1977). La densidad estomática de las hojas es una característica conveniente de medir al analizar las relaciones agua - planta y para encontrar indicadores que expliquen su rendimiento con relación a la intensidad y duración de la sequía (Pérez y Chan, 1986).

Por lo común cada mm² de superficie foliar tiene unos 100 estomas, aunque el número puede ser 10 veces mayor, reportándose valores máximos de 2,230 (Howard, 1969), sin embargo Roth (1976), menciona que la densidad estomática varía entre 1,000 y 100,000 por cm² en las plantas dicotiledóneas.

Factores que influyen sobre la densidad estomática.

La densidad y tamaño de los estomas varía de acuerdo a la especie, a la variedad, a la posición de la hoja, a su crecimiento, a la intensidad de la luz, a la altura de la planta y ambiente de cultivo (Kuruvadi, 1989).

Por su parte Willmer (1983) indica que los factores de desarrollo genético y ambientales se ven involucrados en la morfogénesis de los estomas. La disponibilidad de agua, la intensidad de luz, la temperatura y la concentración de CO₂, se observan con frecuencia afectando la densidad estomática.

Generalidades del cultivo

El maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar; es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo en producción total. Este cultivo es de gran importancia económica ya sea como alimento humano, para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales.

Globalmente, el maíz se cultiva en mas de 140 millones de hectáreas con una producción anual de mas de 580 millones de toneladas métricas. Es previsible que la demanda de maíz como alimento crezca en las próximas décadas en los países en desarrollo a una tasa mayor que la del trigo o del arroz.

Todos estos indicadores hacen que el maíz sea un cultivo que debe ser debidamente explotado a fin de alimentar la creciente población mundial; mayores incrementos de producción de alimentos humanos y animales deben provenir de los cereales gruesos, incluyendo el maíz, los cuales tienen ventajas comparativas en ambientes desfavorables. El maíz no ha alcanzado aún el límite de difusión en los ambientes productivos es el momento oportuno para aprovechar su alto potencial de producción.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área experimental

El trabajo experimental se realizó en un invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México, durante el verano del 2003.

Descripción del área experimental

El invernadero es de tipo baticenital, con cubierta de polietileno, ventilación zenital pasiva y cortinas movibles.

Material genético utilizado

Se utilizó una población criolla (Jagüey) adaptada a la localidad de Jagüey de Ferniza, Saltillo, Coah. (2100 msnm) que ha sido mantenida sobre los agricultores a través de selección masal tradicional, y una población mejorada experimental (CPRE), desarrollada por el programa de Bajío del Instituto Mexicano del Maíz. Así mismo, se incluyeron las combinaciones entre las dos poblaciones seleccionadas por su madurez precoz (F1#SP) y tardía (F1#ST). En cada una de estas poblaciones se realizaron retrocruzas hacia cada una de las poblaciones parentales generándose las siguientes combinaciones: (F1 # SP) x Jagüey; (F1 # SP) x CPRE; (F1 # ST) x Jagüey; (F1 # ST) x CPRE, dando un total de 8 genotipos de maíz.

Establecimiento del experimento

Las semillas fueron sembradas en macetas plásticas de 1 L, llenas con turba canadiense Sunshine 3 preparada con macro y micronutrientes.

Las macetas fueron colocadas en contenedores de polietileno y se utilizó el sistema de flotación para la aplicación de agua.

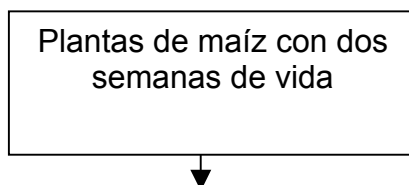
Dos semanas después de emergidas las plántulas se aplicó en el agua de riego una solución Douglas (1976), para proporcionar nutrientes al cultivo, cuyos elementos y concentraciones se indica en el Cuadro 3.1

Cuadro 3.1 Solución Douglas (1976) aplicada a los genotipos de maíz en el verano del 2003.

Elemento	Concentración mg L ⁻¹	Elemento	Concentración mg L ⁻¹
N	169	Fe	0.13
P	5.61	Mn	0.08
K	175	Zn	0.06
Ca	176	B	0.04
Mg	247	Cu	0.013
S	22.06	Mo	0.0001

Esta aplicación de nutrientes minerales fue mantenida durante dos semanas; después, en la mitad de las plantas se continuó aplicando la solución Douglas mientras que en la otra mitad se adicionó una solución nutritiva salina con 375 mM de NaCl (21.9 g L⁻¹) durante una semana, para luego aplicar únicamente la solución Douglas sin NaCl durante la siguiente semana.

