

Características de los estomas, índice y densidad estomática de las hojas de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre ocho patrones cítricos

Characteristic of the stomas index and stomatic density of leaves of Tahití lime (*Citrus latifolia* Tanaka) implanted on eight citric rootstocks

Cañizares, Adolfo¹; Sanabria, Maria Elena¹, Rodríguez, Dorian A.² y Perozo, Yaritza²

¹INIA- CIAE- Monagas. San Agustín de la Pica. Vía Laguna Grande: Estado Monagas. Telfax. 0291-641-3349. Email: acanizares2@hotmail.com, acanizares@inia.gov.ve. ²Posgrados de Agronomía; Programa Fitopatología. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Email. mesanabria@ucla.edu.ve y rdorian@ucla.edu.ve.

RESUMEN

Las hojas de la lima Tahití (*C. latifolia* Tanaka) son anfiestomáticas y la formación de los estomas parece cesar cuando la lámina foliar alcanza aproximadamente una cuarta parte del tamaño definitivo de este órgano. A fin de evaluar el efecto de ocho patrones cítricos sobre el número e índice estomático (NEST-IE), se colectaron cuatro hojas por planta de las ramas con crecimiento secundario del tercio medio de la copa de lima Tahití y se fijaron en FAA 70 % (Alcohol etílico: Acido acético: Formol); posteriormente se realizaron preparaciones semi-permanentes de aclarados de segmentos epidérmicos de ambas superficies y en los tercios apicales, medios y basales de la lámina. La tinción se realizó con verde malaquita y el montaje con agua- glicerina (1:1). Las observaciones se realizaron con un microscopio Olympus Bx40 y con objetivo de 400X. Para el análisis se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones y ocho tratamientos. Los resultados señalan que los valores más elevados en cuanto a NEST e IE en la superficie adaxial se presentaron en las láminas foliares Lima Tahití/Citrango carrizo y Lima Tahití/Citrango Uvalde y en la abaxial se correspondieron con Lima Tahití/Citrusmelo Swingle y Lima Tahití/Mandarina Cleopatra. Se presentó además diferencias significativas ($P \leq 0,01$) entre el índice y el número de estomas en los tercios apical, medio y basal, mientras en la superficie adaxial los mayores valores de estas variables se ubican en el tercio basal, mientras que en la abaxial se ubican en el tercio apical. Los patrones del grupo Citrange, Mandarina Cleopatra y Citrusmelo Swingle, tienen influencia sobre el NEST e IE, además en la lámina foliar de la lima Tahití se presenta un mayor número de estomas en el tercio apical y basal, dependiendo de la superficie de la hoja.

Palabras claves: Estomas, densidad estomática, índice estomático, patrones.

ABSTRACT

The leaves of Tahiti lime (*C. latifolia* Tanaka) are anfistomatics and the formation of the stomas seems to cease when the foliar lamina reaches approximately a fourth of the definitive size. In order to evaluate the effect of eight citric rootstocks on the number and stomatic index (NEST. IE); leaves were collected from the third half of the treetop; in the branches with secondary growth, four leaves were collected by plants, and they were fixed in FAA 70% (ethylic Alcohol: Acetic acid: Formol); them it were made semi-permanent preparations of clarified of epidermal segments of both surfaces and in the apical, half and basal thirds of the lamina. The tint was made with malachite green and the assembling with water - glycerine. The microscopic observations were carried out with a microscope Olympus Bx40 and with objective of 400X. For the analysis it was used completely randomized design with four repetitions and eight treatments. The results indicate that the highest values for NEST and IE in the adaxial surface were presented in the foliar laminas of Tahiti lime/Citrango carrizo and Tahiti lime/Citrango uvalde and in the abaxial one they were corresponded with Tahiti lime/Citrusmelo swingle and Tahiti lime/Mandarina Cleopatra. In addition, there were significant differences ($P < 0,01$) between the index and the stomas number in the thirds apical, half and basal; on the other way, in the adaxial surface the biggest values of these variables are located in the basal third, while in the abaxial one, in the third apical. The patroness of the group Citrange, Mandarin Cleopatra and Citrusmelo Swingle, have influence on the NEST and IE, also in the foliar lamina of the file Tahití lime a bigger number stomas is presented in the third apical and basal, depending on the face of the leaf.

Key words: Stomas, stomatic density, stomatic index, rootstocks

INTRODUCCIÓN

De todos los órganos de las plantas, la hoja es el mas flexible en responder a las condiciones del

medio ambiente, en éstas se refleja más claramente que en el tallo o la raíz los efectos de estreses por condiciones ambientales o heterogeneidad (Levit, 1980). La asimilación y respiración, ritmos dirigidos

por hormonas y movimientos inducidos por el medio ambiente parten de la hoja y solamente pueden ser realizados cuando el clima, el suelo y la vida circundante no entorpecen estas funciones (Vareschi, 1992).

