



UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**RUTA DE ABSORCIÓN Y RESPUESTA
FISIOLÓGICA A LA FERTILIZACIÓN FOLIAR
EN LIMÓN 'PERSA' (*Citrus latifolia* Tan.).**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA.**



PRESENTA:

JOSE BERNARDO HERNANDEZ PALOMO

Bajo la supervisión de:

DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS

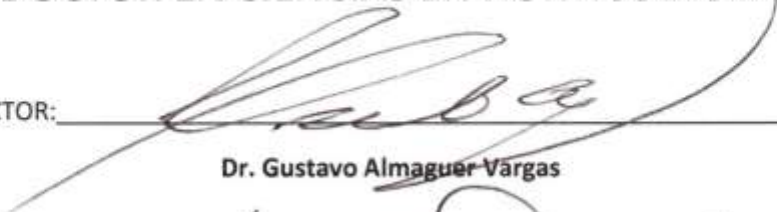
CHAPINGO, ESTADO DE MEXICO, JUNIO DE 2019.

RUTA DE ABSORCIÓN Y RESPUESTA FISIOLÓGICA A LA FERTILIZACIÓN FOLIAR EN LIMÓN 'PERSA' (*Citrus latifolia* Tan.)

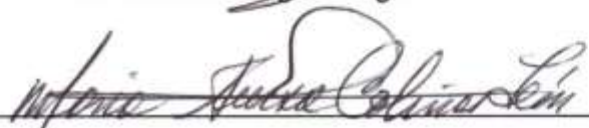
Tesis realizada por el M. C. **José Bernardo Hernández Palomo**, bajo la dirección
del Comité Asesor indicado: aprobado por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

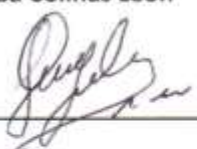
DIRECTOR:


Dr. Gustavo Almaguer Vargas

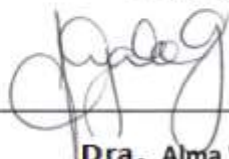
ASESOR:


Dra. María Teresa Colinas León

ASESOR:


Dr. Carlos Ramírez Ayala

Lector Externo:


Dra. Alma Velia Ayala Garay

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme con el sustento para realizar mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme cobijado como su hijo y brindarme la dicha de ser uno de sus egresados.

Al Departamento de Fitotecnia por apoyarme y trabajadores por ayudarme con mis tareas de investigación.

Quedo eternamente agradecido con el Dr. Gustavo Almaguer Vargas, por brindarme su apoyo y conocimiento, pero sobre todo su amistad y comprensión sin él no hubiera sido posible esto.

A la Dra. Teresa Colinas León por darme las facilidades para realizar mis estudios experimentales, por ser tan amable y atenta. Siempre estará la impresión de la buena investigadora y persona que es.

Al Dr. Carlos Ramírez Ayala por su apoyo a mi formación como estudiante desde la Maestría, por sus valiosas aportaciones y consejos.

Al Dr. Pablo Preciado Rangel por dirigirme desde la Ingeniería y encaminarme a lo que ahora soy ahora, gracias por su amistad.

A todas las personas que directa e indirecta contribuyeron a mi formación.

DEDICATORIA

Sin duda alguna esta etapa tan especial de mi vida está dedicada para la persona más importante, para mi hijo, Mateo Hernández Gómez que a tu corta edad (5 años) supiste ser más fuerte que yo en muchas situaciones, con una sonrisa o un beso aliviabas cualquier preocupación.

Algún día podrás leer esto y darte cuenta que no hubo un padre más orgulloso de tenerte y que te amo más que a nadie en la vida.

DATOS BIOGRÁFICOS

José Bernardo Hernández Palomo, nació un 22 de Febrero de 1988, en San Pedro de las Colonias Coahuila, a su corta edad fue una persona con mucho ímpetu y debido a la situación laboral de sus padres tubo la dicha de haber realizado sus estudios de primaria en diferentes lugares, comenzando por las escuelas de sus ejidos Natales el Retiro “ Libertad” y el Estribo “Revolución”, posteriormente continuo sus estudios en la primaria Prof. Rafael Domínguez ubicada en el municipio de Castaños Coahuila y al cambiar de residencia al Estado de México se incorporó a las escuelas Revolución, primaria san José el cuartel y por último la escuela normal de Tenancingo. Sus estudios de secundaria los realizo en la secundaria Técnica #68 , ubicada en Tenancingo estado de México y los estudios media superior en el Centro de estudios científicos y tecnológicos del estado de México , ubicado en Santa Ana Ixtlahuatzingo México. Aunque él no quería ser agrónomo, como única opción decidió regresar su lugar de origen y continuar sus estudios de Ingeniería en la UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO como INGENIERO AGRONOMO EN HORTICULTURA , de la cual egresó en el 2012 para continuar con sus estudios de Maestría en el COLEGIO DE POSGRADUADOS Campus Montecillo en el área de RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD y por último culminar con su Doctorado en la UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO con el grado de DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA por lo que tuvo la dicha de haber estudiado en las mejores escuelas de agronomía del país, encaminando su conocimiento a la elaboración de fertilizantes foliares y nutrición vegetal lo cual le dio la dicha de fundar AGRONORTECH, empresa dedicada a la elaboración de insumos para la agricultura, la cual dirige en Texcoco, estado de México.

RESUMEN GENERAL

RUTA DE ABSORCIÓN Y RESPUESTA FISIOLÓGICA A LA FERTILIZACIÓN FOLIAR EN LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia* Tan.)

El cultivo de lima o limón “Persa” es de gran importancia económica en México, los principales productores son Michoacán y Veracruz, los cuales aportan el 55% de la producción nacional. No obstante, la producción se encuentra limitada por diversos factores que afectan el rendimiento, como el estrés hídrico, el cual incide directamente en las funciones de las plantas, limitando su productividad. Es por ello que la agricultura exige nuevas técnicas que ayuden a reducir los efectos del estrés hídrico en las plantas y una de ellas es la fertilización foliar, permite corregir deficiencias, estimular el crecimiento o disminuir los efectos negativos que genera el estrés en las plantas. Distintos compuestos como: prolina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico regulan los efectos generados por falta de agua en las plantas, manteniendo la turgencia en las hojas mediante la osmorregulación o secuestrando radicales libres para evitar la oxidación. Con base en lo anterior se planteó evaluar el efecto fisiológico y metabólico de plantas con déficit hídrico, las cuales se trataron con aplicaciones foliares de compuestos osmosprotectores para dar claridad a su ruta de absorción y efecto en la actividad enzimática. La investigación se llevó a cabo en dos etapas: la primera para determinar la ruta de absorción de tres aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico y arginina), para lo cual se hicieron soluciones foliares al 0.5% con marcadores fluorescentes y colorantes (naranja G, Safranina, Calcofluor y rodamina) los cuales se aplicaron en las hojas jóvenes de lima “Persa”. Posteriormente se tomaron muestras cada 60 minutos y mediante cortes transversales en el laboratorio (siete micrómetros) se determinó la ruta que siguió cada aminoácido y su velocidad, los resultados se analizaron con una prueba de medias (tukey =0.05). El segundo experimento consistió en evaluar el efecto del ácido glutámico vía foliar en la actividad enzimática de plantas, para lo cual se prepararon soluciones del aminoácido en tres concentraciones (600, 1200 y 2000

mg L⁻¹) y se asperjaron en hojas jóvenes de lima “persa” en condiciones de estrés hídrico (-3 MPA), posteriormente se tomaron cinco muestras, las cuales fueron llevadas a laboratorio, donde se determinó la actividad enzimática de la catalasa y ascorbato peroxidasa y la concentración de prolina. La velocidad de absorción mayor se presentó con el ácido glutámico a los 60 y 120 minutos, la actividad enzimática de la catalasa y ascorbato peroxidasa fue menor en plantas en condiciones de estrés hídrico que las plantas bien irrigadas, la concentración de prolina fue mayor en plantas en buenas condiciones hídricas.

Palabras clave: ácido glutámico, catalasa, prolina, ascorbato peroxidasa.

ABSTRACT

ROUTE OF ABSORPTION AND PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO FOLIAR FERTILIZATION IN PERSA LEMON (*Citrus latifolia* Tan.)

The cultivation of lemon "Persa" is of great economic importance in Mexico, the main producers are Michoacán and Veracruz, which contribute 55% of the national production. However, production is limited by various factors that affect performance, such as water stress, which directly affects the functions of plants, limiting their productivity. That is why agriculture requires new techniques that help reduce the effects of water stress in plants and one of them is foliar fertilization, correct deficiencies, stimulate growth or reduce the negative effects of stress on plants. Different compounds such as: proline, arginine, aspartic acid and glutamic acid regulate the effects generated by lack of water in plants, maintaining the turgor in the leaves by osmoregulation or sequestering free radicals to prevent oxidation. Based on the above statement, it was proposed to evaluate the physiological and metabolic effect of plants with water deficit, which were treated with foliar applications of osmosprotective compounds to give clarity to their absorption route and effect on enzymatic activity. The investigation was carried out in two stages: the first to determine the absorption route of three amino acids (aspartic acid, glutamic acid and arginine), for which 0.5% foliar solutions were made with fluorescent markers and dyes (orange G, Safranin, Calcofluor and rhodamine) which were applied in the young leaves of "Persian" lime. Subsequently, samples were taken every 60 minutes and by transversal cuts in the laboratory (seven microns) the path followed by each amino acid and its speed was determined, the results were analyzed with a means test (tukey = 0.05). The second experiment consisted of evaluating the effect of glutamic acid via foliar on the enzymatic activity of plants, for which solutions of the amino acid were prepared in three concentrations (600, 1200 and 2000 mg L⁻¹) and were sprinkled in young leaves of lime "Persian" under conditions of water stress (-3 MPA), five samples were subsequently taken, which were taken to the laboratory, where the enzymatic activity of catalase and ascorbate peroxidase and proline concentration were determined. The highest absorption rate occurred with glutamic acid at 60 and 120 minutes, the enzymatic activity of catalase and ascorbate peroxidase was lower in plants under water stress conditions than well-irrigated plants, the concentration of proline was higher in plants in good water conditions.

Key words: glutamic acid, catalase, proline, ascorbate peroxidase.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivo específico	3
1.3 Hipótesis	3
CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes.....	4
2.2 México en el mercado mundial de los cítricos	4
2.3 Cutícula	5
2.4 Estomas.....	6
2.5 Tejidos conductores o vasculares.....	6
2.6 Colorantes.....	7
2.6.1Safranina.....	7
2.6.2 Naranja G.....	7
2.6.3 Rodamina.....	7
2.6.4 Calcofluor	7
2.7 Respuesta de las plantas al estrés.....	8
2.8 Importancia de la fertilización foliar en condiciones de estrés	9
2.9 Fertilización foliar con aminoácidos.....	10
2.9.1 Ácido glutámico	11
2.9.2 Ácido ascórbico	11
2.10 Funciones de las enzimas peroxidasa, catalasa y prolina	12
2.11 Literatura citada	14
CAPITULO III. VELOCIDAD Y RUTA DE ABSORCIÓN FOLIAR DE TRES AMINOÁCIDOS EN HOJAS DE LIMA ‘PERSA’ EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO	19
3.1RESUMEN.....	19
3.2 INTRODUCCIÓN	21

3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.3.1	Ubicación	23
3.3.2	Material vegetal y labores culturales.	23
3.3.3	Identificación de las rutas de absorción de los aminoácidos.	23
3.3.4	Tratamientos.	24
3.3.5	Velocidad de absorción.	24
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.5.1	Velocidad de absorción del ácido glutámico.	24
3.5.2	Velocidad de absorción de la arginina.	27
3.5.3	Ruta de absorción de la arginina en hojas de lima ‘Persa’ a los 60 minutos después de la aplicación.	28
3.5.4	Velocidad de absorción del ácido aspártico	29
3.5.5	Ruta de absorción del ácido aspártico en hojas de lima ‘Persa’ a los 120 minutos después de la aplicación	29
3.6	CONCLUSIONES	30
3.7	LITERATURA CITADA	31
CAPITULO IV		
	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN	
	HOJAS DE LIMA “PERSA” BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO, CON APLICACIONES	
	FOLIARES DE ÁCIDO GLUTÁMICO.	34
	RESUMEN.	34
4.2	INTRODUCCIÓN	36
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.3.1	Material vegetal.	38
4.3.2	Tratamientos y diseño experimental	38
4.3.3	Variables evaluadas	38
4.3.4	Actividad de la enzima catalasa (CAT)	39
1.1.1	Determinación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX)	39
4.3.5	Concentración del aminoácido prolina	40
4.4	RESULTADOS Y DISCUSION	40
4.4.1	Actividad de la enzima catalasa.	40
4.4.2	Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa	42

4.4.3	Concentración de prolina	45
4.5	CONCLUSIONES	48
4.6	LITERATURA CITADA	49
CAPITULO V	CONCLUSIONES GENERALES	54

LISTA DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Valores promedio de ácido glutámico, ácido aspártico y arginina en combinación con distintos colorantes (Calcofluor, Rodamina, Safranina, Naranja G).	33

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Cortes transversales de hojas de Lima “Persa” (7 micrometros), 60 minutos después de la aplicación de ácido glutámico, con diferentes colorantes (a) safranina, (b) rodamina, (c) Naranja G y (d) calcofluor, las flechas indican la presencia del aminoácido en las hojas.....	34
Figura 2. Secuencia microscópica de la absorcion foliar de la arginina y ácido aspártico con un aumento de 40x. Corte transversal de la hoja 60 minutos despues de la aplicación de arginina, (2A); Corte transversal de la hoja 120 minutos despues de la aplicación de arginina, (2B); Corte transversal de la hoja 180 minutos despues de la aplicación de arginina, (2C). Corte transversal de la hoja 60 minutos despues de la aplicación de ácido aspártico, (2a); Corte transversal de la hoja 120 minutos despues de la aplicación de ácido aspártico, (2b); Corte transversal de la hoja 180 minutos despues de la aplicación de ácido aspártico, (2c).....	35
Figura 3. Actividad enzimática de la catalasa en hojas de lima ‘Persa’ en condiciones de estrés hídrico, bajo aplicaciones de ácido glutámico. Las barras muestran el promedio de 20 muestreos por tratamientos y error estándar, las letras indican la significancia (Alpha=0.05).....	51
Figura 4. Actividad enzimática de la Ascorbato peroxidasa en hojas de lima “Persa” en condiciones de estrés hídrico y tres aplicaciones foliares de ácido glutámico. Las barras muestran el promedio de los muestreos por tratamientos, error estándar y las letras indican la significancia (Alpha=0.05).....	52
Figura 5. Concentración de prolina en hojas de lima “Persa” en condiciones de estrés hídrico con aplicaciones de ácido glutámico. Las barras muestran el promedio de los muestreos por tratamiento y error estándar, las letras indican la significancia (Alpha=0.05).....	57

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, la citricultura es considerada como una de las principales actividades del sector primario, siendo el limón, por su volumen de producción, uno de los cítricos más importantes. Del 2012 al 2017 la producción de lima obtuvo una tendencia de crecimiento del 4.1% alcanzando una producción de 2454 mil toneladas. Este cultivo es de gran importancia económica en el país, ya que genera el 2.78% del PIB agrícola nacional siendo el segundo producto exportado a nivel mundial con un 12.29 del valor de las exportaciones, que impactan principalmente en Estados Unidos de América (SIAP, 2017).