Este ciclo de exposición-recuperación fue repetido en tres ocasiones. Los intervalos del ciclo se indican esquemáticamente en la Figura 3.1



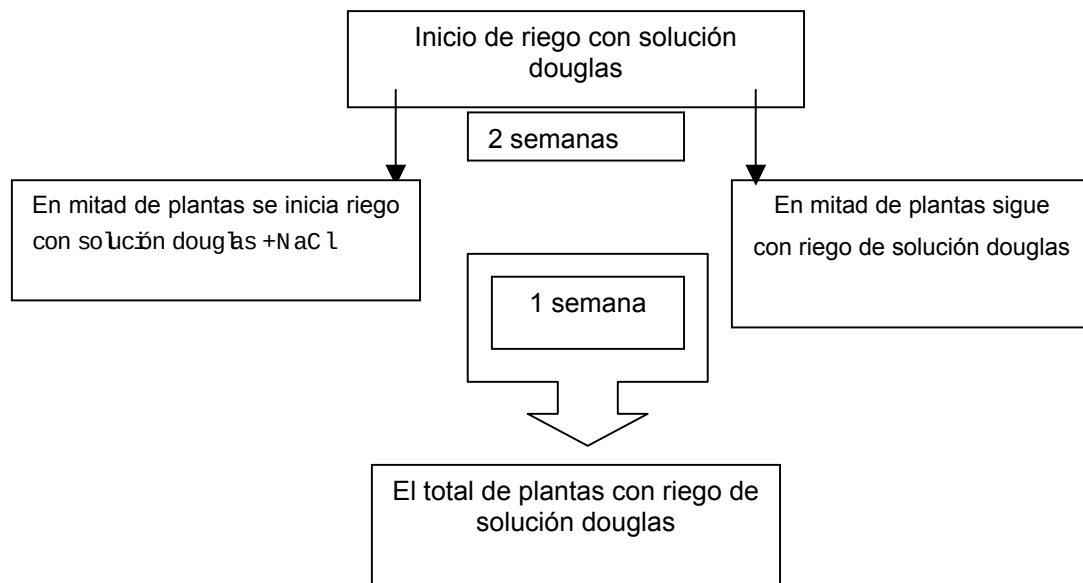


Figura 3.1 Modelo esquematizado de los intervalos de estrés y recuperación en maíz en el verano del 2003.

Diseño experimental

El diseño utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial de ocho genotipos por dos niveles de aplicación de NaCl y diez repeticiones. Se realizó un análisis de varianza para probar los efectos de genotipos, tratamientos y su respectiva información. La comparación de los niveles de tratamientos en los factores fue realizada por medio de una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Variables evaluadas

Densidad estomática, densidad de células tabicadas e índice estomático.

Durante el último periodo de recuperación, una vez aplicados los tres ciclos de exposición-recuperación, en dos plantas tomadas al azar de cada genotipo y nivel de salinidad, se obtuvieron impresiones foliares de la superficie adaxial y

abaxial de la hoja más joven totalmente expandida, con una mezcla de poliestireno y xilol (Benavides *et al.*, 2004).

En las impresiones foliares (Figura 3.2) se contaron los estomas y células tabicadas (células epidérmicas no estomáticas) en tres campos elegidos al azar de cada superficie foliar, con un microscopio de luz compuesto con un lente ocular de 10x y en objetivo de 40x.

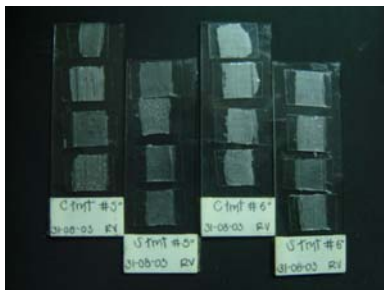


Figura 3.2 Impresiones foliares en portaobjetos para analizar en microscopio compuesto.

La densidad estomática (DE) y la densidad de células tabicadas (DCT) fueron determinadas como el número de células por unidad de área (mm^2); el índice estomático (IE) fue calculado con la fórmula:

$$\text{IE} = [(\text{Número de estomas}) / (\text{Número de estomas} + \text{células tabicadas})] * 100$$

Biomasa

Al terminar el último periodo de recuperación se tomaron al azar seis plantas de cada genotipo y nivel de salinidad, las cuales fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente para determinar el peso húmedo de la parte aérea y de la raíz, usando una balanza analítica OHAUS (Figura 3.3). Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel y fueron secadas en una estufa deshidratadora a 65 °C hasta obtener peso constante.



