

CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTOMAS, DENSIDAD E ÍNDICE ESTOMÁTICO Y SU VARIACIÓN EN FUNCIÓN A LA INJERTACIÓN EN *Annona muricata* L. Y *A. montana* MADFAC.

Jorge Parés-Martínez¹, Miguel Arizaleta¹, María Elena Sanabria² y Liliana Brito³

RESUMEN

A fin de caracterizar los estomas y determinar el índice estomático (IE), la densidad estomática (DE) y su variación en función de la injertación, se evaluaron plantas de *A. muricata* y *A. montana* a pie franco y plantas de *A. muricata/A. muricata* y *A. muricata/A. montana*. Se colectaron porciones medias de folíolos de ramas de segundo orden, del tercio medio de la copa, se fijaron en FAA 70 % y se prepararon aclarados epidérmicos. Las muestras fueron procesadas con los métodos clásicos para la obtención de láminas semipermanentes. Las hojas se clasificaron como hipostomáticas y los estomas como paracíticos (y en algunos casos, anomocíticos). En sección transversal los mismos se observaron a nivel de las restantes células epidérmicas típicas. Los valores de IE para *A. muricata* y *A. montana* a pie franco resultaron ser 15,74 y 17,43, respectivamente, siendo superiores a los de las plantas injertadas. La DE en *A. muricata* a pie franco (132,32 estomas-mm⁻²) resultó ser superior a la de los materiales injertados, observándose los valores más bajos en *A. muricata/A. muricata* y *A. muricata/A. montana*, (110,93 y 111,45 estomas-mm⁻², respectivamente). Los resultados obtenidos permiten concluir que la injertación promovió la reducción de tanto el IE como la DE en las especies estudiadas.

Palabras clave adicionales: Anonáceas, guanábana, manirote, folíolos

ABSTRACT

Stomata characteristics, stomatal density, and stomatic index and their variation in function to grafting in *Annona muricata* L. and *A. montana* Macfad

With the objective to study stomata characteristics and determine stomatal index (SI), stomatal density (SD) and their variation by grafting, plants of *Annona muricata* and *Annona montana* rootstock and plants of *A. muricata/A. muricata* and *A. muricata/A. montana* were evaluated. Samples were taken from middle portion of leaflets coming from second order branches. They were fixed in FAA 70 % and prepared for microscopical observation. The samples were processed by the classic methods for obtention of semi-permanent laminae. The leaves of both species were classified as hypostomatic, and stomata as paracitics (and sometimes, anomocitics). In cross-sectional section the stomata were observed at the level of the remaining typical epidermic cells. The SI values of plants of *A. muricata* and *A. montana* were 15.74 and 17.43, respectively, being superior to those of the grafted plants. The SD in *A. muricata* rootstock (132.32 stomata-mm⁻²) was higher than that of the grafted materials; the lowest values were found in *A. muricata/A. muricata* and *A. muricata/A. montana* (110.93 and 111.45 stomata-mm⁻², respectively). The results allow concluding that grafting promoted the reduction of the SI and SD of the studied species.

Additional key words: Annonaceas, soursop, manirote, foliole

INTRODUCCIÓN

La familia Annonaceae está compuesta por aproximadamente 120 géneros, los cuales están distribuidos en las áreas tropicales y subtropicales del mundo. El género *Annona* es el más

importante con alrededor de 50 especies. Sus representantes son plantas leñosas de porte arbustivo o arbóreo (Kiill y da Costa, 2003).

La guanábana (*Annona muricata* L.), desde el punto de vista comercial es el principal miembro de esta familia. Sus frutos son utilizados tanto

Recibido: Marzo 10, 2004

Aceptado: Diciembre 17, 2004

¹ Dpto. de Fitotecnia, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). e-mail: jorgepares@ucla.edu.ve; miguelarizaleta@ucla.edu.ve

² Posgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela.