La producción de lima para el 2018 fue de 2, 697,902 toneladas y los principales productores fueron Veracruz y Michoacán, los cuales en conjunto aportaron 55% de la producción nacional (SAGARPA, 2018).

Sin embargo, el rendimiento es afectado por diversos factores ambientales y nutrimentales, uno de ellos es la poca disponibilidad de agua en las zonas productoras, que repercute en el crecimiento y desarrollo de la planta debido a que el agua juega un papel vital, pues interviene en prácticamente todos los procesos fisiológicos (Ortuño *et al.*, 2004, Vélez *et al.*, 2012); un déficit hídrico afecta negativamente las funciones como: fotosíntesis, respiración, reacciones metabólicas, crecimiento, reproducción, desarrollo de semillas, producción, transporte de asimilados y absorción de nutrientes minerales (Quiñones *et al.*, 2007). Es por ello que es necesario implementar técnicas que ayuden a disminuir el efecto del estrés hídrico en los cultivos, como la fertilización foliar con el ácido glutámico, que es un compuesto que puede ser absorbido tanto en forma foliar como radical y tiene como función la asimilación de nitrógeno en las plantas y como consecuencia eleva el rendimiento, disminuye la cantidad de nitratos y aumenta la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos (Cao *et al.*, 2010). La fertilización foliar no es una técnica nueva (Soria, 2008): Katkat *et al.* 2009, estudiaron el efecto de aplicaciones foliares de ácidos húmicos en plantas

de trigo en suelos calcáreos y encontraron una mayor absorción de micronutrientes (Mn, Fe y Mg). Hernández del Valle et al. (2012) realizaron pruebas con extracto líquido de vermicomposta aplicado vía foliar para elevar el rendimiento. Trejo-Téllez *et al.* (2003), estudiaron aplicaciones foliares como herramienta para la corrección de deficiencias ocasionadas por tres diferentes tipos de suelo y encontraron viable la aplicación foliar no solo para corrección de deficiencias, además aumentaron el rendimiento hasta un 112%. Rivera *et al.* (2009) evaluaron el efecto de las aplicaciones foliares para la corrección de la deficiencia de hierro y encontraron que la mezcla de sulfato ferroso y citrolina corrigieron un 50% la deficiencia. Por otro lado, Serna *et al.* (2011) cuantificaron el efecto del ácido glutámico vía foliar en jitomate para elevar el rendimiento, y lograr aumentar la concentración de clorofila b.

No obstante, los procesos que regulan la absorción en las hojas y el efecto sobre la fisiología en condiciones de estrés hídrico, no ha sido clarificado por lo que es importante la comprensión de dichos fenómenos para efficientizar la técnica y reducir los niveles de estrés en las plantas.

1.1 Objetivo general

Determinar la ruta de absorción y la respuesta fisiológica a la fertilización foliar con ácido glutámico en hojas de lima 'Persa', bajo condiciones de estrés hídrico.

1.2 Objetivo específico

Determinar la ruta de absorción de ácido glutámico, ácido aspártico y arginina, en cortes transversales de hoja de lima 'Persa' bajo condiciones de estrés hídrico, mediante la aplicación foliar de una solución con marcadores fluorescentes y colorantes (Rodamina, safranina, naranja G y calcoflúor).

Evaluar la actividad enzimática de catalasa y ascorbato peroxidasa, y la concentración de prolina en respuesta a diferentes concentraciones de ácido glutámico aplicadas vía foliar de ácido glutámico, en hojas de lima 'Persa' bajo condiciones de estrés hídrico.

1.3 Hipótesis

La ruta y velocidad de absorción son afectadas de forma diferente por cada uno de los aminoácidos evaluados (Ácido Aspártico, ácido glutámico y arginina).

La actividad enzimática y concentración de prolina son afectadas por las aplicaciones foliares de ácido glutámico en plantas con déficit hídrico.

CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

El cultivo de lima 'Persa' en México se inició aproximadamente hace tres décadas y para el año 2004 se produjeron un total de 1.9 millones de toneladas de limones (SIAP, 2018). Para el año 2008, México ya figuraba como el segundo productor mundial de cítricos (14.94%) y el primero como exportador (20.5%), siendo el lima el principal producto (Sánchez-Torres et al., 2011). Mientras que para el año 2012 México descendió una posición, ocupando el tercer lugar a nivel mundial (13.7%), sólo por debajo de China e India, quienes ocupan el primero y segundo lugar a nivel mundial, respectivamente (FAOSTAT, 2018).

En el año 2015 México ocupaba el primer lugar en exportación de lima en el mundo, enviando alrededor de 450 mil toneladas a 20 países diferentes. Para 2016 México produjo alrededor de 2.4 millones de toneladas de limones y exportó 667 mil toneladas, anualmente exporta alrededor del 45% de la producción nacional (FAOSTAT, 2018; SIAP, 2018).

2.2 México en el mercado mundial de los cítricos

Según la FAOSTAT (2018), en el año 2016 el principal país productor de limas y limones fue la India con una producción de 9.97 millones de toneladas, seguido de México, China, Argentina y Brasil con una producción de 2.42, 2.28, 1.67 y 1.26 millones de toneladas, respectivamente.

En 2016 México fue el principal país exportador de cítricos (667 mil ton), seguido de España (547 mil ton) y Turquía (448 mil ton). Pero fue España quien ocupó el primer lugar en cuanto al valor de exportación de estos productos. Mientras que los principales países importadores de cítricos fueron Estados Unidos, Los Países Bajos y Rusia, con un total de 640, 238 y 292 mil toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2018).

Para el año 2017 los principales estados productores de lima en México fueron Michoacán, Veracruz y Oaxaca, con una producción total de 711, 758 y 274 mil toneladas, respectivamente, con un valor de la producción de 3.5, 3.2 y 1.6 miles de millones de pesos, respectivamente. Solamente estos tres estados aportan 66.1% del total nacional. Y una producción total anual de 2.51 millones de toneladas, lo cual representa un incremento anual de 4.1% en el periodo 2012-2017 (SIAP, 2018).

Para 2017 las exportaciones crecieron a 729 mil toneladas, siendo los Estados Unidos el principal destino del producto. Mientras que las importaciones fueron tan solo de 3015 toneladas. Hablando particularmente del lima, el estado de Veracruz fue el principal productor con el 53.1% del volumen total (SIAP, 2018).

2.3 Cutícula

La cutícula es una membrana continua extracelular de lípidos solubles, se encuentra por fuera de la pared tangencial y en contacto con el medio externo. La formación tiene lugar durante los estadios tempranos del desarrollo del órgano y está formada por una capa de grosor variable que contiene cutina y ceras que constituyen una proporción que varía desde 40 a 80 % del peso total (Tadeo, 2003). Tiene como principal función la regulación en la transpiración y del balance de agua (Veraverbeke *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003), regulación del intercambio de gases (Kolattukudy, 1996), protección contra patógenos y daños mecánicos (Commenil *et al.*, 1997) entre otros.

2.4 Estomas

Dentro de las estructuras que forman el tejido epidérmico encontramos a los estomas, los cuales son de vital importancia debido a que regulan la pérdida excesiva de agua y el intercambio gaseoso (Fan *et al.*, 2004). El número de estomas o índice estomático en la superficie adaxial comparada con la abaxial es diferente y característica de las especies. Las plantas que presentan estomas en el envés son llamadas hipoestomáticas y las y aquellas con estomas en el haz y envés son anfiestomáticas (Azcon-Bieto y Talón, 2008). Las estomas están formados por un ostiolo rodeado por dos células oclusivas de forma arriñonada y pueden o no estar acompañadas por otras células epidérmicas. La posición de los estomas es variable y se pueden presentar hundidos, al mismo nivel de las células epidérmicas o expuestos en el exterior de la lámina foliar (Flores-Vindas, 1999).

2.5 Tejidos conductores o vasculares

El tejido vascular consiste en xilema y floema, y puede ser primario o secundario en origen. El tejido vascular primario se deriva de procambium, producido por los meristemos apicales, y también por el meristemo primario en tallos de plantas monocotiledóneas. El tejido vascular secundario se deriva del cambium vascular en dicotiledóneas y del engrosamiento secundario del meristemo en algunas monocotiledóneas. Tanto el xilema como el floema son tejidos complejos, compuestos de muchos tipos de células diferentes (Rudall, 2007).

Fisiológicamente las plantas necesitan a los tejidos conductores para su crecimiento, ya que de estos depende la distribución de agua y sustancias orgánicas. Otra de sus funciones es la de proporcionar soporte a modo de esqueleto y sostén de la parte aérea de las. Además de que participan en la comunicación entre diferentes partes de la misma planta gracias a la ayuda a movilizar hormonas (Mejías, *et al.* 2017).

2.6 Colorantes

2.6.1 Safranina

La safranina o verde rápido es muy utilizado para teñir tejidos biológicos, debido a que es una herramienta en la detención de estructuras celulares. Su nombre se deriva de la palabra “azafrán por tener parecido a dicha planta. Es un colorante biológico cuya fórmula química es $C_{20}H_{19}N_4 Cl$; conocido también como Ci 50240, 3,7-diamino-2,8-dimetil-5- fenil-fenaziniumcloro dimetil. Se presenta en cristales oxidados oscuros o polvo verde oscuro, inodoro y soluble en agua. No es cancerígeno, ni flamable (Sigma Aldrich, 2010).

2.6.2 Naranja G

Es un pigmento biológico en polvo ampliamente utilizado en la citología, es un colorante citoplasmático proteico ácido color amarillo-anaranjado. Tiñe principalmente proteínas del citoplasma, y en menor medida al núcleo, sobre todo si este es picnótico. Además puede colorear eritrocitos, cristales de hemosiderina, cuerpos de asbesto y células con citoplasma queratinizado como por ejemplo células paraqueratósicas, coilocitos y células de un carcinoma escamoso poco diferenciado (SAC, 2019).

2.6.3 Rodamina

La rodamina B (RhB), es un colorante catiónico perteneciente a los xantenos, de alta solubilidad y comúnmente utilizado como colorante textil y en la industria alimenticia. En el área biológica es un potente trazador fluorescente y trazador biológico (Rinne & Deacon, 1973; Sagoo & Jockusch, 2011).

2.6.4 Calcofluor

La tinción con calcofluor es una técnica fluorescente, rápida y útil en distintos tipos de muestras incluyendo tejidos. Su observación requiere de poco entrenamiento o capacitación debido a que contrasta claramente los elementos micóticos con claridad por la unión del calcofluor a las paredes de quitina. No obstante se pueden presentar errores en la interpretación al evaluar fibras vegetales o células que presentan fluorescencia natural (Monheit *et al.*, 1984; Merz and Roberts, 2002), como el caso de los tejidos de conducción en las plantas. Este tipo de tinciones han sido utilizadas por su baja toxicidad, fluorescencia rápida y su utilidad en amplios tipos de muestras (Bonifaz, 2013).

2.7 Respuesta de las plantas al estrés

La sequía y la salinidad de los suelos son dos factores importantes que provocan estrés osmótico, creando un impacto negativo en el crecimiento y productividad de la planta. En condiciones de estrés hídrico los tejidos de las plantas acumulan solutos para asegurar su sobrevivencia, destacando la prolina y los azúcares solubles, cuya síntesis se asocia con el mantenimiento de la turgencia de los tejidos para continuar con la función celular. Se da la disminución del almidón mediante la inducción de plasmólisis, que puede reducir el volumen del citoplasma celular, promoviendo la acumulación de azúcares solubles, con la finalidad de contrarrestar el estrés osmótico (Nayer & Reza, 2008).

En condiciones de estrés las plantas de cítricos producen una serie de respuestas como: disminución en la conductividad de los estomas, para evitar la pérdida de agua por transpiración, abscisión foliar, disminuyendo el área foliar y por tanto la superficie de transpiración y adaptaciones a nivel metabólico y osmoregulación, las células acumulan una serie de solutos compatibles con el funcionamiento normal de las células (Navarro *et al.*, 2010).

Un déficit hídrico afecta negativamente las funciones fisiológicas como: fotosíntesis, respiración, reacciones metabólicas y anatómicas, crecimiento, reproducción, desarrollo de semillas, absorción de nutrientes minerales, transporte de asimilados y producción (Herrera *et al.*, 2014). El efecto dependerá de la intensidad de la sequía, de la duración de la misma y de la época en que ocurra dentro del ciclo de producción (Ballester *et al.*, 2011).

Durante la deshidratación también se producen cambios en los ángulos de inclinación de las hojas y enrollamiento foliar de los cítricos, lo cual es la principal manifestación más evidente del estrés hídrico, debido a que reduce la superficie foliar y la radiación interceptada, también tiende a disminuir la transpiración (Vélez *et al.*, 2011).

2.8 Importancia de la fertilización foliar en condiciones de estrés

La fertilización foliar ha cobrado importancia en los últimos años debido a su eficiencia en la aportación de nutrimentos, la cual se ve afectada por factores internos de la planta y fisiológicos (estructura de la hoja) y por factores externos o ambientales (tipo de suelo, pH del suelo, humedad relativa, etc.). Además esta tecnología permite aplicaciones simultáneas de bioestimulantes, lo cual ayuda a mejorar el desarrollo de las plantas (Smolén, 2012).

La nutrición foliar representa una alternativa viable, ya que las hojas poseen una gran cantidad de estomas en el envés y gran cantidad de poros en la cutícula. Las aplicaciones foliares, cuando se hacen de la forma correcta, pueden promover la floración, aumentar el rendimiento y mejorar la calidad del producto de los cítricos (Schönherr, 2006; Smolén, 2012).