Figura 3.3 Muestras de tejido vegetal de ocho genotipos de maíz en estufa de secado

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Densidad estomática e índice estomático

Los valores de densidad estomática encontrados en invernadero (Cuadro 4.1) son de dos a tres veces más altos a los reportados por Verdugo *et al.* (1999)¹ en campo. La discrepancia puede deberse a las condiciones ambientales en las que se encontraban las plantas o por la diferencia del tiempo de vida que llevaban. La densidad estomática y el índice estomático son regulados por factores endógenos y ambientales como la luz, el CO₂ y los gradientes de altitud (Boetsch *et al.*, 1996; Schoettle y Rochelle, 2000).

¹ Verdugo, V, A Rojas, A De León, B Zambrano, S Barrios, E León, B Ríos, A Benavides (1999) Estimación del índice estomático y la frecuencia estomática en cuatro variedades de ajo (Allium sativum L.). <http://www.dradalbertobenavides.com/estomajo.htm>. Consultado 5/mayo/2004.

El análisis de varianza no mostró diferencia estadísticamente significativa entre genotipos para las cinco variables bajo estudio, como lo muestran los valores medios del Cuadro 4.1, así como también las Figuras 4.1 y 4.2.

Cuadro 4.1 Promedio de la densidad estomática (DE), densidad de las células tabicadas (DCT) e índice estomático (IE) en ocho genotipos de maíz.

Genotipos	DE adaxial [†]	DE abaxial	DCT adaxial	DCT abaxial	IE adaxial
1-Jagüey	112.2	239.8	1051.0	1341.8	9.7
2-CPRE	158.2	285.7	1148.0	1561.2	12.3
3-F1#SP	148.0	260.2	1301.0	1459.2	10.2
4-F1#ST	158.2	295.9	1306.1	1678.6	10.8
5-(F1#SP)xJagüey	112.2	260.2	1000.0	1326.5	10.2
6-(F1#SP)xCPRE	148.0	290.8	1285.7	1520.4	10.3
7-(F1#ST)xJagüey	199.0	270.4	1214.3	1352.0	14.1
8-(F1#ST)xCPRE	153.1	306.1	1102.0	1387.8	12.3

[†] Las densidades estomáticas (DE) y de las células tabicadas (DCT) se expresan en células mm⁻², el índice estomático (IE) se expresa como porcentaje.

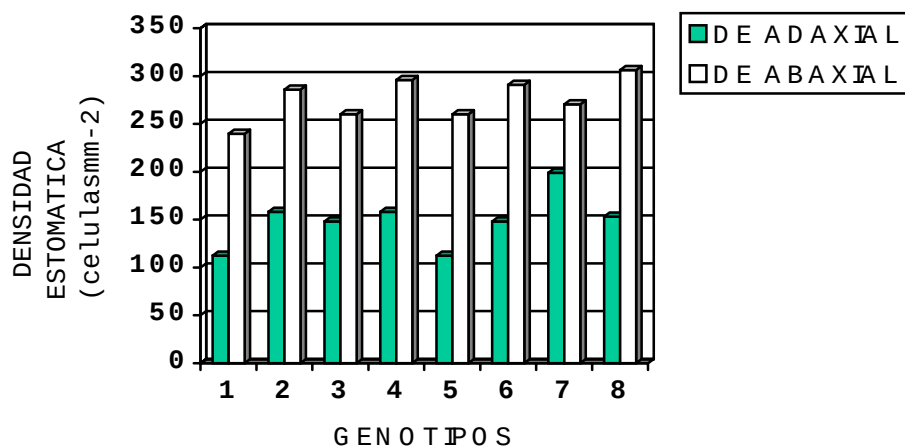


Figura 4.1 Resultados promedio de la densidad estomática adaxial y abaxial de las plantas con solución + NaCl.