Entre las estructuras que conforman el tejido epidérmico, se ubican los estomas formados por un ostiolo rodeado por dos células oclusivas de forma arriñonada, las cuales pueden estar acompañadas o no por otras células epidérmicas estructural y fisiológicamente asociadas a los estomas, que reciben el nombre de subsidiarias (Ruiz *et al.*, 1962; Lindorff *et al.*, 1991, Flores-Vindas, 1999).

La posición de los estomas sobre la superficie de la lámina es variable en sección transversal; se pueden presentar hundidos, al mismo nivel de las otras células epidérmicas o proyectarse hacia el exterior de la lámina (Flores-Vindas, 1999). Otra característica es la distribución en la superficie de la lámina foliar, en las hojas en las cuales estas estructuras se ubican en la epidermis superior de la lámina se conocen como epiestomáticas; si están en la inferior, son hipostomáticas y por último, si se presentan en ambas superficies, adaxial y abaxial, son anfiestomáticas (Flores-Vindas, 1999).

Sánchez-Díaz y Aguirreolea (1996) consideraron que los estomas tienden a ser mas frecuentes en la superficie abaxial de las hojas y en algunas especies, sólo se presentan en esta. A juicio de estos mismos autores, estas estructuras desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la planta y de ahí la importancia de conocer tanto el número como la forma en que los poros se abren y se cierran como también los factores que controlan estos procesos. Las láminas foliares de las hojas de la lima Tahiti (*C. latifolia* Tanaka) son hipoestomáticas y la formación de los estomas parece cesar cuando este órgano alcanza aproximadamente una cuarta parte del tamaño definitivo (Chaudler, 1962).

Roth *et al.* (1986) plantearon que en los estudios relacionados con la anatomía foliar, se deben considerar fenómenos anatómicos individuales tales como los índices estomáticos (IE), y que este valor puede variar dentro de la misma hoja según la parte del limbo que se utilice (ápice, media o base), en el mismo individuo cuando se consideran las hojas en diferente posición en la planta, además el ambiente ecológico puede ejercer cierta influencia sobre este

carácter. Del mismo modo, la densidad estomáticas (DE) alta o baja parece estar relacionada con ciertas familias, también existe una relación conspicua entre la DE y el tamaño de las células oclusivas, así altas densidades se presentan en plantas con células oclusivas pequeñas. Sanabria (2003) encontró que las hojas de *Heliconia latispatha* Bentham (Heliconiaceae) presentan mayores valores de DE y los IE más altos.

La frecuencia estomática es el número de estomas por unidad de área de superficie foliar (Esau, 1972) y según Wilkinson, (1979) representa un valor diagnóstico para fragmentos de láminas foliares. Este mismo autor señala que el IE sirve para expresar el número de estomas por superficie foliar, independientemente del tamaño de las células epidérmicas. Tanto la DE como el IE pueden estar influenciados por las condiciones ambientales y nutricionales (Esau, 1972; Wilkinson, 1979; Roth *et al.*, 1986). Verdugo *et al.* (1999) afirmó que las hojas con mayores valores de IE presentan los mayores valores de DE.

La transpiración y la intensidad de la respiración está en razón directa al número y abertura de los estomas y como las hojas son los principales órganos de las plantas donde se realiza la fotosíntesis, la cantidad y distribución de los estomas influyen directamente sobre la asimilación clorofílica (Ruiz *et al.*, 1962). Rubino *et al.* (1989) y Thakur (1990) señalan que la disminución de la cantidad de estomas por mm² incrementa la resistencia estomática de la planta y de esta manera evita un exceso de transpiración; sin embargo, tanto la DE como el IE son tan variables que están fuertemente influenciadas por diversas condiciones estresantes como condiciones de sequía y altas concentraciones salinas además el material vegetal que se trate (Salas *et al.*, 2001; Bethke y Drew, 1992; Rubino *et al.*, 1989).

A juicio de Lindorff *et al.* (1991) consideran el número de estomas por unidad de superficie es muy variable; sin embargo Verdugo *et al.* (1999) consideran que poco se sabe acerca de la regulación de los programas de desarrollo que generan los patrones de densidad y distribución estomática en respuesta a variables ambientales, encontrando diferencias entre los promedios de densidad estomática de variedades de ajo (*Allium* sp.), las cuales no fueron significativas entre la tercera y cuarta hoja, ni entre las superficies adaxiales y abaxiales, y según los resultados de estos mismos

autores, las hojas con mayores valores de densidad estomática, también presentaron los mayores valores de índice estomático. Schoch *et al.* (1980) confirmaron que el índice estomático es una función total de la radiación recibida y de las variaciones que experimenta durante los días precedentes a la diferenciación de los estomas de la hoja.