Para Bondada, *et al.* (2006), la turgencia de las hojas de las plantas sufre cambios por factores ambientales externos, como por ejemplo la luz, la temperatura y la velocidad del viento, entre otros los cuales pueden afectar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que se encargan de regular el movimiento del agua en las plantas. Generalmente la turgencia es mayor en la noche y en las mañanas, siendo estos momentos en las que las plantas tienden a incrementar la absorción y metabolismo de nutrientes aplicados en el follaje, si los estomas están abiertos.

Las altas temperaturas en combinación con una alta intensidad de luz y viento promueven una disminución en la turgencia de las hojas, lo cual fomenta una disminución en la capacidad de las plantas para fotosintetizar y como consecuencia de ello la absorción de nutrientes por medio de las hojas se ve afectada (Smolén & Sady, 2012).

La humedad del aire afecta negativamente el secado de las micro gotas en las hojas de las plantas, además también influye en la velocidad de penetración de nutrientes a través de la humedad, la cual generalmente aumenta en condiciones

de mayor humedad del aire, teniendo una consecuencia directa en la turgencia de las hojas (Schöner & Luber, 2001).

Según Srivastava y Singh (2003) los factores ambientales como: la luz, la temperatura, el viento, la hora del día, el fotoperiodo, la humedad, la cantidad y la intensidad de la precipitación, la sequía, el potencial osmótico del cultivo y la deficiencia de ciertos nutrientes afectan negativamente la eficiencia de las aplicaciones de nutrientes foliares.

2.9 Fertilización foliar con aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos importantes en las plantas y en la mayoría de los seres vivos. Estos pueden influir directamente en actividades fisiológicas de las plantas, de igual manera pueden actuar junto con sustancias quelantes de otros nutrimentos que se desean aplicar, con ello promueven una mejora en la absorción y transporte (Salwa, *et al.*, 2010). Estos compuestos son los principales precursores de la formación de proteínas, se han descubierto por lo menos 20 aminoácidos que participan en la síntesis proteica (Ibrahim, *et al.*, 2007; Shafeek, *et al.*, 2016).

Según Meléndez y Molina (2002) en condiciones naturales las plantas producen sus propios aminoácidos, obteniéndolos a partir de procesos metabólicos de los nutrimentos mediante la realización de la fotosíntesis y la respiración, los cuales posteriormente forman cadenas, originando enzimas y proteínas que constituyen las plantas.

Cuando se hace uso correcto de la aplicación de los aminoácidos pueden aumentar la resistencia de las plantas a condiciones de estrés, cuando la aplicación es directamente al follaje de las plantas es más fácil su absorción y por lo tanto el gasto de energía es menor (Meléndez & Molina, 2002).

Por ello la aplicación de aminoácidos de forma foliar ha demostrado tener efectos positivos en la producción, crecimiento y desarrollo de las plantas,

además de la mejora en la calidad del producto (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011; Meléndez & Molina, 2002; Sadak *et al.*, 2014).

2.9.1 Ácido glutámico

El ácido glutámico no es considerado un nutrimento; sin embargo, su aplicación foliar puede ser de gran ayuda para las plantas, debido a que participa en procesos metabólicos de la planta, entre los que se encuentran la asimilación del amonio y procesos de transaminación (Shen & Yeh, 2010).

La formación de ácido glutámico es de vital importancia para la inclusión del nitrógeno a compuestos orgánicos, lo cual ocurre principalmente en los cloroplastos o mitocondrias de las células vegetales. Por ello la aplicación de este compuesto vía foliar incrementa la posibilidad de mejorar la asimilación de nitrógeno en las plantas, lo que a futuro podría asociarse con un mayor nivel de producción y rendimiento. También se ha relacionado a la aplicación foliar de ácido glutámico con la disminución en el contenido de nitratos en las plantas, promueve un incremento en la síntesis de clorofila, el contenido de aminoácidos libres, la proteína soluble y los azúcares solubles (Cao *et al.*, 2010).

En consecuencia, el ácido glutámico favorece la formación de clorofila b y aumenta la actividad de la glutamina sintetasa, la cual contrarresta la cantidad de radicales libre en la planta (Serna *et al.*, 2011).

2.9.2 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es una molécula antioxidante pequeña, es soluble en agua y actúa como un sustrato primario en la vía cíclica para la desintoxicación y la neutralización de radicales, participa en diversos procesos fisiológicos como la fotosíntesis, en cofactores enzimáticos, en la homeostasis del sistema redox y es precursor de las rutas de síntesis de moléculas en el metabolismo (Herrera *et al.*, 2013).

Este ácido se ha relacionado con algunos compuestos asociados a las respuestas oxidativas y antioxidantes originadas por factores de estrés y se le han atribuido las respuestas de tolerancia a estrés biótico y abiótico en las

plantas. Se encuentra en los cloroplastos, en el citosol y en las vacuolas de la célula vegetal, presumiblemente es el más importante para contrarrestar los efectos oxidantes (Shen & Yeh, 2010).

Se ha demostrado que el ácido ascórbico desempeña varias funciones en el desarrollo de las plantas, dentro de las que destacan la división celular, la expansión de la pared celular y otros procesos de desarrollo. Este compuesto actúa mediante el incremento en la producción de enzimas que ayudan a resistir cambios bruscos tanto bióticos como abióticos, por ello de la importancia de adición de esta sustancia a las mezclas nutrimentales para aplicación foliar (Herrera *et al.*, 2014).

2.10 Funciones de las enzimas peroxidasa, catalasa y prolina

Una de las consecuencias que sufren las plantas ante la presencia de estrés es la acumulación de sustancias que promueven la liberación de radicales altamente oxidativo, por ello es importante la participación de agentes antioxidantes, entre las que destacan las enzimas catalasa, peroxidasa y la prolina (Moller & Jensen, 2007).

Los radicales de peróxido y su producto reductor de peróxido de hidrógeno, son compuestos potencialmente nocivos que al combinarse forman un radical altamente tóxico conocido como radical hidroxilo, estos radicales provocan la oxidación de los lípidos y por consecuencia, provocan daño a las membranas, estimulan la degradación de proteínas e inactivación de enzimas, promoviendo el estrés oxidativo de las células (Díaz, 2003).

Con el estrés hídrico, los tejidos vegetales generan una acumulación activa de solutos para asegurar la sobrevivencia de las plantas, entre los que destacan la prolina, glicina, betaína, manitol y azúcares solubles, cuya síntesis se ha asociado con el mantenimiento de la turgencia de los tejidos para continuar con la función celular (Cvikrová *et al.*, 2013).

La acumulación de prolina, además de inducir ajuste osmótico, protege a las membranas y a las proteínas de la deshidratación y actúa como desintoxicador de radicales libres (Moreno, 2009).

2.11 Literatura citada

- Abdel-Mawgoud, A. M. R., El-Bassiouny, A. M. & Abou-Hussein, S. D. (2011). Foliar Application of Amino Acids and Micronutrients Enhance Performance of Green Bean Crop under Newly Reclaimed Land Conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(6), 51-55.
- Azcón, B. J. & Talón M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. Fisiología de plantas y estres 2nd ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Pp 570-600.
- Ballester, C., Castel, J., Intrigliolo, D. S., & Castel, J. R. (2010). Response of Clementina de Nules citrus trees to summer deficit irrigation. Yield components and fruit composition. *Agricultural Water Management*, 98, 1027-1032, Doi:10.1016/j.agwat.2011.01.011.
- Bondada R., B., Petrcek, D. P., Sivertsen, P. J., & Albrigo, G. L. (2006). Cuticular penetration characteristics of urea in citrus leaves. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81(2), 219-224.
- Bonifaz, A., Rios J. M., Arenas R., Araiza J., Fernández R., Mercadillo P., (2013). Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. *Rev Iberoam Micol.* (2):109-11.
- Cao, Y. P., Gao, Z. K., Li, J. T., Xu, G. H., & Wang, M. (2010). Effects of Extraneous Glutamic Acid on Nitrate Contents and Quality of Chinese Chive. *Acta Horticultura*, 856, 91-98.
- Commenil, P., Brunet L., & Audran L. (1997). The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *J. Exp. Bot.* 48:1599-1607.
- Cvikrová, M., Gemperlová, L., Martincová, O., & Vanková, R. (2013). Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73, 7-15.
- Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *REB*, 22(2): 76-84.
- Fan, M., Zhao, Z. & Assmann. M. (2004). Células guarda: un modelo dinámico de señalización. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:537-546.
- FAOSTAT (2018). Producción, exportación e importación de limas y limones en el mundo. 1 p.
- Flores -Vindas, E. (1999). La planta: estructura y función. Cartago: Libro Universitario Regional. Volumen. II. pp. 884.
- Hernández del Valle, Guillermo, Hernández González, Orlando, Guridi Izquierdo, Fernando, & Arbelo Fortes, Norma. (2012). Influencia de la siembra directa y las aplicaciones foliares de extracto líquido de Vermicompost en el crecimiento y rendimiento del frijol (phaseolus

- vulgaris L.) cv. cc-25-9. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 21(2), 86-90.
- Herrera F., T. S., Ortiz, C. J., Delgado, A. A., & Acosta, G. J. A. (2014). Contenido de osmoprotectores, ácido ascórbico y ascorbato peroxidasa en hojas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5), 859-870.
- Herrera-Martínez, S. L., Mora-Herrera, M. E., García-Velasco, R., Gomora-Rasso, J., & Rogel-Millán, G. (2013). Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa de plantas de rosal. *Terra Latinoamericana*, 31, 193-199.
- Ibrahim, M. E, Bekheta, M. A., El-Moursi, A., & Gaafar, N. A. (2007). Improvement of Growth and Seed Yield Quality of *Vicia faba* L. Plants as Affected by Application of Some Bioregulators. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 657-666.
- Katkat AV, Çelik H, Turan MA, Asik BB (2009) Efectos del suelo y aplicaciones foliares de sustancias húmicas sobre el peso seco y la absorción de nutrientes minerales del trigo en condiciones de suelo calcáreo. *Aust J Basic Appl Sci* 3: 1266–1273.
- Kolattukudy P (1996). Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: Plant Cuticles. G. Kerstiens (ed). Oxford: BIOS Scientific Publishers. pp:83-108.
- Mejías, M., Molist, P., & Pombal, A. M. (2017). Atlas de histología animal y vegetal: tejidos vegetales. 14 p.
- Meléndez, G., & Molina, E. (2002). Fertilización foliar: principios y aplicaciones. Universidad de Costarrica. 145 p.
- Merz W. & Roberts G.(2002). Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray R., Baron, E. J., Pfaller M. A. Manual of Clinical Microbiology. 8°edition. Washington DC, American Society for Microbiology 1668-85.
- Moller, I. M., & Jensen, P. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Ann Rev Plant Bio*, 58, 459-481.
- Monheit J., Cowan, D., Moore D.(1984). Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescent microscopy. *Arch Pathol Lab Med*. 108: 616-8.
- Moreno F., L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.
- Navarro, J. M., Pérez-Pérez, J. G., Romero, P., & Botía, P. (2010). Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chemistry*, 119, 1591-159.
- Nayer, M., & Reza, H. (2008). Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3(3), 448-453

- Ortuño, M. F., Alarcón J., Nicolás, E. y Torrecilla, A. (2004). Interpreting trunk diameter changes in young lemon trees under deficit irrigation. *Plant Science*. 167: 275-280.
- Quiñones A. B., Martínez A. y Legaz, F. (2007). Influence of irrigation system and fertilization management on seasonal distribution of N in the soil profile and on N-uptake by citrus trees. *Agriculture: Ecosystems and Environment*. 122: 399-409.
- Rinne, W. E., & Deacon, J. E. (1973). Fluorescent Pigment and Immersion Stain Marking Techniques for *Lepidomeda mollispinis* and *Cyprinodon nevadensis*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 102(2), 459-462. doi:10.1577/1548-8659(1973)1022.0.CO
- Rivera, O. P, Blanca I., Castro-M., y Francisco R. (2009). Clorosis férrica en cítricos y fertilización foliar *Terra Latinoamericana* 27:1.
- Rudall, J. P. (2007). *Anatomy of Flowering Plants: an introduction to structure and development* (1ª ed.). USA: Editorial Cambridge University Press.
- SAC (2019). Sociedad Argentina de Citología. Congreso de la Sociedad Argentina de Citología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Sadak M., S. H., Abdelhamid, M. T., & Schmidhalter, U. (2014). Efecto de la aplicación foliar de aminoácidos sobre el rendimiento y parámetros fisiológicos en plantas de haba irrigadas con agua de mar. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 141-152, DOI: 10.15446/abc.v20n1.42865.
- SAGARPA, 2018. Citricos, LIMON, NARANJA Y TORONJA MEXICANOS .Planeación agrícola nacional 2016-2030. 22 p.
- Sagoo, S. K., & Jockusch, R. A. (2011). The fluorescence properties of cationic rhodamine B in the gas phase. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 220(23), 173-178. doi:10.1016/j.jphotochem.2011.04.008
- Salwa, A. I. E., Mohsen, M. A., & Behary, S. S. (2010). Amelioration Productivity of Sandy Soil by using Amino Acids, Sulphur and Micronutrients for Sesame Production. *Journal of American Science*, 6(11), 250-257.
- Sánchez-Torres, Y., Matus-Gardea, J. A., García-Salazar, J. A., Martínez-Damián, M. A., & Gómez-Cruz, M. A. (2011). Estimación de la demanda de importaciones de lima 'Persa' (*Citrus latifolia* tanaka) en Estados Unidos procedentes de México (1994-2008). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 819-827.
- Schöner, J., & Luber, M. (2001). Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant and Soil*, 236, 117–122.
- Schönerr, J. (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 471–2491, DOI: 10.1093/jxb/erj217.