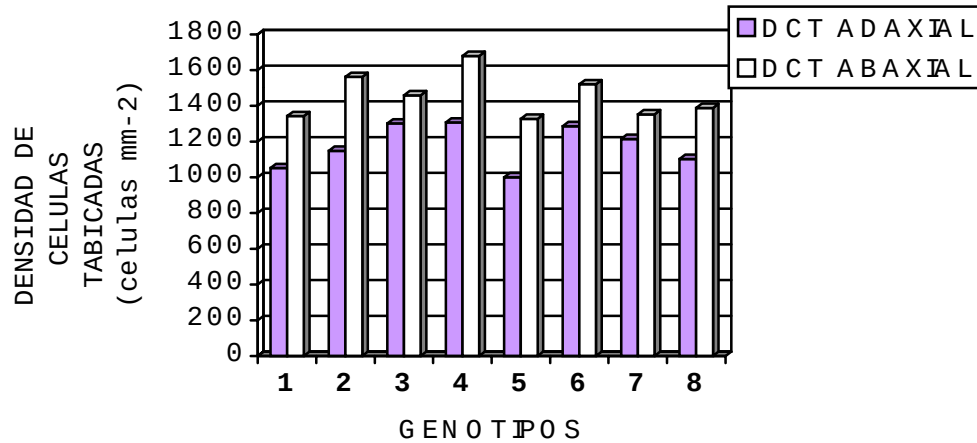


Figura 4.2 Resultados promedio de la densidad de células tabicadas en la parte adaxial y abaxial de las plantas con solución + NaCl

Los resultados del análisis de varianza no mostraron diferencias estadísticas entre genotipos, entre niveles de salinidad, así como en la interacción genotipo por salinidad, ni para las variables estomáticas (DE, DCT, IE) excepto para la densidad estomática en la superficie abaxial que disminuyó al aplicar el NaCl en la solución nutritiva (Cuadro 4.2 y Figura 4.3)

Cuadro 4.2 Significancia entre las variables evaluadas en ocho genotipos de maíz en dos ambientes, con y sin salinidad inducida con NaCl.

Factores	DE adaxial †	DE abaxial	DCT adaxial	DCT abaxial	IE adaxial	IE abaxial
0 mM	153.1	293.4	1150.5	1479.6	11.8	16.6
375 mM	144.1	259.0	1201.5	1427.3	10.7	15.4
G	0.07	0.45	0.04	0.10	0.29	0.34
NaCl	0.49	0.04	0.33	0.40	0.26	0.11
G x NaCl	0.65	0.20	0.71	0.36	0.60	0.27

† Las densidades estomáticas (DE) y de las células tabicadas (DCT) se expresan en células mm^{-2} , el índice estomático (IE) se expresa como porcentaje.

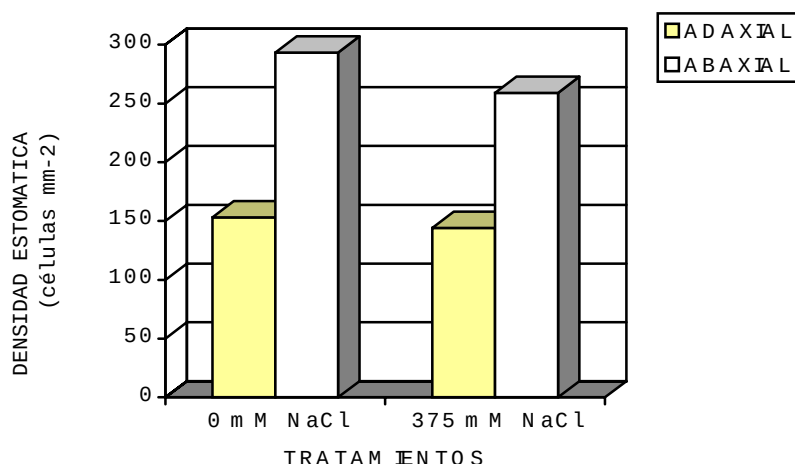


Figura 4.3 Promedio de estomas (células mm^{-2}) en lado abaxial y adaxial de las hojas de ocho genotipos de maíz bajo tratamiento con y sin NaCl.

Esta respuesta de cambio en la anatomía foliar es similar a la descrita para las plántulas de trigo, aunque es un cultivo diferente, cuyas semillas fueron germinadas en medio salino (Benavides-Mendoza *et al.*, 2003).

En otro experimento referido a plántulas de chile sometidas a baja temperatura fue posible observar una disminución en la cantidad relativa de estomas en la superficie adaxial, pero acompañada de aumento en el lado abaxial (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004).