Esau (1972) establece un rango de 100 a 300 estomas/mm² en las angiospermas; Napp (1974) estima para hojas de diferentes especies valores de 1 a 2.000 estomas/mm² y Leegod (1993) determinó para el envés de las hojas de plantas C3, de 40 a 300 estomas/mm². A juicio de Lindorff *et al.* (1986) y Mérida (1986) no solamente las condiciones ambientales influyen sobre los valores de densidad estomática, también la alta o baja densidad está relacionada en cierto modo con las familias de plantas. Pares *et al.* (2003) al estudiar la densidad e índice estomático en hojas de *Annona muricata*, *A. montana*, *A. muricata/A. muricata* y *A. muricata/A. montana*, concluyeron que la técnica de injertación afectó los valores de DE disminuyendo el número de estomas/mm², lo que se puede interpretar como un aspecto positivo ya que se aumenta la resistencia estomática, incrementando la adaptabilidad de las plantas a condiciones estresantes en el suelo. En este caso, los mayores valores de DE coincidieron con los mayores valores de IE.

Los objetivos del presente estudio fueron caracterizar los estomas de las láminas foliares de lima Tahiti (*C. latifolia* Tanaka), determinar el índice estomático y número de estomas /mm² de los tercios apicales, medios y basales y su variación en función a la injertación sobre ocho patrones cítricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal evaluado consistió en hojas completamente desarrolladas de lima Tahiti (*C. latifolia* Tanaka) injertada sobre ocho patrones cítricos: limón Volcameriano, limón Cravo, mandarina Cleopatra, Citrange carrizo, Citrange Uvalde, Citrusmelo Swingle, Citrange Troyer y Citrange Yuma; colectadas en el Campo Experimental Santa Bárbara, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicado a 195 m.s.n.m.

Se colectaron cuatro (4) hojas del tercio medio de la copa, las ubicadas en el nudo número ocho en sentido basípeto de las ramas con crecimiento

secundario, considerando al eje principal como el punto de partida, de orden cero. De cada hoja se fijaron en F:A:A 70% (Cutler, 1978) los tres tercios. De esta muestra se tomaron segmentos que se sometieron a una solución con hipoclorito de sodio al 40% y se calentaron hasta que se separaron las epidermis adaxiales y abaxiales, otros se seccionaron transversalmente para ser usados en la determinación de la ubicación de los estomas con respecto a las restantes células epidérmicas. Las muestras procesadas se tiñeron con eosina y se hicieron los montajes semipermanentes con agua-glicerina (1:1) (Salas *et al.*, 2001).

Se realizaron un total de 20 observaciones correspondientes a las cuatro repeticiones por cada tratamiento. La caracterización de los estomas y la determinación del índice estomático (IE) y la densidad estomática (DE) se realizaron con un microscopio óptico OLYMPUS BX40 en un cuerpo de 400X. El I.E se calculó utilizando la fórmula sugerida por Wilkinson (1979):

$$IE = \frac{NE}{CE + NE} \times 100$$

Donde:

NE : número de estomas

CE : número de células epidérmicas.

La DE se obtuvo determinando el número de estomas observados en un área de 4,347 mm², equivalente al diámetro del campo observado.

El diseño estadístico empleado fue un completamente aleatorio, con ocho tratamientos y cuatro repeticiones. Las variables cuantitativas determinadas se procesaron estadísticamente mediante el análisis de varianza y los valores medios de los tratamientos fueron comparados mediante el método de la mínima diferencia significativa. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Statistix (versión 2, Analytical software).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estomas de la lámina foliar de las hojas de lima Tahiti resultaron ser del tipo anisocíticos. Estos resultados coinciden con Sánchez-Díaz y Aguirreoles (1996) en el sentido de que estas estructuras tienden a ser más frecuentes en la superficie abaxial de las hojas; y contrario a lo

establecido por Chaudler (1962), la lámina foliar fue anfistomática (Flores-Vindas, 1999).

El cuadro 1 muestra los valores de IE y DE en la lámina foliar de lima Tahiti injertada sobre ocho patrones cítricos. Se encontró un efecto producido por el patrón sobre estas variables, siendo los valores de IE en la superficie adaxial en los patrones Citrange Carrizo y Citrange Uvalde estadísticamente superiores ($p \leq 0,01$) al resto de los patrones; sin embargo en la superficie abaxial de la hoja el comportamiento es diferente, siendo los patrones mandarina Cleopatra y Citrusmelo Swingle, estadísticamente superiores al resto.