- Serna, R. J. R., Castro-Brindis, R., Colinas-León, M. T., Sahagún-Castellanos, J., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2011). Aplicación foliar de ácido glutámico en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(1): 9-13.
- Shafeek, M. R., Ali, A. H. & Asmaa, R. M. (2016). Foliar application of amino acids and bio fertilizer promote execution of broad bean plant (*Vicia faba* L) under newly reclaimed land conditions. *International Journal of Pharm Tech Research*, 9(5), 100-109.
- Shen, C. H., & Yeh, K. W. (2010). The signal network of ascorbate homeostasis. *Plant Signaling and Behavior*, 5(5), 570-572, DOI: 10.4161/psb.11165.
- SIAP, (2017). CITRICOS, LIMON, NARANJA Y TORONJA MEXICANOS. Planeación agrícola nacional 2016-2030. 22 p.
- SIAP, (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas agroalimentario 2012-2018 (1ª ed.). México: SIAP.
- Sigma-Aldrich. (2010). Safranina O Toluca; 2010 [acceso 12 marzo 2012]. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>
- Smolén, S. (2012). Foliar nutrition: current state of knowledge and opportunities. In Srivastava, A. K. (Ed.) *Advances in citrus nutrition* (pp. 41-58). India: Springer.
- Smoleń, S., & Sady, W. (2012). Effect of foliar application of urea, molybdenum, benzyladenine, sucrose and salicylic acid on yield, nitrogen metabolism of radish plants and quality of edible roots. *Journal of Plant Nutrition*, 35:8, 1113-1129, DOI: 10.1080/01904167.2012.676125.
- Soria, I. N. 2008. Nutrición foliar y defensa natural. XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 11p.
- Srivastava, A. K., & Singh, S. (2003). Foliar fertilization en citrus: a review. *Agricultural Reviews*, 24(4), 250-264.
- Tadeo F. R. (2003). Histología y citología de cítricos. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Valencia: Generalitat Valenciana. Volumen 54 99p.
- Tadeo R., F., Molla, J. L., Iglesias, J. D., Talón, M., & Primo-Millo, E. (2003). Histología y citología de cítricos (1ª ed.). España: Editorial GENERALITAT VALENCIANA.
- Trejo-Téllez, L., & Rodríguez-Mendoza, M., & Alcántar-González, G., & Vázquez-Alarcón, A. (2003). Fertilización foliar específica para corregir deficiencias nutrimentales en tres tipos de suelo. *Terra Latinoamericana*, 21 (3), 365-372.
- Vélez S., J. E., Intrigliolo, D. S., & Castel, J. R. (2011). Programación de riego en base a sensores de medida del estado hídrico del suelo y de la planta. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 14(2), 65-73.

- Vélez, Javier E, Álvarez-Herrera, Javier G, & Alvarado-Sanabria, Oscar H. (2012). Water stress on citric fruit (*Citrus* spp.): a review. *ORINOQUIA*, 16(2), 32-39.
- Veraverbeke, E., Verboven, P. V., Nicolaï B. (2003) Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestri* subsp. *Mitis* (Wallr)) during storage. Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients. *Postharv. Biol. Technol.* 30:75-88.
- Wagner P., Fürstner R., Barthlott W., Neinhuis C. (2003) Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *Jou. Exp. Bot.* 54:1-9.

CAPITULO III. VELOCIDAD Y RUTA DE ABSORCIÓN FOLIAR DE TRES AMINOÁCIDOS EN HOJAS DE LIMA 'PERSA' EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.

RATE AND ROUTE OF FOLIAR ABSORPTION OF THREE AMINOACIDS 'PERSIAN' IN LEMON LEAVES IN CONDITIONS WATER STRESS.

José B. Hernández-Palomo¹; Gustavo Almaguer-Vargas¹; Teresa Colinas Leon¹
María Sol Robledo y Monterrubio²

¹Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. Correo-e: agronortech@gmail.com. Tel. cel.: +52 8717105544 (Autor para correspondencia).

²Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230.

3.1 RESUMEN

Existen factores ambientales como la disponibilidad de agua, que limitan la producción y la disminución en el rendimiento. Una forma poco estudiada de ayudar a la planta en condiciones de estrés es la fertilización foliar, pero se desconocen cuáles son los mejores fertilizantes y sus rutas de penetración. Por ello, se analizó la velocidad y ruta de absorción foliar de tres aminoácidos osmoprotectores en plantas de lima 'Persa' en condiciones de estrés hídrico. La investigación se llevó a cabo en el campo experimental de San Martín de la Universidad Autónoma Chapingo. Los tratamientos fueron aminoácidos osmoprotectores (arginina, ácido aspártico y ácido glutámico) combinados con cuatro colorantes y se observaron en un microscopio cortes histológicos de fluorescencia y campo claro para rastrear el paso de los tres aminoácidos a través de las células, de esta manera se determinó la ruta de absorción y la velocidad en micrómetros por segundo. Los datos fueron analizados estadísticamente con una prueba de medias Tukey. Se encontró que el ácido glutámico fue el aminoácido con mayor velocidad de absorción en comparación al de arginina y ácido aspártico. Se observaron varias rutas de absorción en la cutícula y a través de las estomas.

Palabras clave: ácido glutámico, ácido aspártico, arginina

3.1ABSTRACT

There are factors such as the availability of water, which limits production and decreases in yield. A little studied form of the help in the plant in conditions of stress is the foliar fertilization, but it is not known that the best fertilizers and their routes of penetration. Therefore, the speed and path of foliar absorption of three osmoprotective amino acids in "Persa" lime plants under water stress conditions was analyzed. The investigation was carried out in the experimental field of San Martín of the Autonomous University of Chapingo. The treatments were osmoprotective amino acids (arginine, aspartic acid and glutamic acid) combined with four dyes and were observed in a fluorescence and field histology microscope to track the passage of animals through the cells, in this way the path was determined absorption and speed in micrometers per second. The data were analyzed statistically with a Tukey media test. It was found that glutamic acid was the amino acid with the highest absorption rate compared to arginine and aspartic acid. Several absorption routes were observed in the cut and through the stomatal.

Keywords: glutamic acid, aspartic acid, arginine

3.2 INTRODUCCIÓN

En México la citricultura es una actividad de gran importancia económica y en el 2013, el país ocupó el quinto lugar a nivel mundial con un 5.6% de la producción de cítricos, después de China, Brasil, Estados Unidos e India (FAO, 2015).

Para el año 2017 los principales estados productores de lima en México fueron Michoacán, Veracruz y Oaxaca, con una producción total de 711, 758 y 274 mil toneladas, respectivamente, con un valor de la producción de 3.5, 3.2 y 1.6 miles de millones de pesos, respectivamente. Solamente estos tres estados aportan 66.1% del total nacional 2012-2017 (SIAP, 2018)

Sin embargo, el rendimiento es afectado por diversos factores ambientales y nutrimentales, uno de ellos es la poca disponibilidad de agua en las zonas productoras, que repercute en el crecimiento y desarrollo de la planta debido a que el agua juega un papel vital, pues interviene prácticamente en todos los procesos fisiológicos (Ortuño *et al.*, 2004, Vélez *et al.*, 2012); un déficit hídrico afecta negativamente las funciones fisiológicas de las plantas como: fotosíntesis, respiración, reacciones metabólicas y anatómicas, crecimiento, reproducción, desarrollo de semillas, producción, transporte de asimilados y absorción de nutrientes minerales (Quiñones *et al.*, 2007). Las plantas responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular (Shinozaki y YamaguchiShinozaki, 2007) y una de las principales respuestas es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Zhu *et al.*, 2002).

Entre estos compuestos se encuentran, el ácido glutámico, el ácido aspártico y la prolina; esta última reajusta el potencial osmótico celular (Langridge *et al.*, 2006), acumulándose en grandes cantidades en respuesta a un estrés ambiental y contribuye a estabilizar estructuras subcelulares, membranas y proteínas, eliminación de radicales libres y como buffer del potencial redox bajo estrés

(Ashraf & Foolad, 2007). Así mismo la prolina oxidasa cataliza la formación de glutamato a partir de prolina y su actividad se reduce en condiciones de estrés hídrico.

Una técnica para reducir el efecto negativo del estrés hídrico, es la aplicación de fertilizantes, como el ácido glutámico, que es un compuesto que puede ser absorbido tanto en forma foliar como radical y tiene como función la asimilación de nitrógeno en las plantas y como consecuencia eleva el rendimiento, disminuye la cantidad de nitratos y aumenta la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos (Cao *et al.*, 2010).

Trejo-Tellez *et al.* (2003), estudiaron aplicaciones foliares como herramienta para la corrección de deficiencias ocasionadas por tres diferentes tipos de suelo y encontraron viable la aplicación foliar no solo para corrección de deficiencias, además aumentaron el rendimiento hasta un 112%.

Rivera *et al.* (2009) evaluaron el efecto de las aplicaciones foliares para la corrección de hierro y encontraron que la mezcla de sulfato ferroso y citrolina corrigieron en un 50% la deficiencia. Por otro lado, Serna *et al.* (2011) cuantificaron el efecto del ácido glutámico vía foliar en jitomate para elevar el rendimiento, y lograr aumentar la concentración de clorofila b.

Nava *et al.*, (2003), estudiaron el efecto de la fertilización foliar en el rendimiento y calidad de bulbo de cebolla, sin embargo no encontraron aumento del rendimiento y no hubo diferencias significativas en las variables evaluadas, pero observaron que los nutrimentos penetraron a la hoja por los estomas.

Con base en lo anterior, es evidente que esta técnica es ampliamente utilizada en la producción agrícola, pero no existe mucha información de los procesos que regulan la velocidad de absorción y la ruta que siguen los compuestos para entrar a la planta. Es por ello que en la presente investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de la fertilización foliar para reducir el efecto del estrés hídrico y paralelamente identificar las rutas y velocidad de absorción del fertilizante en lima “Persa”

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Ubicación

El experimento se llevó a cabo en el campo experimental “San Martín” de la Universidad Autónoma Chapingo, en un invernadero de baja tecnología con cubierta plástica de tipo cenital, sin control de temperatura y humedad relativa.

3.3.2 Material vegetal y labores culturales.

Se utilizaron plantas de lima “Persa” de un año de edad injertadas sobre el portainjerto volkameriano, las cuales se trasplantaron el 12 de marzo 2016 en un contenedor con un volumen de 150 L⁻¹ de peat moss hasta la etapa productiva para iniciar el experimento. Posteriormente se realizó una poda de despunte a 30 cm por encima del patrón.

La fertilización fue con una solución cuya concentración de nutrimentos minerales (mg·L⁻¹) fue la siguiente: N= 250, P= 60, K= 250, Ca= 300, S= 200, Mg= 60, Fe= 3, Mn= 0.5, Cu= 0.1 y Zn =0.1. Y se aplicaron 3 litros cada tres días. El nivel de estrés se determinó con una bomba Scholander (Soil moisture, Santa Bárbara, California, USA) y cuando las plantas presentaron una lectura de -3 MPA, se aplicaron los tratamientos.

3.3.3 Identificación de las rutas de absorción de los aminoácidos

Se prepararon soluciones con agua destilada y se les agregó ácido glutámico, arginina y ácido aspártico al 0.5%. A cada solución se le adicionó un colorante al 0.05% (Naranja G, Safranina, Rodamina y calcofluor M2R) cerciorándose que hubiera miscibilidad entre el colorante y el aminoácido; una vez preparada la solución se agregó nonil fenol a una concentración de 1%.

La solución se asperjó en cuatro plantas en días despejados por la mañana para posteriormente muestrear 12 hojas jóvenes a los 60, 120, 180, 240 y 300 minutos. Se hicieron cortes de las hojas en el laboratorio de histología vegetal, en el Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma Chapingo con un

grosor de siete micrómetros, usando un micrótomo manual marca Pika. Se montaron en agua para ser observados “in situ” en un microscopio de campo claro y de fluorescencia marca Carl Zeiss Axio Scope con el cual se tomaron imágenes para analizar la ruta de absorción. Se compararon las imágenes para evaluar la velocidad de absorción en micrómetros por segundo y se utilizó un diseño experimental al azar con un total 40 unidades experimentales por tratamiento. A los datos se les realizó una prueba de normalidad, homogeneidad de las varianzas y prueba de medias de Tukey (Alpha=0.05).

3.3.4 Tratamientos.

Se evaluaron 12 tratamientos y un testigo; los cuales fueron los siguientes.

T1 Acido Glutámico + Calcofluor	T7 Ácido aspártico + Safranina
T2 Acido Glutámico+ Rodamina	T8 Ácido aspártico + Naranja G
T3 Acido Glutámico + Safranina	T9 Arginina + Calcofluor
T4 Acido Glutámico + Naranja G	T10 Arginina + Rodamina
T5 Ácido aspártico + Calcofluor	T11 Arginina +Safranina
T6 Ácido aspártico + Rodamina	T12 Arginina + Naranja G

3.3.5 Velocidad de absorción.

Una vez seleccionados los cortes en los diferentes tiempos se midieron con el programa ZEN 2.3, y se determinó la distancia que recorrió el aminoácido en cada tiempo y de esta forma se obtuvo la velocidad de absorción en micrómetros por segundo ($v=d/t$).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Velocidad de absorción del ácido glutámico.

El análisis estadístico realizado a los tratamientos indicó que el ácido glutámico fue el aminoácido que se absorbió con mayor velocidad, obteniendo una media de 0.035991 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (cuadro 1).

Así mismo, el comportamiento del aminoácido con cada uno de los colorantes fue estadísticamente diferente siendo más rápido con el calcofluor (cuadro 1).

Cuadro 1. Valores promedio de ácido glutámico, ácido aspártico y arginina en combinación con distintos colorantes (Calcofluor, Rodamina, Safranina, Naranja G).

Aminoácido	Calcofluor	Rodamina	Safranina	Naranja G
Ácido glutámico	0.045084 A	0.021337 C	0.038952 B	0.040889 B
Ácido aspártico	0.18733 A	0.014015 A	0.017409 A	0.018733 A
Arginina	0.02752 B	0.0066657 C	0.0329964 A	0.0309398 A
	Ácido glutámico 0.035991 A	Ácido aspártico 0.016941 C	Arginina 0.02435 B	

El ácido glutámico se observó claramente en los cortes de hojas de lima “Persa”. En el corte del haz con solución de ácido glutámico y safranina a los 60 minutos (figura 1a), se puede identificar al aminoácido en la cutícula, rebasando las capas de ceras epicuticulares. Por otro lado, en el envés, en el tratamiento de solución de ácido glutámico y rodamina, se observa cómo se extiende desde la cutícula hasta células del parénquima esponjoso (Figura 1(b)). Para el caso del tratamiento de glutámico y Naranja G (figura 1c), se observa rastros del fertilizante en células de conducción. Con calcofluor en campo azul se distingue el paso de la solución por el haz sobre células de parénquima en empalizada.