En la dicotiledónea *Salix psammophila*, Xiao (2001) encontró que la densidad estomática abaxial aumentó con bajo aporte de agua y disminuyen al aumentar el riego a las plantas.

Aunque estas menciones se refieren a otros cultivos y ambientes a nuestro trabajo, si ha habido respuestas en cambios epidermales pero aún no tienen una explicación aceptada para estos hechos, es probable que éstos se relacionen con ajustes en la eficiencia en el uso del agua.

Biomasa

Los genotipos que indican la combinación del germoplasma criollo con mejorado (F1#SP y F1#ST) mostraron mayores valores de peso seco, que el resto de los materiales genéticos evaluados, incluyendo las poblaciones parentales (Jagüey y CPRE), posiblemente atribuible a la heterosis (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3 Promedio del peso seco (g/ planta^{-1}) aéreo (PSA), de la raíz (PSR) y total (PST) en ocho genotipos de maíz.

Genotipos	PSA	PSR	PST
1-Jagüey	1.822 b [†]	1.156 b	2.978 b
2-CPRE	1.408 b	0.990 b	2.398 b
3-F1#SP	2.397 a	1.581 a	3.978 a
4-F1#ST	2.417 a	1.468 a	3.885 a
5-(F1#SP)xJagüey	1.369 b	1.249 b	2.618 b
6-(F1#SP)xCPRE	1.515 b	1.040 b	2.556 b
7-(F1#ST)xJagüey	1.703 b	1.252 b	2.956 b
8-(F1#ST)xCPRE	1.887 b	1.298 b	3.186 a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

El efecto de la aplicación de NaCl en la solución nutritiva fue negativo para la parte aérea de la planta, por la restricción del crecimiento, en cambio para la raíz el efecto fue positivo, de modo que el efecto de la salinidad en el peso seco total no fue significativo por la diferencia de los resultados. (Figuras 4.4, 4.5 y Cuadro 4.4)

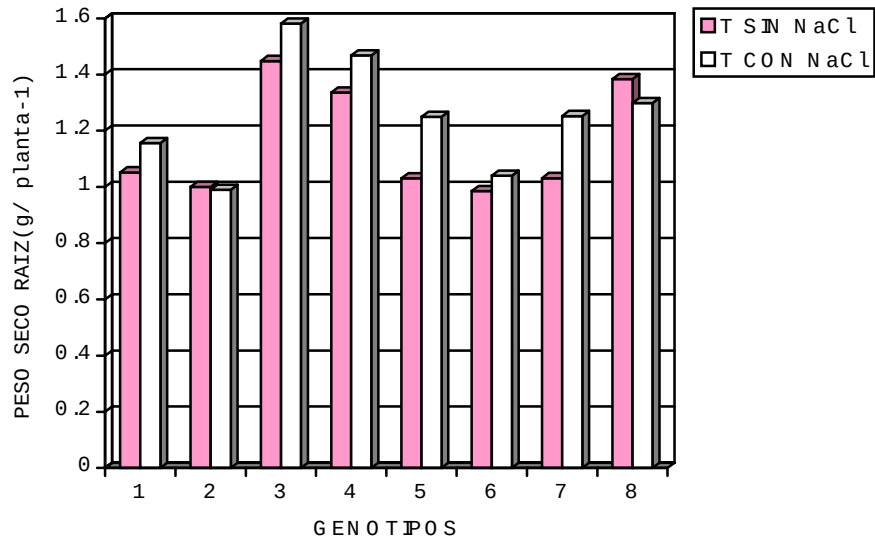


Figura 4.4 Valores de PS de parte radicular (g/ planta⁻¹) de ocho genotipos de maíz sometidos a solución nutritiva con y sin NaCl.