Tal cual lo establecido por Schoch *et al.* (1980); Roth *et al.* (1986); Lindorff *et al.* (1991), se observaron diferencias entre los valores de DE para ambas superficies; en la adaxial las hojas de los patrones mandarina Cleopatra y Citrusmelo Swingle presentaron los valores más altos de DE y en la abaxial el mayor valor lo presentaron los patrones Citrange Carrizo y Citrange Uvalde. Los resultados obtenidos demuestran que existe variación en el IE y DE en la superficie de la lámina de la hoja de lima con respecto al patrón o portainjerto utilizado. Estos resultados se corresponden con lo observado por Pares *et al.* (2003) en plantas de Guanábana, donde la técnica de injertación afectó los valores de DE, lo que se podría interpretarse como un aspecto positivo, debido a que aumenta la resistencia estomática, incrementándose la adaptabilidad de las plantas a las

condiciones edafoclimáticas de las zonas. Napp (1974) considera que los valores de IE y DE son diferentes en las especies, cabe destacar que aunque la copa es lima Tahiti, los patrones son diferentes especies pertenecientes al género *Citrus*.

El Cuadro 2 muestra los valores promedios de IE y DE en las superficies adaxial y abaxial de la lámina de lima Tahiti, en los tercios apical, medio y basal. Se encontró que en la superficie adaxial los valores de IE y DE en el tercio basal resultaron estadísticamente superiores ($p \leq 0,01$) al resto de los tercios. Tanto el IE y la DE son iguales en su valor numérico en los tercios estudiados, sin embargo en la superficie abaxial el IE y la DE de los tercios apical y medio resultaron estadísticamente iguales y diferentes al tercio basal, estos resultados confirman lo establecido por Roth (1986) y esta variación puede deberse a las condiciones agroecológicas de sabanas del Municipio Santa Bárbara, Estado Monagas, donde los suelos son arenosos, retienen poca humedad, son bajos en fertilidad y las condiciones climáticas varían durante el año, presentándose periodos largos de sequía (Cuadro 3).

La fuerte reducción del IE y DE en la superficie adaxial de la lámina foliar de la lima fue compensada por un incremento de estos valores para la abaxial, lo que indica una respuesta de la planta a las condiciones edafoclimáticas adversas. A juicio de Martín *et al.* (1994) estos cambios en la anatomía de la hoja están relacionados con el estrés hídrico.

Cuadro 1. Índice estomático y densidad estomática en las superficies de las hojas de plantas de lima Tahiti injertadas sobre ocho patrones cítricos.

Patrones	Superficie adaxial				Superficie abaxial			
	Índice estomático		Número de estomas		Índice estomático		Número de estomas	
C. carrizo	18,5	a	78,4	ab	340,4	ab	4,3	a
L. Cravo	14,0	ab	73,0	b	316,9	b	3,5	ab
C. Troyer	8,9	bc	39,7	c	172,9	c	2,1	bc
L. Volcameriano	6,6	bc	47,0	c	204,0	c	1,5	bc
M. Cleopatra	4,5	c	86,4	a	375,1	a	1,0	c
C. Uvalde	18,5	a	82,9	ab	359,8	ab	4,3	a
C. Swingle	4,5	c	88,9	a	386,0	a	1,1	c
C. Yuma	0,4	c	80,8	ab	350,6	ab	0,08	c

Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí al 1% según la prueba de la mínima diferencia significativa.

Cuadro 2. Índice estomático y densidad estomática promedio en las superficies de las hojas de plantas de lima Tahiti injertadas sobre ocho patrones cítricos.

Tercio	Superficie adaxial		Superficie abaxial	
	Índice estomático	Número de estomas	Índice estomático	Número de estomas
Apical	0,72 b	0,72 b	341,9 a	78,8 a
Medio	1,30 b	1,30 b	318,6 a	73,4 a
Basal	4,70 a	4,70 a	278,8 b	64,3 b

Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí al 1% según la prueba de la mínima diferencia significativa.

Cuadro 3. Características climáticas del Municipio Santa Bárbara.