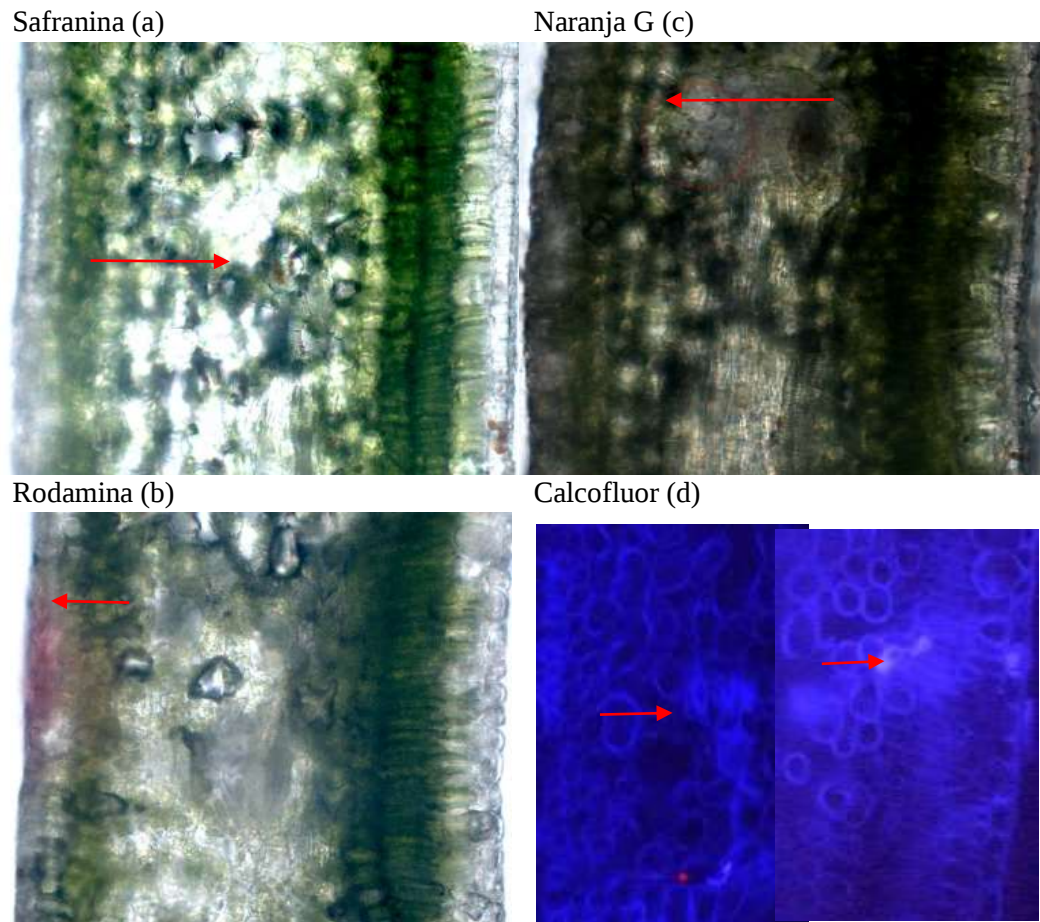


Figura 1. Cortes transversales de hojas de Lima Persa (7 micrometros), 60 minutos después de la aplicación de ácido glutámico, con diferentes colorantes (a) safranina observar , (b) rodamina, (c) Naranja G y (d) calcofluor, las flechas indican la presencia de los tratamientos en las diferentes estructuras de las células.

Estos resultados pueden deberse a que el ácido glutámico es absorbido fácilmente de forma foliar y se incorpora rápidamente al metabolismo de las plantas (Arjona *et al.*, 2004), mejorando procesos metabólicos, como la asimilación de amonio y procesos de transaminación (Taiz y Zeiger, 2003). Así mismo, la mayor velocidad de absorción que tuvo, en comparación con los otros aminoácidos, pudo haberse debido a la condición de estrés en el que se encontraban las plantas, ya que en condiciones de estrés hídrico la recuperación del nitrógeno por parte de la planta disminuye parcialmente y el ácido glutámico es un ik8yeaminoácido relacionado con la asimilación de este elemento (Rimski-

Korsakov *et al.*, 2012); investigaciones anteriores mencionan que existen compuestos como el glutamato que permiten mejorar las condiciones de las células cuando hay baja disponibilidad de agua disminuyendo la posibilidad de las interacciones moleculares que pueden causar la desnaturalización.

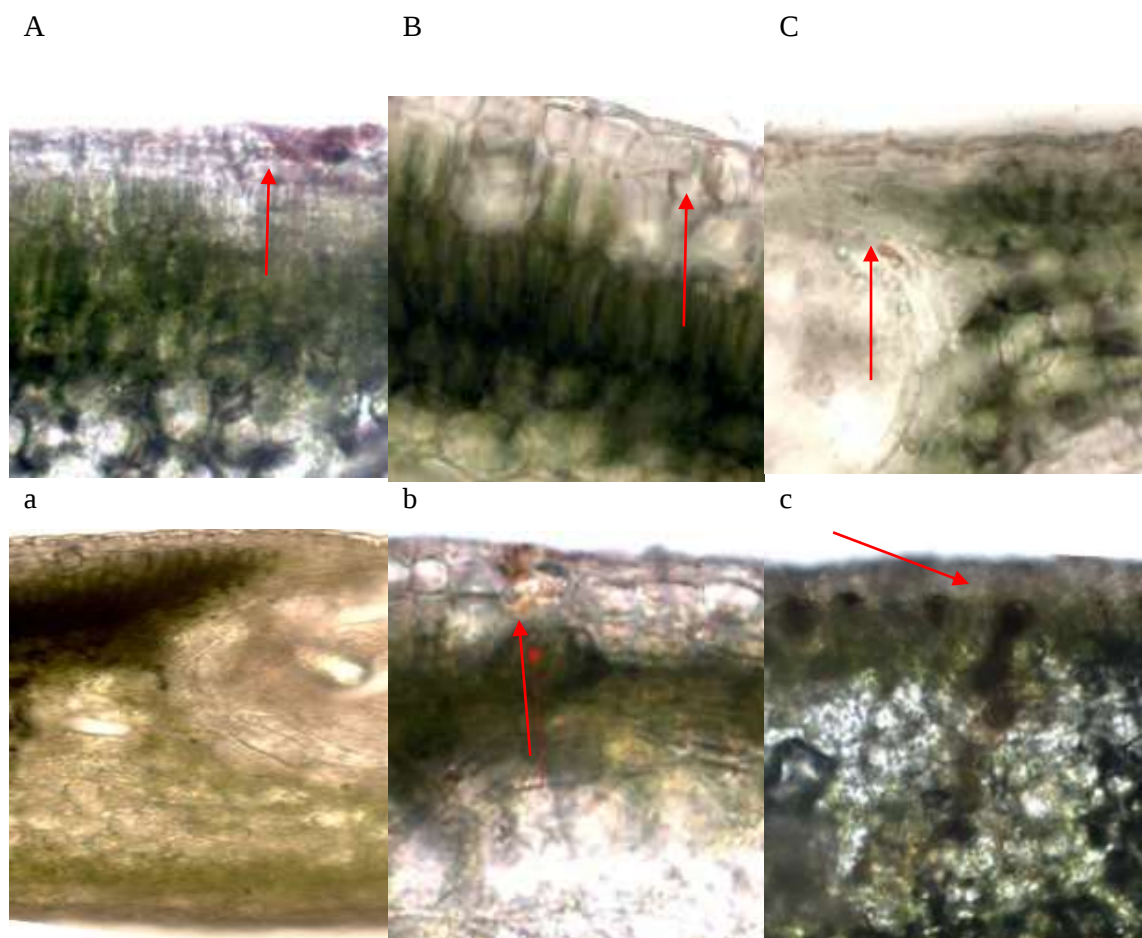


Figura 2. Secuencia microscópica de la absorcion foliar de la arginina y acido aspartico con un aumento de 40x. Corte transversal de la hoja 60 minutos despues de la aplicación de arginina, (2A); Corte transversal de la hoja 120 minutos despues de la aplicación de arginina, (2B); Corte transversal de la hoja 180 minutos despues de la aplicación de arginina, (2C). Corte transversal de la hoja 60 minutos despues de la aplicación de acido aspartico, (2a); Corte transversal de la hoja 120 minutos despues de la aplicación de acido aspartico, (2b); Corte transversal de la hoja 180 minutos despues de la aplicación de acido aspartico, (2c).

3.5.2 Velocidad de absorcion de la arginina.

La arginina se absorbió a una velocidad de $0.02435 \mu\text{m}/\text{seg}$ y al ser comparada estadísticamente (Tukey=0.05) con los demás tratamientos resultó ser la segunda mejor velocidad.

La mezcla de colorantes con el aminoácido arginina tuvieron una respuesta en distintos tiempos, es decir su absorción varió con respecto a cada colorante utilizado. Las soluciones preparadas con Safranina y Naranja G, fueron las que presentaron las velocidades de absorción mas altas y estadísticamente fueron iguales con un promedio de 0.0329964 y 0.0309398 $\mu\text{m}/\text{seg}$ respectivamente, seguidas de la solución con calcofluor con una velocidad de 0.02752 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y por último la rodamina con una velocidad de 0.0066657 $\mu\text{m}/\text{seg}$.

La variabilidad de respuestas por colorante podría deberse a sus características químicas para unirse o separarse de los aminoácidos, combinándose debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares (Salazar y Moreno, 2016). Por otro lado, la velocidad de absorción de la arginina podría deberse a que este aminoácido es una de las formas en las que se almacena el nutriente con más demanda de las plantas (nitrógeno) y puede variar en más de cien veces su concentración entre órganos (Reuter, 1957), en condiciones de estrés hídrico.

3.5.3 Ruta de absorción de la arginina en hojas de lima 'Persa' a los 60 minutos después de la aplicación

En la figura 2 (A, B, C) se presenta una secuencia del rastro de la arginina con safranina en distintos tiempo. No obstante, se observa al aminoácido en la cutícula (Figura 2A a los 60 min), la cual es una capa que cubre la superficie de la planta protegiéndola de pérdidas excesivas de agua por transpiración, así como de la pérdida excesiva de solutos orgánicos e inorgánicos por lixiviación (Wójcik, 2004). Está compuesta de ácidos grasos hidroxilados entrecruzados y que juegan un papel central en las relaciones hídricas de la planta y la interacción de la hoja con elementos externos (Mohammadian *et al.*, 2009).

En la figura 2B se observa que el aminoácido ya ha atravesado la cutícula encontrándose a los 120 minutos en células de la epidermis. En el muestreo correspondiente a los 180 minutos el aminoácido se observa cerca de los tejidos de conducción o sistema vascular el cual se encargará de llevarlo a las zonas de demanda. Estos resultados coinciden con lo presentado con Katto *et al.* (1985) y

Rojas (1992) que menciona que la arginina y sus productos metabólicos se acumulan cerca de los tejidos de conducción.

3.5.4 Velocidad de absorción del ácido aspártico

El análisis estadístico aplicado a la velocidad de absorción en los aminoácidos, indicó que el ácido aspártico fue el que tuvo menor velocidad de absorción ($0.016941 \mu\text{m}/\text{seg}$), en comparación con el ácido glutámico y arginina (cuadro1). La presencia del aminoácido se detectó a los 180 minutos después de la aplicación (figura 2c). Eichert y Goldbach, (2008), mencionan que la entrada de compuestos a través de las hojas es un proceso que no requiere de energía y que está controlado por gradientes de concentración. Así mismo, Schonher (2000), encontró que los iones de CaCl_2 entran por los poros acuosos de manera muy lenta, sin embargo al agregar agentes humectantes, aumenta la velocidad de penetración. Con base en lo anterior es posible que la solución preparada con ácido aspártico haya generado una disparidad entre las capas de las hojas o bien la concentración no fue la suficiente en la parte externa de la hoja para generar el movimiento desde la parte exterior hacia adentro de la hoja (Fernández, et al. 2015).

3.5.5 Ruta de absorción del ácido aspártico en hojas de lima 'Persa' a los 120 minutos después de la aplicación

Los muestreos evaluados a los 60 minutos después de la aplicación no mostraron presencia del aminoácido en el corte amplificado a 40x (Figura 2a), sin embargo en el muestreo correspondiente a 120 minutos se observó presencia de ácido aspártico en la cutícula y en las células de la epidermis y en el muestreo correspondiente a los 180 minutos, el aminoácido penetró por las cavidades estomáticas a una velocidad de $0.014015 \mu\text{m}/\text{seg}$ (figura 2c). Estos resultados contrastan con los mencionados por distintos investigadores, los cuales mencionan que la absorción de nutrientes a través de los estomas es muy poco probable, porque el contacto gota-estoma es mínimo, debido a que las gotas son más grandes que la apertura estomática, y porque el agua tiene alta tensión

superficial (Schönherr y Bukovac, 1972). Adicionalmente, la difusión del soluto tendría que ocurrir mayoritariamente de una fase líquida a una gaseosa, lo que es poco probable (Trejo-Téllez *et al.*, 2007). No obstante Nava *et al.*, (2003) al estudiar diferentes mezclas de fertilizantes con calcofluor encontraron que la ruta de absorción en hojas de cebolla fue por los estomas y Galdino *et al.*, (2017) al evaluar el efecto de un fertilizante foliar 4-17-17(NPK) en agave azul para identificar las rutas de penetración encontraron que la vía de absorción fue estomática y cuticular. Así mismo, García *et al.*, (2013) evaluaron el efecto de la aplicación foliar de un fertilizante 10-10-10 (NKP) en *Cymbidium* sp. y encontraron que la ruta de penetración fue vía estomática a partir de los 30 minutos después de la aplicación.

3.6 CONCLUSIONES

El ácido glutámico se absorbió por la cutícula, pasando por las capas de ceras epicuticulares y en el envés se observó cómo se extendió por el parénquima esponjoso. En el caso de la arginina, se puede observar su rastro en diferentes tiempos, a los 60 minutos se encontraba en la cutícula y a los 120 minutos en células de epidermis para posteriormente encontrarse en los tejidos de conducción (180min). El ácido aspártico a diferencia de lo otro aminoácido evaluado presentó una ruta de absorción diferente, a los 120 minutos se encontraba en la cutícula y a los 180 minutos había entrado a la hoja por los estomas.

La velocidad de absorción de los aminoácidos, aplicados vía foliar fue estadísticamente diferente. El ácido glutámico fue el que alcanzó la mayor velocidad, seguido de la arginina. Por otra parte, el aminoácido más lento en transportarse fue el ácido aspártico. Así mismo, los colorantes utilizados para rastrear la ruta de absorción se comportaron de manera diferente con cada uno de los aminoácidos, en la solución con calcofluor la velocidad más rápida fue con el ácido glutámico, para el caso de la safranina, naranja G y rodamina la combinación con ácido aspártico obtuvo la mayor velocidad. La arginina obtuvo los valores promedio en la solución de safranina y naranja G.