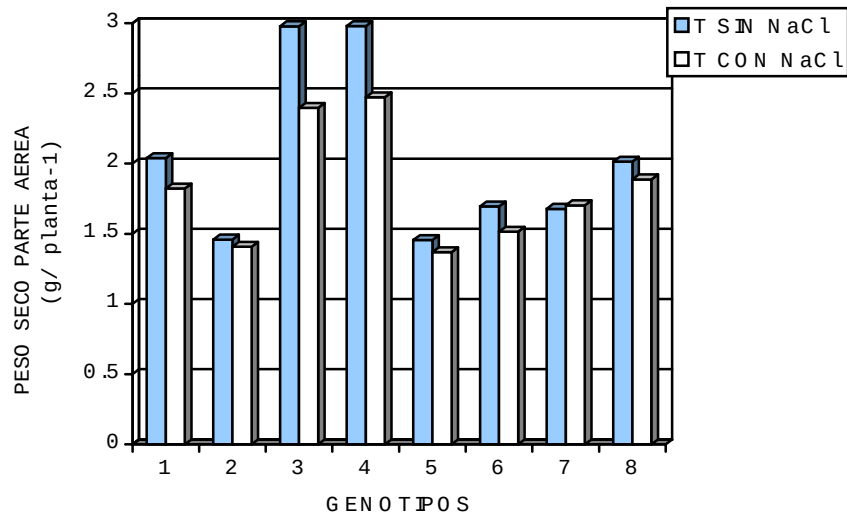


Figura 4.5 Valores de PS de la parte aérea (g/ planta⁻¹) de ocho genotipos de maíz sometidos a solución nutritiva con y sin NaCl.

Cuadro 4.4 Significancia entre variables evaluadas peso seco (g/ planta⁻¹) aéreo (PSA), de la raíz (PSR) y total (PST) en ocho genotipos de maíz en dos ambientes, con y sin salinidad inducida con NaCl y resultados del análisis de varianza por genotipo, salinidad y su interacción.

NaCl (mM)	PSA	PSR	PST
0	2.038	1.158	3.196
325	1.592	1.350	2.943
Significancia	PSA	PSR	PST
G	P<0.01	0.03	P<0.01
NaCl	P<0.01	0.04	0.20
G x NaCl	0.24	0.69	0.61

En la mayoría de las especies cultivadas, la salinidad también ejerce efectos negativos en el crecimiento, pero en algunos reportes se detectó, como en este caso, menor inhibición del crecimiento de la raíz por la salinidad que en la parte aérea (Larcher, 1995).

Durante el desarrollo de la plántula de maíz, el incremento diferencial de la raíz se considera un mecanismo de resistencia al estrés, que está asociado con osmoregulación efectiva (Maiti *et al.*, 1996).

Por otra parte, Fernández-Ballester *et al.* (2003) encontraron que la exposición de *Citrus aurantium* y *Citrus macrophylla* (utilizados comúnmente como patrones en los viveros de limón) a soluciones de 1, 10, 20, 30 y 60 mM durante 14 días, restringió el crecimiento radical y afectó menos el crecimiento aéreo de *C. Aurantium*. Una respuesta contraria se observó en *Citrus macrophylla*.

El grado en el cual el crecimiento disminuyó, difiere grandemente entre especies y en menor extensión, entre cultivares o variedades dentro de la especie. Ashraf y McNeilly (1990) encontraron diferencias entre genotipos de maíz en la tolerancia a la salinidad de las plántulas. Dichas diferencias se pueden capitalizar con ciclos posteriores de selección. Otro ejemplo de respuesta a la salinidad fue presentado por Fernández-Ballester *et al.* (2003), quienes verificaron el crecimiento de plántulas de *Citrus aurantium* y *Citrus macrophylla* de 45 días de edad en soluciones de 1, 10, 20, 30 y 60 mM de NaCl aplicada durante 14 días. *C. aurantium* acumuló mayor cantidad de Na⁺ y Cl⁻, afectándose grandemente el

crecimiento radical y menos el crecimiento foliar, en comparación con *C. macrophylla* que presentó una tasa baja de absorción de Na^+ y Cl^- al final del experimento, observándose en este caso mayor crecimiento radical.

V. CONCLUSIONES

Se observaron diferencias en la tolerancia a la salinidad entre los ocho genotipos de maíz, encontrando que las combinaciones entre las poblaciones criolla y mejorada (híbridos F1) mostraron aumento atribuible a la heterosis.

La exposición de las plantas a la salinidad disminuyó la biomasa de la parte aérea aumentando la de la raíz.

El efecto de la salinidad sobre la biomasa total no fue significativo.

El estrés salino disminuyó la densidad estomática en la superficie abaxial de las hojas pero dicha respuesta no se asoció consistentemente con la biomasa.

LITERATURA CITADA

Ashraf M, T McNeilly (1990) Improvement of salt tolerance in maize by selection and breeding. *Plant Breeding* 104:101-107.

Benavides, M., A. (2002). *Ecofisiología y Bioquímica del Estrés en Plantas*. Depto. De Horticultura. UAAAN. Saltillo, Coah, México. 220 p.