³ Universidad Experimental Pedagógica Libertador (UPEL). Barquisimeto. Venezuela

para el consumo fresco como para el procesamiento agroindustrial (Nobre et al., 2003). Se caracteriza además, por presentar buena compatibilidad al ser utilizada como portainjerto (Fernandes y Lederman, 1997).

Por otro lado, *Annona montana* Macfad, conocida como falsa guanábana, es utilizada principalmente como portainjerto debido a que tolera tanto condiciones de sequía como exceso de humedad (Scaloppi y Geraldo, 2003).

De todos los órganos de la planta, la hoja es el más sensible en responder a las condiciones del ambiente razón por la cual refleja alteraciones morfológicas como consecuencia de los efectos del estrés, al producir cambios en la síntesis de proteínas, pared celular, espesor de la cutícula y conductancia estomática (Trewavas, 2003). Por otro lado, se considera que los estomas 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 estos poros abren y cierran como también los factores que controlan estos procesos (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1996).

Roth et al. (1986) plantearon que en estudios relacionados con la anatomía foliar se deben considerar aspectos individuales tales como el índice estomático (IE), valor que puede variar dentro de la misma hoja según la parte del limbo que se analice (ápice, media o base), posición de la hoja en la planta y también del ambiente ecológico, el cual puede ejercer cierta influencia sobre este carácter. Del mismo modo, la densidad estomática (DE) parece estar relacionada con ciertas familias, además de existir relación entre la DE y el tamaño de las células oclusivas, de tal manera que la alta DE se presenta en plantas con células oclusivas pequeñas y viceversa.

El IE representa el cociente entre el número de estomas y la cantidad de células epidérmicas. La DE corresponde al número de estomas por unidad de superficie foliar y representa un valor diagnóstico para fragmentos de láminas foliares, siempre y cuando su uso se restrinja a órganos de la misma edad de desarrollo y de la misma taxonomía (Croxdale, 2000).

Rubino et al. (1989) y Takur (1990) señalaron que la disminución de la DE incrementa la resistencia estomática de la planta, la cual limita el exceso de transpiración. Así mismo, tanto la DE

como el IE son variables que están fuertemente influenciadas por la especie vegetal así como por condiciones ambientales como sequía y altas concentraciones salinas (Rubino et al., 1989; Bethke y Drew, 1992; Salas et al., 2001).

Los estudios relacionados con la conductancia estomática (y por ende la transpiración) revisten gran importancia ya que la productividad está íntimamente relacionada con el consumo y disponibilidad del agua más que con cualquier otro factor ambiental. Por lo tanto, la capacidad de algunas plantas de mantenerse túrgidas bajo condiciones de escasez de agua en el suelo es una característica beneficiosa para evitar la disminución en la producción, puesto que bajo tales circunstancias el descenso del rendimiento puede estar relacionado con la reducción de la conductancia estomática (Agraria et al., 1995; Nogueira et al., 2001; Da Matta, 2004).

Otro factor que puede ejercer influencia sobre la resistencia estomática y en consecuencia en la eficiencia del uso del agua en los cultivos, es la práctica de injertación (Brandão et al., 2003). En este sentido, se ha determinado que plantas injertadas mantienen, durante períodos cortos de sequía, sus tenores relativos de agua superiores al de aquellas propagadas sexualmente, tales como *Rosa* sp. (Agraria et al., 1995), *Malpighia emarginata* (Nogueira et al., 2001), *Solanum melongena* (Brandão et al., 2003) y *Coffea arabica* (Fahl et al., 2001).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar los estomas de las hojas de *A. muricata* y *A. montana* como también determinar el índice y densidad estomática en plantas de estas especies a pie franco e injertadas y su variación en función a la injertación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal estudiado fue *A. muricata* y *A. montana* ambas a pie franco, y *A. muricata* injertada sobre *A. muricata* y *A. montana*, ubicadas en un huerto frutal bajo riego, en Tarabana, municipio Palavecino, estado Lara: 10° 01' N, 510 msnm., con régimen pluviométrico aproximadamente de 870 mm·año⁻¹, temperatura promedio anual de 25,2 °C y con evaporación dos veces superior a la precipitación.