3.7 LITERATURA CITADA

- Arjona, H. D., Herrera, J. E. Gómez, J. A. y Ospina J. (2004). Evaluation of the application of urea, molasses and amino acids on growth and yield of onion plants (*Allium cepa* L.) in the Bogotá Savanna. *Agronomía Colombiana*. 22 (2): 177-184.
- Ashraf, M. & M. R. Foolad. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environment. Experimental. Bot.* 59, 206-216
- Galdino, B. R., González E. D. R., Rodríguez M., Nieves M. & Rodríguez M. R. (2017). Penetration pathways for a foliar fertilizer in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 985-991.
- Cao, Y. P., Gao, Z. K.; Li, J. T.; Xu, G. H.; Wang, M. (2010). Effects of extraneous glutamic acid on nitrate contents and quality of chinese chive. *Acta Hort* 856: 91-98.
- Eichert, T. & Goldbach, H. E. (2008). Equivalent pore radio of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces further evidence for a stomatal pathway. *Physiol. Plant.*132:491-502.
- FAO (2015). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Citrus Fruits Statistics*.
- García G., V., Valdovinos P. G., Nieves M., Pedraza S. M. E., Trejo T. L. I., & Soto H. M. (2013). Rutas de la penetración foliar en la fertilización de la orquídea *Cymbidium* sp. (Orchidaceae). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(5), 913-924.
- Katto, T., Makot, Y., & Sadao, T. (1985). Upward translocation of c-amino compounds in xylem and phloem of citrus trees (citrus unshiu M.). *Hort science*, 54(2):163-170.
- Langridge, P., N. Paltridge & Fincher G. (2006). Functional Genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief. Funct. Genomic Proteomic* 4: 343-354
- Mohammadian, M., Watling, J. & Hill, R. (2009). Stomatal plugs and their impact on fungal invasion. *Agathis robusta*. *Australian Journal of Botany*, 57, 389-395.
- Nava, R., Almaguer, G. Pérez, M. Maldonado, R. y Cárdenas, E. (2003). Fertilización foliar en cebolla. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(2): 159-163, 2004.
- Ortuño, M. F., Alarcón J., Nicolás, E. & Torrecilla, A. 2004. Interpreting trunk diameter changes in young lemon trees under deficit irrigation. *Plant Science*. 167: 275-280.

- Quiñones A. B., Martínez A. & Legaz, F. (2007). Influence of irrigation system and fertilization management on seasonal distribution of N in the soil profile and on N-uptake by citrus trees. *Agriculture: Ecosystems and Environment*. 122: 399-409.
- Reuter, G. (1957). Die Hauptformen des löslichen Stickstoffs in vegetativen pflanzlichen Speicherorganen und ihre systematische Bewertbarkeit. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung*. p 326-338
- Rimski-Korsakov, H., Rubio G. y Lavado R. S. (2012). Fate of the nitrogen from fertilizers in field-grown maize. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 93:253-263.
- Rivera, O. P., Blanca I., Castro M., & Francisco R. (2009). Clorosis férrica en cítricos y fertilización foliar *Terra Latinoamericana* 27:1.
- Rojas, B. (1992). Los bioestimulantes. ¿Solución a los problemas climáticos? *Empresa y avance agrícola* 2(4). 16-19.
- Salazar L. & Moreno F. (2016). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus*. 2(2):12-23
- Schönherr, J. y Bukovac, (1972). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2471-2491.
- Schönherr, J. (2000). Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*. 212:212-118
- Serna, R., Reynaldo, J., Castro, B. R.; Colinas, L. M. T.; Sahagún, C. J.; Rodríguez, P. J. (2011). Aplicación foliar de ácido glutámico en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mili.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(1), 9-13.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki. K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58(2), 221-227
- SIAP (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y ´Pesquera, Atlas Agroalimentario, Primera edición, 2018.
- Taiz, L. & E. Zeiger. (2003). Fisiología vegetal. Artemed. Porto Alegre, Brasil.
- Trejo T, L., Rodríguez M. M., Alcántar G. G., Vázquez A. A. (2003). Fertilización foliar específica para corregir deficiencias nutrimentales en tres tipos de suelo. *Terra Latinoamericana*, 21 (3), 365-372.
- Trejo T. L., Rodríguez, M. M. N., Alcántar, G. G. & Gómez, M. F. (2007). La fertilización foliar de micronutrientes incrementa la calidad del tomate (*Lycopersicon esculentum* L) en suelos alcalinos. *Acta Horticulturae*, 729, 301-306.

- Vélez, J. E., Álvarez H. J. G., Alvarado S. & H. O. (2012). Water stress on citric fruit (*Citrus* spp.): a review. *Orinoquia*, 16(2), 32-39.
- Wójcik, P. (2004). Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12, 202-204, 212-213.
- Zhu, J.K, K.S. Scumaker & L. Xiong. (2002). Cell signalling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14, 165-183.
- Fernández V., Sotiropoulos T., Brown P. (2015). Fertilizacion Foliar. Principios Científicos y práctica de campo. Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes. Primera edición, Paris, Francia

CAPITULO IV

CAPITULO IV

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN HOJAS DE LIMA “PERSA” BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO, CON APLICACIONES FOLIARES DE ÁCIDO GLUTÁMICO.

ENZYMATIC ACTIVITY IN "PERSIAN" LIME LEAVES UNDER WATER STRESS CONDITIONS, AND FOLIAR APPLICATIONS OF GLUTAMIC ACID.

José Bernardo Hernández Palomo¹, Almaguer Vargas Gustavo¹, María Teresa Colinas León¹, Carlos Ramírez Ayala²

¹Profesor-Investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5, Texcoco, Méx.

²Profesor-Investigador. Departamento de Hidrociencias. Colegio de postgraduados, campus Montecillos. Km. 36.5, Montecillo, Méx.

RESUMEN

En condiciones de estrés hídrico las plantas producen diferentes enzimas antioxidantes osmoprotectoras, que disminuyen los efectos negativos que causa esa condición. Con la finalidad de evaluar en la planta la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa y catalasa, como enzimas osmoprotectoras producidas en condiciones de estrés, se realizaron aplicaciones de ácido glutámico en concentraciones de 600, 1200 y 2000 mg L⁻¹ vía foliar en plantas de lima ‘Persa’ bajo estrés hídrico; conjuntamente se determinó la concentración de prolina en las hojas. Los resultados se analizaron mediante una prueba de medias. Los valores promedio más altos se presentaron en las plantas en condiciones de riego, con una actividad de 44% (catalasa) y 38% (ascorbato peroxidasa) mayor que las plantas asperjadas con ácido glutámico. Las variables fueron afectadas por la aplicación de ácido glutámico el cual reduce las condiciones de estrés hídrico en la planta.

Palabras clave: *Ascorbato peroxidasa, Catalasa, Prolina.*

SUMMARY

Under water stress conditions, plants produce different osmoprotective antioxidant enzymes, which reduce the negative effects caused by this condition. In order to evaluate the production of the enzymes ascorbate peroxidase and catalase in the plant, as osmoprotective enzymes produced under stress conditions, applications of glutamic acid were carried out at 600, 1200 and 2000 mg L-foliar concentrations in lime plants 'Persian' under water stress, the concentration of proline in the leaves was also determined. The results were analyzed by a means test. The highest average values were found in the plants under irrigation conditions, with an activity of 44% (catalase) and 38% (ascorbate peroxidase) more than the plants sprinkled with glutamic acid. The variables were affected by the application of glutamic acid which reduces the conditions of water stress in the plant.

Key words: Ascorbatoe peroxidase, Catalase, Proline.

4.2 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial México ocupa el primer lugar en exportación de limas, alcanzando una producción en el 2017 de 667.6 miles de toneladas (SAGARPA-COMTRADE, 2017). Su importancia económica radica en que solo dos estados (Michoacán y Veracruz) generaron un monto económico de 6 mil 737 millones de pesos para 2017, con una producción aproximada de 2, 513, 391 y 711, 181 toneladas respectivamente, seguidos por Oaxaca, que tuvo un volumen de 658, 282 toneladas, que tienen como principal destino a los Estados Unidos (SIAP, 2018).

No obstante, existen diversos factores ambientales que afectan la producción de los cultivos y el rendimiento. Uno de los más importantes es el suministro limitado del agua (Nuñez *et al.*, 2017), el cual afecta negativamente las funciones básicas de la planta como: fotosíntesis, reacciones metabólicas, respiración, crecimiento, reproducción, translocación de asimilados y la producción (García-Sánchez *et al.*, 2003; Ortuño *et al.*, 2004; Quiñones *et al.*, 2007). En cítricos, como en la mayoría de las plantas, las principales respuestas al estrés hídrico son el cierre parcial estomático, la reducción del área foliar y la acumulación de solutos que ayuden a mantener la turgencia en las células y generar un ajuste osmótico (Hockema y Etxeberria, 2001; Barry *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2010), el cual ayuda a mantener un funcionamiento normal de las plantas en condiciones de déficit hídrico (Argenteal & Gonzales, 2010). El ajuste osmótico es el resultado de la síntesis y acumulación de sustancias osmóticamente activas como: prolina, ácidos grasos, azúcares, glutamato, glicinbetaína, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polialcoholes, trehalosa, sacarosa, oligosacáridos y aminoácidos (Pereyra & Quiriban, 2014), los cuales son compuestos de bajo peso molecular que facilitan la absorción y retención de agua por la planta (Cushman, 2001).

Por otro lado, en condiciones de déficit hídrico se presenta una exposición de los cloroplastos a un exceso de energía de excitación que limita la fotosíntesis y

al mismo tiempo daña los centros de reacción del fotosistema II e incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como: oxígeno singlete, peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo, anión superóxido, entre otros (Tripathy & Oelmüller, 2012). Es importante mencionar que estas sustancias son reguladas por enzimas antioxidantes tales como: catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (Prx), la mono dehidroascorbato reductasa (MDAR), glutamina sintetasa (GS) y otras enzimas del ciclo ascorbato-glutation, que son promotoras de la eliminación de sustancias reactivas de oxígeno (Pirasteh *et al.*, 2012, Hong *et al.*, 2007, Miller *et al.*, 2009), en este ciclo juega un papel importante el ácido glutámico que junto con la cisteína y glicina, forman el glutatión, el cual en condiciones de baja humedad es el antioxidante no enzimático intracelular más importante (Pompella *et al.*, 2003), ya que reduce significativamente las concentraciones de radicales libres en las plantas (Blokhina *et al.*, 2003; Rinalducci *et al.*, 2008).

Es por ello que la aplicación de compuestos exógenos como el ácido glutámico en condiciones de estrés hídrico puede jugar un papel importante en las plantas, ya que además de ser un compuesto osmoprotector opera de forma sinérgica con fertilizantes y reguladores de crecimiento (Sandoval & Kamara, 2002). Y aunque no es considerado un nutrimento esencial, su aplicación en las hojas tiene un impacto positivo para las plantas debido a que interviene en procesos metabólicos importantes como la asimilación del amonio y la transaminación (Taiz & Zeiger, 2006) y tienen una función importante frente a situaciones adversas en las plantas.

Con base en lo anterior la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación foliar de diferentes concentraciones de ácido glutámico en hojas de lima 'Persa' en condiciones de estrés hídrico.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Material vegetal

El experimento se estableció en el campo experimental "San Martín" perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, durante el ciclo de otoño de 2018, en condiciones de invernadero. Se utilizaron árboles de tres años edad de lima 'Persa' injertadas sobre volkameriano.

4.3.2 Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos con tres muestreos, los cuales consistieron en tres dosis de ácido glutámico (600, 1200 y 2000 mg L⁻¹) y un testigo con plantas bien irrigadas. Los tratamientos se aplicaron en hojas jóvenes de lima 'Persa' y las plantas se encontraban con suspensión parcial de suministro de agua. El contenido de estrés se determinó con una bomba Scholander (Soil moisture, Santa Bárbara, California, USA) y cuando las plantas presentaron una lectura de -3 MPA, se aplicaron los tratamientos de ácido glutámico.

El diseño experimental fue un completamente al azar con 20 muestras por tratamiento, a las cuales se les aplicó una prueba de normalidad y homogeneidad de la varianza de acuerdo con la prueba de medias Tukey con un error de 0.05. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003) y se graficaron con Sigma Plot de Jandel Scientific (2000, versión 7.1).

4.3.3 Variables evaluadas

Para determinar el efecto del ácido glutámico aplicado vía foliar en hojas de lima 'Persa' en condiciones de estrés hídrico, se tomaron muestras las cuales fueron almacenadas en congelador a una temperatura de -20° a las cuales se les determinaron las siguientes variables.

4.3.4 Actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa se determinó con el método descrito por Blackwell et al., (1990), se pesaron 0.5 g de la muestra en tubos de fondo plano, y se agregaron 5ml. de sol. Tris – HCL 0.1M pH 8.5 + PVP frio, los cuales se homogenizaron en frio (baño de hielo). Una vez homogenizada se centrifugó a 21000 g en un tiempo de 20 min a una temperatura de 0 a 4°C . Una vez que la muestra se puso a temperatura ambiente, se calibro el espectrofotómetro con tris-HCl 8.5 .1M sin PVP para realizar las lecturas a una longitud de onda de 240 nm.

1.1.1 Determinación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX)

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo con el método de Nakano y Asada (1981), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción (2 ml) para la determinación de la actividad de APX contenía 250 mM de buffer fosfato (pH 7), EDTA 0.1 mM, ascorbato 5 mM, 0.3 mM H_2O_2 y 50 μl de extracto enzimático crudo. La reacción se inició mediante la adición de H_2O_2 . La disminución de la absorbancia debido a la oxidación del ascorbato se registró utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de a 290 nm (Shimadzu, UV-1601, Kyoto, Japón) a los 20 s y 60 s después de la adición de H_2O_2 durante 5 minutos. Se expresó como unidades por mg^{-1} de proteína.

4.3.5 Concentración del aminoácido prolina

Se utilizó el método propuesto por Bates *et al.* (1973). Se tomaron 50 mg de muestra liofilizada.

La concentración de prolina se calculó mediante una curva de calibración de este aminoácido, en la cual se prepararon diferentes concentraciones de prolina en un intervalo de 20-800 nmoles mL⁻¹. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm, después de la reacción con ninhidrina ácida. Cada muestra pesada se macera con 5 ml de ácido sulfosalicílico al 3%, el cual es filtrado a tubos de ensaye. Posteriormente se colocan 2 ml de ninhidrina ácida y 2 ml de ácido acético glacial.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.4.1 Actividad de la enzima catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios y es responsable de degradar la dismutación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno, evitando así que se creen formas de oxígeno que son muy reactivas (Hansberg, 2002).