Benavides-Mendoza A, J Garnica-Serna, A Michtchenko, C Hernández-Aguilar, H Ramírez-Rodríguez, J Hernández-Dávila, V Robledo-Torres (2003) Respuesta al estrés y crecimiento de plántulas cuyas semillas fueron irradiadas con láser de baja intensidad. *AGROFAZ* 3:269-272.

Benavides-Mendoza A, A M Salazar-Torres, F Ramírez-Godina, V Robledo-Torres, H Ramírez-Rodríguez, R K Maiti (2004) Tratamiento de semilla de chile con ácido salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío. *Terra Latinoamericana* 22:41-47.

Boetsch J, J Chin, M Ling, J Croxdale (1996) Elevated carbon dioxide affects the patterning of subsidiary cells in *Tradescantia* stomatal complexes. *J. Exp. Bot.* 47:925-931.

Clarkson D T (1991) Root structure and sites of ion uptake. *In: Plant Roots: The Hidden Half*. Y Waisel, A Eshel, U Kafafi (eds.). Marcel Dekker, New York. pp: 417-453.

Douglas J S (1976) *Advanced Guide to Hydroponics*. Drake Publishers, Inc. New York, USA. 195 p.

Fernández-Ballester, G., F. García-Sánchez, A. Cerda, V. Martínez. (2003). Tolerance of citrus rootstock seedlings to saline stress based on their ability to regulate ion uptake and transport. *Tree Physiol.* 23(4):265-271.

Esau, K.(1977). *Anatomy of seed plants*. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Gates, D.M.(1980). *Biophysical ecology*. Springer- Verlag New York, Inc. New York.

Hernández J A, M S Almansa (2002) Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiol. Plant.* 115:251-257.

Howard, (1969). Stomatal Density and Responsiveness of Banana Fruit Stomates *Plant Physiology* 41: 99 –101.

Kakani V G, K R Reddy, D Zhao, A R Mohammed (2003) Effects of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. *Ann. Bot.* 91:817-826.

Kuruvadi, S. (1989). Frecuencia y Tamaño de los Estomas en Ambientes de Riego y Temporal en Frijol común Phaseolus vulgaris L. Centro de Estudio Horticultura Industrial. Bari, Italia. 33: 2,93-106.

Larcher W (1995) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 506 p.

Maiti, R. K., L. E. Delgado-Amaya, S. Ibarra-Cardena, A. Ontiveros-Dimas, M. de la Rosa-Ibarra, Humberto de León-Castillo (1996) Genotypic variability in maize cultivars (*Zea mays* L.) for resistance to drought and salinity at the seedling stage. *J. Plant Physiol.* 148:741-744.

Nederhoff, E.M. (1994). Effect of CO₂ Concentration on Photosynthesis, Transpiration and Production of Green house fruit Vegetable, Crops the Gasshouse Research Station, Netherlands. Pp. 93-101.

Neogy M, J Datta, A K Roy, S Mukerji (2003) Studies on phytotoxic effect of aluminum on growth and some morphological parameters of *Vigna radiata* L. Wilczek. J. Environ. Biol. 23:411-416.

Pérez, B.H. y Chan, C. J. L. (1986). Densidad Estomática del Durazno y Nectario de Riego y del Duraznero de Temporal. Fitotecnia 8: 177-186.

Piña, J.M. (1994). El Cultivo del chícharo (*Pisum sativum* L.): Su respuesta bajo condiciones de acolchado de suelos y azufre elemental. Tesis de Licenciatura en Biología. División de Ciencias Biológicas, ICCAC. Saltillo, Coah.

Roth, I. (1976). Anatomía de las Plantas Superiores. Segunda Edición. Universidad de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Caracas Venezuela.

Salisbury, F. C. Ross, (1994). Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México, D.F. 759 p.

Schoettle A W, S G Rochelle (2000) Morphological variation of *Pinus flexilis* (Pinaceae), a bird disperse pine, across a range of elevations. Am. J. Bot. 87:1797-1806.

Tattini, M, G Montagni, M L Traversi (2002) Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in *Phillyrea latifolia* grown at various salinity concentrations. Tree Physiol. 22:403-412.

Willmer, (1983). Stomat. Editorial Mc-Grill. USA.

Xiao C W (2001) Effect of different water supply on morphology, growth and physiological characteristics of *Salix psammophila* in Maowusu sandland, China. J. Environ Sci. 13:411-417.

Yeo A R (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49:915-929.