Los portainjertos alcanzaron un diámetro de

tallo entre 10 a 15 mm a los 5 meses de edad, momento en el que fueron injertados. Se utilizó la técnica de enchapado lateral. Las plantas fueron establecidas en el huerto definitivo con una distancia de 5 x 5 m en tresbolillo. Al alcanzar aproximadamente un metro de altura, fueron sometidas a una primera poda de formación que consistió en el corte del eje principal a una altura de 60 cm del suelo y la eliminación de las ramas, dejando cuatro de éstas ubicadas entre los 30 y 60 cm desde el suelo, según lo señalado por Sacramento y Vieira (1997). Cuatro meses después se realizó el despuntado de las ramas de primer orden.

Cuando las plantas alcanzaron una altura promedio de 1,80 m, lo cual ocurrió a los dos años de establecidas en el huerto, se seleccionaron al azar 5 árboles de cada uno de los siguientes tratamientos: 1) Plantas de *A. muricata* a pie franco, 2) *A. montana* a pie franco, 3) *A. muricata* injertada sobre *A. muricata*, y 4) *A. muricata* injertada sobre *A. montana*. Se colectaron 5 hojas del tercio medio de la copa en cada árbol, ubicadas basípetamente en el octavo nudo de las ramas con crecimiento secundario. Se consideró al eje principal como el punto de partida de orden cero. El tercio medio de la lámina de cada hoja se fijó en solución FAA al 70 %. Segmentos de hoja de aproximadamente 1 cm² fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio al 40 % y llevados a calentamiento por 35 minutos o hasta que se separaron las epidermis. Así mismo, se seccionaron transversalmente segmentos del material vegetal para determinar la ubicación de los estomas con respecto a las restantes células epidérmicas. Las muestras procesadas se tiñeron con una solución de verde malaquita y se hicieron los montajes semipermanentes con agua-glicerina (1:1).

La caracterización de los estomas y la determinación del IE y la DE se realizó con un microscopio óptico Olympus BX40 en un campo de 400X. El IE se calculó a través de la siguiente fórmula sugerida por Wilkinson (1979):

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

donde, NE es el número de estomas por campo de

observación y CE es el número de células epidérmicas típicas en el campo de observación

La DE se obtuvo contando el número de estomas en un área de 4,347 mm² equivalente al diámetro del campo observado. El diseño experimental consistió en un ensayo completamente aleatorizado con cuatro tratamientos, cinco repeticiones y cinco hojas por unidad experimental. Las variables cuantitativas se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza y comparación de medias según la prueba de Tukey. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Statistix (versión 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas estudiadas de ambas especies resultaron ser hipostomáticas (Figuras 1 y 2), lo que coincide con lo reportado por Brown et al. (2000) en hojas de *Annona glabra* Aubl. En vista frontal, las células de la epidermis abaxial se observaron poligonales y con las paredes delgadas y sinuosas, los estomas paracíticos (Passos y Portiguara, 2004); en algunos casos la disposición de las células epidérmicas alrededor de las células oclusivas permitió clasificar los estomas como anomocíticos. Flores-Vindas (1999) menciona que una misma especie puede mostrar diferentes tipos estomáticos. La distribución de los mismos no tuvo orden alguno o estaban esparcidos, con referencia a las nervaduras principales y secundarias y las zonas intercostales de la lámina. No se observaron estomas en la epidermis que recubre las nervaduras.

En sección transversal los estomas se observaron al mismo nivel de las restantes células epidérmicas típicas, para todos los tratamientos. Las cámaras subestomáticas se caracterizaron por ser amplias y por interrumpir el parénquima esponjoso del mesófilo (Figuras 3 y 4).

Se detectaron diferencias en el índice estomático (IE) entre los distintos tratamientos. Así, el material vegetal analizado quedó clasificado dentro de tres grupos estadísticos (Cuadro 1). El IE se encontró en un rango de 13,77 a 17,43. En *A. montana* superó al de *A. muricata*/*A. montana*, pero en *A. muricata* el IE no mostró diferencias entre plantas a pie franco e injertadas.