La actividad de la catalasa fue influenciada por la aplicación del ácido glutámico foliar en condiciones de estrés hídrico. Esta enzima presentó valores de 403.22 (TI 600 mg L), 393.76 (TII 1200 mg L) y 419.95 (TIII 2000 mg) UI g pf⁻¹ (figura 3). Al comparar los tratamientos con el testigo, encontramos una disminución en plantas con estrés hídrico del 47%. Estudios anteriores en plantas de musgo encontraron una correlación negativa en el aumento de la CAT y el daño producido por estrés hídrico (Chowdhury & Choudhuri 1985). Los resultados coinciden a lo reportado Gabriel *et al.* (2013), en dos cultivares de papa 'Candelerio' y 'Sakampaya', donde la actividad de la enzima catalasa presentó valores por debajo del testigo. Así mismo otros autores (Blasco *et al.* 2008; Gupta

et al., 2015) reportaron fluctuación en la actividad enzimática en respuesta a la aplicación de compuestos exógenos y Domínguez et al. (2012) al estudiar cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L., encontraron que las plantas en condiciones de estrés, presentaron valores más bajos de la actividad de esta enzima y sin encontrar diferencias significativas en la actividad enzimática.

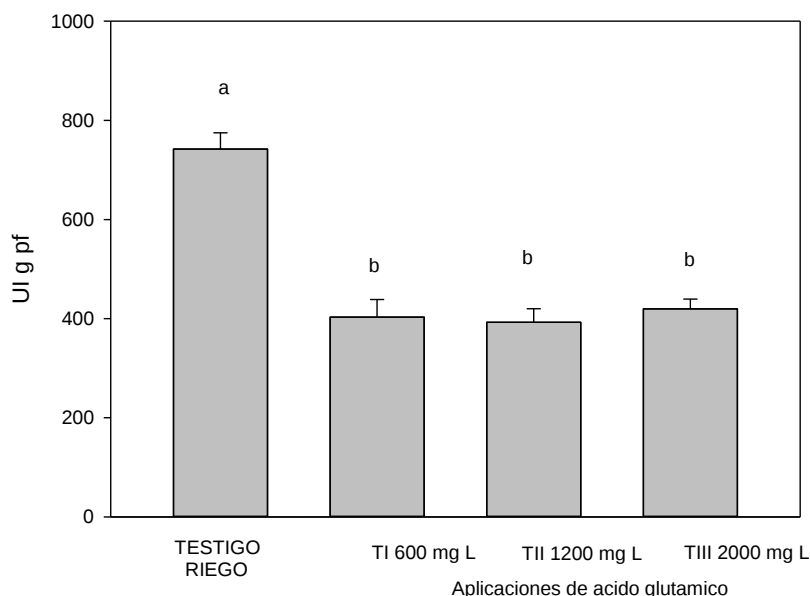


Figura 3. Actividad enzimática de la catalasa en hojas de lima 'Persa' en condiciones de estrés hídrico, bajo aplicaciones de ácido glutámico. Las barras muestran el promedio de 20 muestras por tratamientos y error estándar, las letras indican la significancia (Alpha=0.05).

Por otro lado, Cardona et al. (2014) al estudiar las respuestas fisiológicas y bioquímicas en vainas de frijol, en dos niveles de humedad, encontraron un aumento de 33% en la actividad de la enzima en plantas estresadas. Así mismo, Medrano et al. (2016), al estudiar la aplicación foliar de yodo, no encontraron diferencias significativas en los tratamientos comparados con el testigo.

La amplia variabilidad en los resultados es debido a que el comportamiento de las enzimas está influenciado por factores como el genotipo o cultivar estudiado (Santos et al., 2010). Así mismo, los patrones de actividad en las enzimas antioxidantes bajo estrés oxidativo en algunos casos responden aumentando su

actividad (Munns & Tester, 2008) y en otros casos la respuesta de la catalasa no presenta cambios (Panda & Khan, 2009).

Los resultados obtenidos pueden deberse a que el ácido glutámico juega un papel importante en el ciclo ascorbato-glutation, formando parte estructural del glutatión, siendo el antioxidante no enzimático intracelular más importante (Pompella *et al.*, 2003) reduciendo las concentraciones de radicales libres en las plantas .(Blokhina *et al.*, 2003; Rinalducci *et al.*, 2008). Así mismo, el ácido glutámico es un compuesto que reduce las condiciones de estrés hídrico en la planta y posiblemente esta es la causa por la cual no se expresa la actividad enzimática (Arjona *et al.*, 2004).

4.4.2 Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa

Como se mencionó anteriormente, la planta produce antioxidantes en bajas concentraciones que ayudan a disminuir la oxidación eliminando las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Perl & Perl, 2002). En las plantas el aumento de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) es esencial para disminuir los efectos del estrés oxidativo generado, ya que se producen más radicales libres en condiciones adversas (Shi *et al.*, 2015).

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa fue afectada por las aplicaciones de ácido glutámico y al realizar el análisis estadístico presentaron diferencias estadísticas en comparación con el testigo (Tukey=0.05). El testigo (plantas bien irrigadas) fue el que obtuvo los valores más altos de esta variable presentando un 38% más de actividad que los tratamientos (Figura 4).

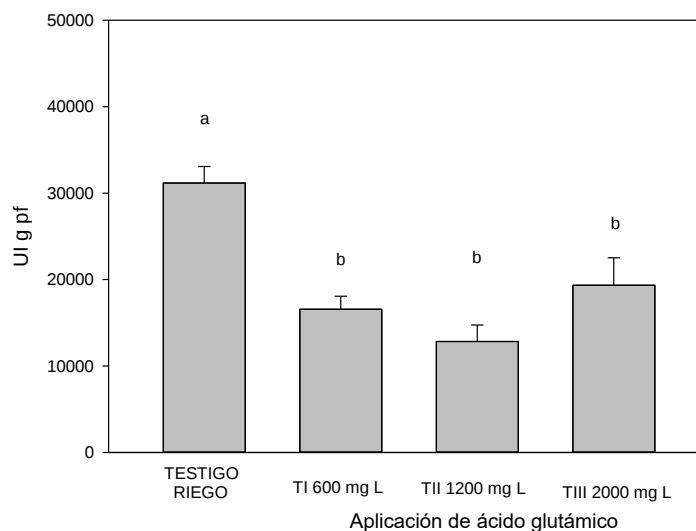


Figura 4. Actividad enzimática de la Ascorbato peroxidasa en hojas de lima ‘Persa’ en condiciones de estrés hídrico y tres aplicaciones foliares de ácido glutámico. Las barras muestran el promedio de los muestreos por tratamientos, error estándar y las letras indican la significancia ($\alpha=0.05$).

Se observó que los tratamientos con estrés hídrico disminuyeron su actividad un 47 (TI), 59 (TII) y 38(TIII) % en comparación con las plantas bien irrigadas. Es evidente que la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en condiciones normales se encuentra controlada. Sin embargo, en condiciones de estrés hídrico se ve afectada la síntesis de esta enzima (Mano, 2002; Sharma *et al.*, 2012).

Los resultados coinciden con lo reportado por Bartoli *et al.* (2005) al evaluar la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en hojas de dos cultivares de trigo “Bug Chambergo y Cooperativa Maipun” en condiciones de estrés hídrico, donde observaron que la actividad de la enzima fue mayor en el testigo, que se encontraba en condiciones bien irrigadas. Así mismo, Ranjita *et al.* (1994), Al evaluar los efectos del déficit hídrico en las actividades de las enzimas captadoras de oxígeno en hojas de trigo, encontraron que la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa disminuyó en condiciones de estrés severo en

comparación con plantas bien irrigadas, resultados similares fueron encontrados en la presente investigación donde se observa una disminución marcada de la APX en condiciones de estrés. Por su parte, Pastori & Trippi. (1993), no encontraron un aumento en la actividad de la APX en plantas sensibles a la sequía.

Con base en lo anterior, es posible que la disminución en la actividad de la enzima en las plantas de lima 'Persa' asperjadas con ácido glutámico en condiciones de estrés hídrico, sea debido a dos factores. Por un lado, a la tolerancia y/o susceptibilidad de la planta a condiciones de baja humedad, como se menciona anteriormente las plantas tolerantes a la escasez de agua han demostrado mayor actividad en enzimas como CAT y APX que plantas que son sensibles (Ruiz *et al.* 1996); esto debido a que las plantas tolerantes presentan mayor capacidad de respuesta al ajuste osmótico y aumento en las actividades de CAT, APX y POX (Coleman, 2008; Gabriel *et al.*, 2013). Es por ello que entre genotipos y/o variedades puede presentarse un componente de respuesta diferencial asociada con la tolerancia o susceptibilidad (Anithakumari *et al.*, 2012; Gabriel *et al.*, 2013).

Por otro lado, la aplicación foliar de ácido glutámico, es positiva para las plantas ya que participa en procesos metabólicos importantes, entre los que se encuentran la asimilación del amonio y procesos de transaminación (Taiz & Zeiger, 2006), interviene en el crecimiento y desarrollo vegetal, particularmente cuando las plantas están sometidas a algún tipo de estrés (Arjona *et al.*, 2004) y al ser aplicado de manera exógena puede formar parte del sistema antioxidante glutatión reductasa, el cual en conjunto con el ascorbato son los reguladores redox celulares enzimáticos más importantes (Smirnoff & Wheeler, 2000; Potters *et al.*, 2002). En condiciones de estrés abiótico se generan compuestos y enzimas que actúan en la defensa celular y sobre expresados en condiciones adversas para la planta, como el estrés hídrico (Wu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010). No obstante la presencia externa de ácido glutámico pudo ver actuado como un compuesto que disminuye las condiciones de estrés en la planta.

4.4.3 Concentración de prolina

En condiciones de estrés hídrico la planta genera compuestos que cumplen una función importante en el ajuste osmótico para proteger a las células (Pinhero *et al.*, 2001). Bajo estas mismas condiciones, hay una sobre expresión de enzimas y aminoácidos como las poliaminas, glicina, betaina, sacarosa, polioles, azúcares alcohólicos, oligosacáridos y la prolina. Esta última es uno de los compuestos más activos en la planta en condiciones de baja humedad en el suelo (Szabados & Saviouré, 2010).

Los muestreos hechos en hojas de lima 'Persa' para determinar la concentración de prolina mostraron que hubo diferencias significativas (tukey=0.05) en los distintos tratamientos. Los valores más altos se presentaron en plantas con riego (testigo) 8890 nm g pf⁻¹ seguido de las plantas del tratamiento II (1200 mg L de ácido glutámico), con valores promedio de 4687 nm g pf⁻¹, y por último los tratamientos I y III con 965.4 y 2357.17 nm de prolina g pf⁻¹ respectivamente (Figura 5). Estos resultados muestran el efecto de la aplicación de ácido glutámico en la producción de prolina en las hojas; mismos que coinciden con lo reportado por Reyes *et al.* (2017), quienes mediante la aplicación foliar de compuestos para estimular el crecimiento encontraron que la acumulación de prolina fue mayor en plantas no estresadas (testigo).

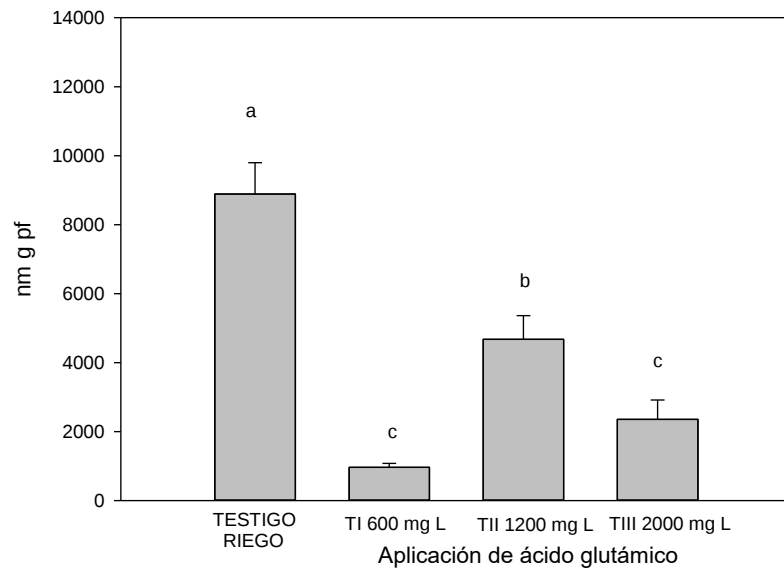


Figura 5. Concentración de prolina en hojas de lima ‘Persa’ en condiciones de estrés hídrico con aplicaciones de ácido glutámico. Las barras muestran el promedio de los muestreos por tratamiento y error estándar, las letras indican la significancia (Alpha=0.05).

No obstante, Herrera *et al.* (2012) al estudiar las respuestas bioquímicas en plántulas de frijol sometidas a condiciones de estrés, encontraron un aumento en la concentración de prolina conforme disminuía la humedad del suelo. Por su parte, Ferreira de Albuquerque *et al.* (2013) al evaluar plantas de *Khaya ivorensis* bajo sequía y su capacidad en recuperar su estado hídrico, mencionan que las plantas en condiciones de estrés aumentaron la concentración de prolina, sin embargo al rehidratar las plantas de nuevo la concentración de prolina no cambio.

Lo anterior indica la alta variabilidad de las plantas al sintetizar la prolina, De la O *et al.* (2011) al estudiar el efecto del estrés hídrico y fertilización nitrogenada en plántulas de nogal, concluyeron que la acumulación de prolina no tuvo variaciones con una tendencia clara. Lo cual puede ser debido a que este aminoácido es afectado por diversos factores externos como: fertilización nitrogenada (De la O *et al.* 2011), micorrizas (Ruiz *et al.* 2012), fertilización con calcio y sales simples (García y Medina, 2009), aplicación de brasinoesteroides (Reyes *et al.* 2017) y la aplicación de compuestos exógenos a la planta.

Por lo tanto, la reducción en los niveles de la prolina se vio afectada por las aplicaciones foliares de ácido glutámico, el cual es un compuesto que inhibe la síntesis de prolina, ya que su producción está relacionada con la inhibición de la formación del ácido glutámico y una menor oxidación (Stewart *et al.* 1997). Además el ácido glutámico es un compuesto que favorece la acumulación de solutos para generar un ajuste osmótico en condiciones de estrés hídrico y asegurar la sobrevivencia de las plantas en estas condiciones, disminuyendo el estrés generado por la falta de humedad.