	Evaporación (mm)	Precipitación (mm)	Temperatura media (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Humedad relativa (%)	Insolación
Promedio anual	1916,08	993,85	26,59	21,56	31,61	71,6	237,4

CONCLUSIONES

- Las láminas foliares de las hojas de lima Tahiti resultaron ser anfiestomáticas.
- Los valores de IE y DE variaron dependiendo de la superficie de la hoja y de acuerdo al patrón o portainjerto.
- Los patrones Citrange Carrizo y Citrange Uvalde presentaron el mayor IE en la superficie adaxial de la hoja, mientras que en la abaxial se correspondieron con los patrones mandarina Cleopatra y Citrusmelo Swingle. Un efecto contrario se presentó para el caso del DE.
- El IE y ED varía dependiendo de la cara de la superficie de la hoja de lima y del tercio estudiado (apical, medio, basal).

LITERATURA CITADA

- Bethke, P. y M. Drew. 1992. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiology* 99:219-226.
- Chandler, H. 1967. Frutales de hojas perennes. Ed. UTEHA. Barcelona, España. pp 159-183
- Conover, M. 1991. Epidermal patterns of the reticulote veined Liliiflorae and Uriel paralell veined allies. *Bot. J. of Linneau Soc.* 107:295-313.
- Culter, D. 1978. *Applied Plant Anatomy*. Logman.London.
- Esau, K. 1976. *Anatomía Vegetal*. Editorial Omega. Barcelona.
- Flores-Vindas, E. 1999. La planta. Estructura y función. Vol 1. Libro Universitario Regional. (LUR). Costa Rica.
- Leegod,R. 1993. Carbon dioxide concentrating mechanisms. In P. J. lea and R. C. Leegod (Eds.) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Jhon Wiley & Sons. Ltd. Chichester, UK.pp.42-72.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to enviromental stresses. 2da Edition,. Academic Press, New York.
- Lindorf, H., L. Parisca y P. Rodriguez. 1986. Botánica. Clasificación, estructura y reproducción. Ediciones de la biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. 584 p.
- Lindorf, H. 1999. Anatomía Ecológica de la hoja. Guía de estudio elaborada para el postgrado de Botánica Agrícola. Fac. Agronomía U.C.V. 4p.

- Medina, E. 1986. Aspectos fisiológicos de plantas de bosques nublados tropicales: El Bosque Nublado de Rancho Grande. En la Selva nublada de Rancho Grande. Parque Nacional Hery Pittier . El ambiente físico, Ecología vegetal y anatomía vegetal. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana. Caracas.
- Pares, J., M. Arizaleta y M. Sanabría. 2003. Características de los estomas, densidad e índice, estomático y su variación en función a la injertación en *Annona muricata* y *A. montana* (ANNONACEAE). Mimeografiado en vía de publicación. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Decanato de Agronomía. Dpto. De Fitotecnia.
- Roth, I., T. Merida y H. Lindorf. 1986. Morfología y anatomía foliar de plantas de la Selva Nublada de Rancho Grande. Parque Nacional “Henry Pittier”. El ambiente físico, ecología general y anatomía vegetal. Fondo Editorial *Act. Cient. Venezolana*. 205-241 p.
- Rubino, P., E. Tarantino y F. Rega. 1989. Relationship between soil water status and stomatal resistance of tomatoes. *Irrigazione e Drenaggio* 36:95- 98.
- Ruiz, M., D. Nieto e I. Larios. 1962. Tratado elemental de botánica. Séptima edición. Editorial E.C.L.A.L. México. 730 p.
- Salas, J., M. Sanabria y R. Pire. 2001. Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos. *Bioagro* 13(3): 99-104.
- Sanabria, M. E. 2003. Efecto de la irradiancia sobre la morfología, la anatomía, el crecimiento y el desarrollo de las estructuras vegetativas de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Red Yellow-Gyro (Heliconiaceae). Trabajo de Ascenso presentado para optar a la categoría de Profesor Titular. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Tarabana. Edo Lara. 72 p.
- Sánchez, M. y J. Aguirreolea. 1996. Relaciones hídricas. En: Azcon-Bieto, J. y M. Talon (eds). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Edigrafos. Madrid. España. 49 – 90 pp.
- Schoch, P., C. Zinsou y M. Sibí. 1980. Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. *Jour. Exp. Bot.* 31(124):1211-1216.
- Vareschi, V. 1992. Sobre formas biológicas de la vegetación tropical. *Bol. Soc. Venezolana de Cienc. Natur.* 26:504-518.
- Verdugo, V., A. Rojas, A. De León, B. Zambrano, S. Barrios, E. León, B. Rios y A. Benavides. 1999. Estimación del índice estomático y la frecuencia estomática en cuatro variedades de ajo (*Allium sativum* L.). Curso de Fisiología de hortalizas. Maestría en horticultura. UAAAN, Saltillo. Coahuila, México. <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Runway/8787/estomajo.htm>. (Última visita 20 de julio de 2002).