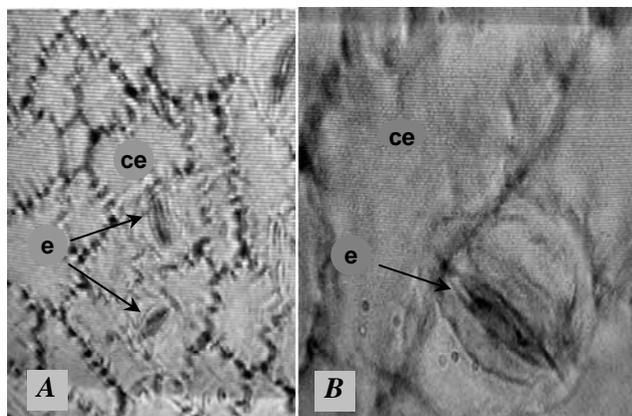


Figura 1. Vista frontal de la epidermis abaxial de la lámina foliar de *Annona muricata* a pie franco. A. Distribución de los estomas (e). B. Detalle de un estoma anomocítico. Células epidérmicas típicas (ce)

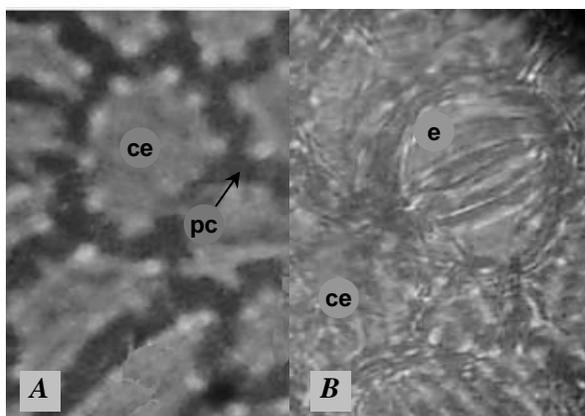


Figura 2. Vista superficial de la epidermis adaxial (A) y abaxial (B) de la lámina foliar de *Annona montana* a pie franco. Células epidérmicas (ce), pared celular (pc), estoma (e)

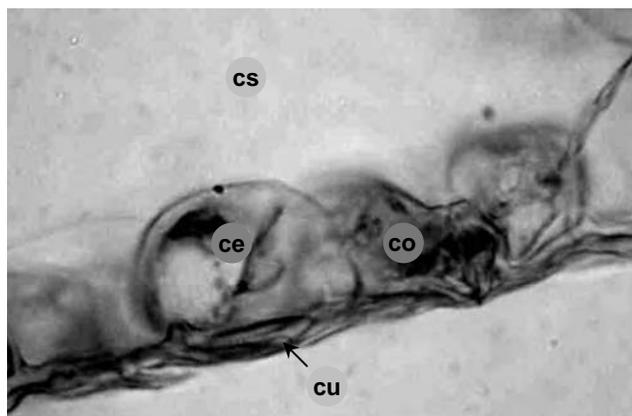


Figura 3. Sección transversal de un estoma de la superficie abaxial de la lámina foliar de *Annona muricata/A. montana*. Cámara subestomática (cs), célula oclusiva (co); células epidérmicas típicas (ce) y cutícula (cu)

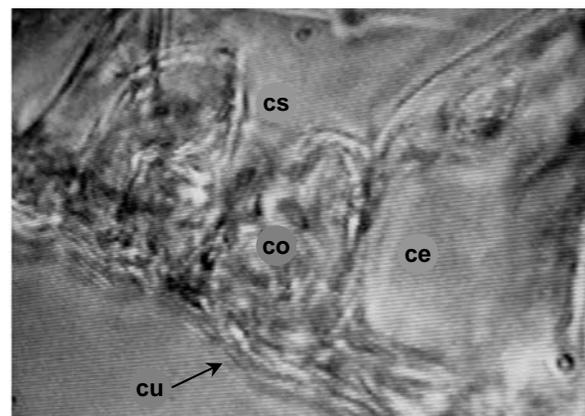


Figura 4. Sección transversal de un estoma de superficie abaxial de la lámina foliar de *Annona muricata/A. muricata*. Cámara subestomática (cs), célula oclusiva (co), células epidérmicas típicas (ce) y cutícula (cu)