La prolina juega un papel importante como: osmolito regulador del transporte de iones, desintoxicación de metales pesados y un marcado efecto en la síntesis y la actividad enzimática (Ray, 2002) y además es un compuesto osmoprotector, que sirve como un regulador de radicales libres de oxígeno, protegiendo a las membranas de la deshidratación y a las macromoléculas de la desnaturalización (Nakamura *et al.* 2001; Vendruscolo *et al.* 2007). Misma función que cumple el ácido glutámico al ser parte fundamental en la síntesis del glutatión en el ciclo Ascorbato-Glutatión, el cual es conocido como el antioxidante enzimático más importante intracelular (Pompella *et al.* 2003). Por lo tanto, la aplicación foliar de ácido glutámico en lima 'Persa' no solo inhibió la síntesis de prolina, además ayudo a reducir el estrés en la planta de tal manera que no fue necesaria la producción de este aminoácido. Es conveniente dar continuidad a esta investigación, profundizando los efectos del ácido glutámico en plantas bajo condiciones de estrés hídrico.

4.5 CONCLUSIONES

Los tratamientos de ácido glutámico en hojas de lima 'Persa' en condiciones de estrés hídrico afectaron la concentración de prolina y la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa y la catalasa.

La catalasa presentó una disminución en su actividad en las plantas de los tres tratamientos comparados con el testigo y entre tratamientos los valores promedio no presentaron diferencia significativa. La actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa presentó una tendencia similar, en el testigo con plantas bien irrigadas fue donde se encontraron los valores más altos seguido de los tratamientos donde se aplicó ácido glutámico. La prolina presentó diferencias en plantas de dos tratamientos al ser comparados con el testigo. El tratamiento con plantas bien irrigadas fue en el que se encontró mayor concentración de prolina.

4.6 LITERATURA CITADA

- Anithakumari, A. M., Nataraja, K. N., Visser, R. G. F. y Van der Linden, C. G. (2012). Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*. 30(3), 1413-1429, doi: [10.1007/s11032-012-9728-5](https://doi.org/10.1007/s11032-012-9728-5)
- Argentel, L. L. & González, L. M. (2010). Contenidos de prolina, glicina betaína y proteínas solubles totales en variedades de trigo en condiciones de estrés salino. *Cultivos Tropicales*. 31(4) 82-86.
- Arjona H. D.; Herrera J. E.; Gómez J. A.; J. Ospina. (2004). Evaluation of the application of urea, molasses and amino acids on growth and yield of onion plants (*Allium cepa* L. Group *cepa*) in the Bogotá Savanna. *Agronomía Colombiana*. 22 (2): 177–184.
- Barry G.H, Castle W.S & Davies F.S. (2004). Rootstocks and plant water relations affect sugar accumulation of citrus fruit via osmotic adjustment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 129: 881-889.
- Bartoli G. C., Guamet, J. J.; Kiddle, G.; Pastori, G. M.; Di Cagno, R.; Theodoulou, F. L & Foyer C. H. (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determinate by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant Cell Cell and Environment* 28, 1073–1081
- Bates, L.; Waldren, R. & Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39:205-207.
- Blackwell, R. D.; Murray, A. J. S. & Lea, P. J. (1990). Enzymes of photorespiratory carbon pathway. *In*: *Methods in Plant Biochemistry*. P. J. Lea (ed). Academic Press. USA. pp. 129–144.
- Blasco, B., Ríos, J. J., Cervilla, L. M., Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2008). Lodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: Potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology*, 152(3), 289-299. doi:10.1111/j.1744-7348.2008.00217.
- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194.
- Cardona A. C.; Jarma O., A.; Araméndiz T. H.; Peña A. M. y Vergara C. C. (2014). Physiological and biochemical responses of the cowpea bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.) under a water deficit. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 8(2) 250-261
- Chen F., Wang F., Wu F., Mao W., Zhang G., Zhou M. (2010). Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against stress in the two barley genotypes differing in tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 663-672.
- Chowdhury R. S. & Choudhuri M. A. (1985). Metabolismo del peróxido de hidrógeno como índice de tolerancia al estrés hídrico en yute. *Physiol Plant* 65: 476–480

- Coleman, W. K. (2008). Evaluation of wild *Solanum* species for drought resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 62(3)221-230. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.08.007>
- Cushman, J. C. (2001). Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *Amer. Zool.* 41, 758-769.
- Domínguez, A., Mita, N., Alemán, S., Pérez, Y., Sosa M. & Fuente, L. (2012). Algunos indicadores morfológicos y bioquímicos de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L., bajo condiciones de sequía. *Revista Avanzada Científica*, 15 (2), 1-18.
- Ferreira de Albuquerque M. P., Cabral M., Nunes S. N. I, Salgado de Castro G. L., Soares R. & Alves P. H. A. (2013). Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a deficit hídrico e reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48(1), 9-1
- Gabriel, J. S., Veramendi, A & Magne J (2013). Respuesta de cultivares nativos de papa (*Solanum tuberosum* L.) al estrés hídrico por sequía. *Revista Latinoamericana de la papa*, Vol 17(2)1-18.
- García M, & Medina E. (2009). Acumulación de iones y solutos orgánicos en dos genotipos de caña de azúcar, estresados con sales simples o suplementadas con calcio. *Bioagro* 21:3–14.
- García S. F., Carvajal M., Porras I., Botía P., & Martínez V. (2003). Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon. *Europ J. Agronomy*. 19: 427-437
- Gupta, N., Shukla B. M., Singh M. R., & Mishra, P. K. (2015). Response of iodine on antioxidant levels of *Glycine max* L. grown under Cd²⁺ stress. *Advances in Biological Research*, 9(1), 40-48. doi: 10.5829/idosi.abr.2015.9.1.9183
- Hansberg, T. W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico* 26, 19-54.
- Herrera F. T. S., Ortiz C. J., Delgado A. A. & Acosta G. J. A (2012). Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(4), 713-725.
- Hockema, B. R., & Etxeberria E. (2001). Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 126: 599–605. Doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.5.599>
- Hong, C.; Hsu, Y. T.; Tsai, Y. H. & Kao, C. H. (2007). Expression of ascorbate peroxidase 8 in root of rice (*Oryza sativa* L.) seedling in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 58: 3273-3283
- Mano, J. (2002). Early events in environmental stresses in plants induction mechanisms of oxidative stress. Page 217-246 in *Oxidative stress in plants*, UK.
- Medrano M. J., Lejía M. P., Juárez M., Rocha E. A., Benavides M. (2016). Effect of iodine application on antioxidants in tomato seedlings. *Revista Chapingo serie horticultura*. 22(2), 133-143. doi: 10.5154/r.rchsh.2015.12.025
- Miller, G.; Suzuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2009) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Munns, R., & Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.

- Nakamura, T., Nomura, H. M., Mori, A.T. Jagendroff, A. Ueda & Takabe T. (2001). An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 42, 1088-1092.
- Nakano, Y. & Asada, K.(1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant and Cell Physiology.* 22 (5) 867 -8.
- Navarro J. M., Pérez P. J. G., Pascual R. B. (2010). Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chemistry*, 119:1591-159.
- Núñez V. M., Amico R. J. D, Pèrez H. M. C. & Betancourt G. (2017). Estrés hídrico y salino en cítricos estrategias para la reducción de daños. *Revisión bibliográfica. Cultivos tropicales* 38 (4): 65-74.
- Ortuño M. F., Alarcón J.J., Nicolás E., Torrecilla A. (2004). Interpreting trunk diameter changes in young lemon trees under deficit irrigation *Plant Science*; 167: 275-280
- Panda, S. K., Khan M. H. (2009). Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiate* L.) under short-term salinity stress and its recovery. *J. Agron. Crop Sci.* 195: 442–454.
- Pastori G., M. & Trippi V. S. (1993). Antioxidative protection in a drought-resistant maize strain during leaf senescence. *Physiologia Plantarum.* 87(2): 227-231.
- Pereyra C. M., & Quiriban A. (2014). Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en las plantas. *Revista de la facultad de agronomía UNLPam.* Vol. 24(1):55-67
- Pérez P. J. G., Romero P., Navarro J. M. y Botia, P. (2008). Response of sweet orange cv 'Lane late' to déficit irrigation in two rootstocks. I: Water relations, leaf gas Exchange and vegetative growth, *Irrigation Science.* 26 (5): 415-425.
- Perl T. y Perl, A.(2002). *Oxidative Stress: An introduction* in Inzé, D. and Van Montagu M. *Oxidative stress in plants.* London: Taylor & Francis, 1-32.
- Pinhero, R. G., Rao M.V., Palyath G., Murr D. P.& Fletcher R. A. (2001). Changes in the activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.* 114, 695-704.
- Pirasteh, H., Emam, A. Y., Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2012). Exogenous Application of Salicylic Acid and Chlormequat Chloride Alleviates Negative Effects of Drought Stress in Wheat. *Advanced Studies in Biology*, Vol. 4 11, 501-520
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist». *Biochem Pharmacol.* 66 (8): 1499-503. PMID 14555227. doi:10.1016/S0006-2952(03)00504-5.
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 537-548.
- De la O-Quezada G. A, Ojeda B. D. L., Hernandez R. O. A., Sanchez C. E. & J. Martínez T. (2011). Biomass, proline and nitrogenous parameters in pecan seedlings under water stress and nitrogen fertilization. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17, 13-18.
- Quiñones A., Martínez, A. B. y Legaz, F. (2007). Influence of irrigation system and fertilization management on seasonal distribution of N in the soil profile and on N-uptake by citrus trees. *Agriculture: Ecosystems and Environment*, 122: 399-409.

- Ranjita B., Dharanidhar R., Patel B.B A., & Manoranjan K. (1994). Alteraciones en las actividades de las enzimas de captación de oxígeno activo de las hojas de trigo sometidas a estrés hídrico. *Fisiología vegetal y celular*. 35(3)489-495, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078620>
- Ray V, (2002). Role of amino acids in plants responses to stresses. *Biol. Plant*. 45(4), 481-487.
- Reyes G. Y., Martínez G. L. & Núñez V. (2017). Aspersión foliar con biobras-16 estimula el crecimiento de plantas jóvenes de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a tratamiento con NaCl. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 155-166.
- Rinalducci, S., Murgiano, L. & Zolla, L. (2008). Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 59, 3781-3801.
- Ruiz S. M., Polón P. R., Vázquez Del Llano B., Muñoz H. Y., Cuéllar O. N. & Ruiz L. J. M. (2012). La simbiosis micorrizica arbuscular en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés hídrico: Parte I. Mejora la respuesta fisiológica. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 47-52.
- Ruiz L. J. M., Azcon B. & Palma J. (1996). Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist*. 134: 327-333.
- SAGARPA (2017). Planeación Agrícola 2016-2030, Citricos Limon Naranja Y Toronja COMTRADE,
- Sandoval, R. A, & Kamara, A. (2002). Un enfoque práctico comercial para lograr el aumento fenotípico en la resistencia al estrés oxidativo y otros tipos de estrés oxidativo y otros tipos de estrés. Pp. 158-171.
- Santos, C. F., Lima G.P. P & Morgado L. B. (2010). Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na préfloração. *Naturalia* 33, 34-44
- SAS Institute. (2003). SAS/STAT User's Guide: GLM VARCOMP. Version 9.1. Fourth ed. Cary, NC, USA. 996 p.
- Sharma, P.; Bhushan; A. Shanker; R. Pessarakli. M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-12.
- Shi H., Jiang C., Ye T., Tan D. X., Reiter R. J., Zhang H. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *J. Exp. Bot.* 66
- SIAP, (2018). Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera. Atlas agroalimentario 2018. primera edicion.
- Sigmaplot of Jandel Scientific. (2001). User's guide. Flying Raichu von. Version 7.1 SPSS Science Inc. 435 p.
- Smirnoff N y Wheeler GL. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 291-314.
- Stewart, C. R., Boggess S. F., Aspinall D. & Paleg L. G. (1977). Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiology*. 59: 930-932.
- Szabados, L. & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, v.15, p.89-97. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009

- Taiz L, & Zeiger E. (2006). Plant physiology. 4th ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates. 764 p.
- Tripathy, B.C. & R. Oelmüller.(2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behavior* 7(12), 1621-1633 Doi: 10.4161/psb.22455
- Vendruscolo, E. C. G. Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C.; Marur, C. J. & Vieira, L. G. E.(2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*. 164, (10) :1367-1376.
- Wu F. B, Chen F, Wei K, Zhang GP. (2004). Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 57, 447-454.
- Nakano, Y. & Asada, K.(1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22 (5)867-880.

CAPITULO V

CONCLUSIONES GENERALES

La absorción del ácido glutámico fue por la cutícula, pasando por las capas de ceras epicuticulares y en el envés se observó cómo se extendió por el parénquima esponjoso. En el caso de la arginina a los 60 minutos se encontraba en la cutícula y a los 120 minutos en células de epidermis para posteriormente encontrarse en los tejidos de conducción (180 min). El ácido aspártico a diferencia de los otros aminoácidos evaluados presentó una ruta de absorción diferente. A los 120 minutos se encontró en la cutícula y a los 180 minutos entrando a la hoja por los estomas.

Velocidad de absorción

Los aminoácidos, aplicados vía foliar fue estadísticamente diferente. El ácido glutámico fue el que alcanzó la mayor velocidad, seguido de la arginina y por último el ácido aspártico. Así mismo, los colorantes utilizados para rastrear la ruta de absorción se comportaron de manera diferente con cada uno de los aminoácidos.

Los tratamientos de ácido glutámico en hojas de lima 'Persa' en condiciones de estrés hídrico afectaron la concentración de prolina y la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa y la catalasa.

Así mismo, los colorantes utilizados para rastrear la ruta de absorción se comportaron de manera diferente con cada uno de los aminoácidos, en la solución con calcofluor la velocidad más rápida fue con el ácido glutámico, para el caso de la safranina, naranja G y rodamina la combinación con ácido aspártico obtuvo la mayor velocidad. La arginina obtuvo los valores promedio en la solución de safranina y naranja G.

La catalasa presentó una disminución del 47% en la actividad en las plantas de los tres tratamientos comparados con el testigo y entre tratamientos los valores

promedio no presentaron diferencia significativa. La actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa presentó una tendencia similar 57% de disminución en comparación con el testigo que fue donde se encontraron los valores más altos seguido. La prolina presentó diferencias en plantas de dos tratamientos al ser comparados con el testigo. El tratamiento con plantas bien irrigadas fue el que obtuvo mayor concentración de prolina.