Cuadro 1. Índice estomático (IE) en la superficie abaxial de la lámina foliar en anonas

Material vegetal	IE
<i>A. muricata</i>	15,74 ab
<i>A. montana</i>	17,43 a
<i>A. muricata/A. muricata</i>	15,65 ab
<i>A. muricata/A. montana</i>	13,77 b
C.V. (%)	10,84

Medias seguidas con la misma letra son iguales entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

En tal sentido, Wilkinson (1979) menciona que el IE es una característica de diagnóstico muy

utilizada en sistemática de plantas, porque generalmente se mantiene sin alteraciones. No obstante, Kürschner et al. (1998) y Salas et al. (2001) mencionan que el IE es una variable que ha sido afectada por condiciones estresantes, tanto ambientales como nutricionales.

La práctica de la injertación disminuyó la DE de los materiales evaluados (Cuadro 2).

Los valores de DE estuvieron en un rango de 110,93 a 132,32 estomas·mm⁻² (Cuadro 2). Esto concuerda con el rango establecido para las angiospermas por Esau (1972) y dentro de los valores establecidos para el envés de las hojas de

las plantas C3 (Leegod, 1993). Las plantas injertadas presentaron los valores más bajos de DE con valores estadísticamente inferiores a los de *A. muricata* a pie franco.

Cuadro 2. Densidad estomática (DE) en la superficie abaxial de la lámina foliar en anonas

Material vegetal	DE (estomas-mm ⁻²)
<i>A. muricata</i>	132,32 a
<i>A. montana</i>	124,32 ab
<i>A. muricata/A montana</i>	111,45 b
<i>A. muricata/A. muricata</i>	110,93 b
C.V. (%)	10,76

Medias seguidas con la misma letra son iguales entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

En tal sentido, la práctica de la injertación al inducir la reducción de la cantidad de estomas sobre la superficie foliar de *A. muricata*, y por ende, de su conductancia estomática y tasa de transpiración podría ser un mecanismo que ayude a aumentar la eficiencia de uso del agua por parte de esta especie. Es conocido que la disminución de la DE incrementa la resistencia estomática y evita el exceso de transpiración (Rubino et al., 1989; Takur, 1990).

CONCLUSIONES

Los estomas de *A. muricata* y *A. montana* se clasificaron como paracíticos y en algunos casos como anomocíticos. No se observaron estomas en la epidermis que recubre las nervaduras. En sección transversal se observaron al mismo nivel de las restantes células epidérmicas típicas. Las láminas foliares resultaron ser hipoestomáticas.

La técnica de injertación causó modificaciones en la distribución y la cantidad de los estomas sobre la superficie foliar de las plantas, presentando bajo injertación el menor índice y cantidad de estomas por unidad de área.

LITERATURA CITADA

1. Agraria, H., B. Hever y N. Zieslin. 1995. Effects of grafting on transpiration, CO₂ fixation and growth of rose plants (*Rosa x hybrida* cvs. Ilseta and Mercedes). *J. of Hort. Sci.* 70 (4): 651-656.
2. Bethke, P. y M. Drew. 1992. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annum* L. during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiology* 99: 219-226.
3. Brandão, J., R. Goto, V. Guimarães, G. Habermann, J. Rodrigues y O. Callegari. 2003. Influência da enxertia nas trocas gasosas de dois híbridos de berinjela cultivados em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira* 21(3): 474-477.
4. Brown, J., M. Sanabria y H. Laurentin. 2000. Anatomía foliar comparada entre *Annona muricata* y *Annona glabra* (Anonáceas). VII Congreso Nacional de Frutales. San Cristóbal. Venezuela. Resúmenes. pp. 131-132.
5. Croxdale, J. 2000. Stomatal patterning in angiosperms. *American Journal of Botany* 87 (8): 1069-1080.
6. Da Matta, F. 2004. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal Plant Physiology* 16(1): 1-6.
7. Esau, K. 1972. Anatomía vegetal. Ediciones Omega. Barcelona. España.
8. Fahl, J.I., M.L.C. Carelli, H.C. Menezes, P.B. Gallo y P.C.O. Trivelin. 2001. Gas exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted on to *C. canephora* and *C. congensis*. *Experimental Agricultural* 37: 241-252.
9. Fernandes, J. e I. Lederman. 1997. Propagação vegetativa de anonáceas por enxertia. *In: Rebouças, A., I. Boas, O. Magalhães y T. Hojo (eds.) Anonaceas Produção e mercado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista. Bahia. Brasil. pp. 68-74.*
10. Flores-Vindas, E. 1999. La planta. Estructura y función. Vol. 1. Libro Universitario Regional (LUR). San José, Costa Rica.

11. Kiill, L. y Da Costa. 2003. Biología floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. *Ciencia Rural* 33(5): 851-856.
12. Kürschner, W., I. Stulen, F. Wagner y P. Kuiper. 1998. Comparison of palaeobotanical observations with experimental data on the leaf anatomy of durmast oak [*Quercus petraea* (Fagaceae)] in response to environmental changes. *Annals of Botany* 81: 657-664.
13. Leegod, R. 1993. Carbon dioxide concentrating mechanisms. In: P.J. Lea and R.C. Leegod (Eds.) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Wiley. Chichester, UK pp. 42-72.
14. Nobre, R., P. Fernandes, H. Raj, F. de Seixas, I. Becerra y M. Tavares. 2003. Germinação e formação de mudas enxertadas de gravioleira sob estresse salino. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38 (12): 1365-1371.
15. Nogueira, R., J. Moraes, H. Burity y E. Bezerra. 2001. Modifications in vapor diffusion resistance of leaves and water relations in barbados cherry plants under water stress. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13 (1): 75-87.
16. Passos, N. y R. Portiguara. 2004. Anatomía foliar de *Annona glabra* Aubl. <http://www.adaltech.com.br/eventos/museugolde/resumoshtm/.htm>. (Consulta de Diciembre 2004).
17. Roth, I., T. Mérida y H. Lindorf. 1986. Morfología y anatomía foliar de plantas de la selva nublada de Rancho Grande. In: O. Juber (ed.). *La Selva Nublada de Rancho Grande*. Parque Nacional "Henry Pittier". El ambiente físico, ecología general y anatomía vegetal. Fondo editorial: Acta Científica Venezolana. pp. 205-241.
18. Rubino, P., E. Tarantino y F. Rega. 1989. Relationship between soil water status and stomatal resistance of tomatoes. *Irrigacione e Drenaggio* 36: 95-98
19. Sacramento, C. y J. Vieira. 1997. Formação do pomar e tratos culturais da grabiola. In: Rebouças, A., I. Boas, O. Magalhães y T. Hojo (eds) *Anonaceas Produção e mercado*. UESB. Vitoria da Conquista. Bahia. Brasil. pp. 88-93.
20. 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.
21. Sánchez-Díaz, M. y J. Aguirreolea. 1996. Relaciones hídricas. In: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (eds.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Edigrafos. Madrid. pp. 49-90.
22. Scaloppi, E. y A. Geraldo. 2003. Clonagem de quatro espécies de Annonaceae potenciais como porta-enxertos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (2): 286-289.
23. Takur, P. 1990. Different physiological response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to drought. *Acta Physiologiae Plantarum* 12: 175-182.
24. Trewavas, A. 2003. Aspects of Plant Intelligence. *Annals of Botany* 92: 1-20
25. Wilkinson, H. 1979. The plant superface (mainly leaf). In: C.R. Metcalfe y Chalk (eds.) *Anatomy of Dicotyledons*. Oxford, Claredon Press. London. pp. 97-165.