

CARACTERIZACIÓN ESTOMÁTICA DE CINCO ESPECIES DEL GÉNERO *Vanilla*¹

*Delfino Reyes-López*², *Jonathan Quiroz-Valentín*², *Henry Arturo Kelso-Bucio*³, *Manuel Huerta-Lara*⁴,
*Carlos Hugo Avendaño-Arrazate*⁵, *Ricardo Lobato-Ortiz*⁶

RESUMEN

Caracterización estomática de cinco especies del género *Vanilla*. El objetivo de este estudio fue caracterizar los estomas de cinco especies de vainilla. Durante el año 2012 se tomaron muestras de hoja de *Vanilla planifolia* G. Jackson, *V. pompona* Schiede, *V. inodora* Schiede, *V. insignis* Ames y *V. odorata* Presl, del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se obtuvo el tamaño de estomas al considerar el largo y ancho de estos, índice y número estomático de la parte abaxial y adaxial de la hoja, en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. *V. pompona* Schiede y *V. inodora* Schiede presentaron mayor índice estomático con 8713 y 8246 estomas por mm², respectivamente, seguido por *V. odorata* Presl con 4412 estomas por mm². *V. insignis* Ames y *V. planifolia* G. Jackson tuvieron el menor índice estomático con 2968 y 1378 estomas por mm², respectivamente, en la superficie abaxial de la hoja, diferencias que fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Por la posición de los estomas en la hoja, *V. planifolia* G. Jackson y *V. pompona* Schiede se pueden considerar hipoestomáticas por presentar estomas solamente en la parte abaxial de la hoja. *V. insignis* Ames, *V. inodora* Schiede y *V. odorata* Presl se pueden considerar anfiestomáticas por presentar estomas en la parte abaxial y adaxial de la hoja. *V. inodora* Schiede presentó estomas más pequeños en comparación con las demás especies, característica importante para ser integrada en el mejoramiento genético del género *Vanilla*, al considerar el cambio climático, donde el aumento de temperatura y disminución de la precipitación requieren de genotipos con mayor eficiencia en el uso de agua.

Palabras clave: epiestomáticos, hipoestomáticos, anfiestomáticos, estomas.

ABSTRACT

Stomatal characterization of five species of the genus *Vanilla*. The objective was to characterize the stomata of five species of vanilla. Throughout 2012, leaf samples of *V. planifolia* G. Jackson, *V. pompona* Schiede, *V. inodora* Schiede, *V. insignis* Ames and *V. odorata* Presl were taken from the vanilla germplasm bank at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. The stomata size was obtained considering their length and width, as well as the index and stomata number of the abaxial and adaxial leaf surfaces in a randomized complete block design with three replications. *V. pompona* Schiede and *V. inodora* Schiede showed the highest stomatal index with 8713 and 8246 stomata per mm², respectively, followed by *V. odorata* Presl with 4412 stomata per mm². *V. insignis* Ames and *V. planifolia* G. Jackson showed the lowest stomata index with 2968 and 1378 stomata per mm², respectively, in the abaxial leaf surface, these differences were statistically significant ($P \leq 0.05$). According to the position of the leaf stomata, *V. planifolia* G. Jackson and *V. inodora* Schiede can be considered to be hypostomatics since they showed stomata only in the abaxial leaf surface. *V. insignis* Ames, *V. inodora* Schiede and *V. odorata* Presl can be considered to be anfiestomatic because they showed stomata in both the abaxial and adaxial leaf surfaces. *V. inodora* Schiede had smaller stomata compared with the other species. That is an important feature to be included in the genetic improvement of the genus *Vanilla*, because due to climate change, temperature will increase and precipitation will decrease, so Vanilla will require more efficient genotypes for water use.

Keywords: epiestomatic, hipoestomatic, anfiestomatic, stomatas.

¹ Recibido: 14 octubre, 2014. Aceptado: 17 de febrero, 2015. Este trabajo es el resultado del proyecto de investigación "Rescate, caracterización, conservación y uso sustentable de la vainilla en México", ejecutado por la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y financiado por el Sistema Nacional de los Recursos Fitogenéticos.

² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Agrohidráulica. Dom. Con. San Juan Acateno, Teziutlán Puebla, México. delfino_reyes2001@yahoo.com.mx, jonathan_nike_1@hotmail.com

³ Productos Agropecuarios KEBU, S.A. San Félix, Chiriquí, Panamá. arturokb@yahoo.com.mx

⁴ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Departamento Universitario para el Desarrollo Sustentable. batprofessor@hotmail.com

⁵ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) - Campo Experimental Rosario Izapa. avendano.carlos@inifap.gob.mx

⁶ Colegio de Postgraduados, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Genética. Campus Montecillo. Km.36.5 carr. México- Texcoco. 56230, Motecillo, Texcoco, Edo. México, México. rlobato@colpos.mx



INTRODUCCIÓN

En el proceso de la transpiración, las plantas fijan CO₂ proveniente de la atmósfera y a la vez existe pérdida de agua, en dicho intercambio se determina el uso eficiente de agua en las plantas, que dependerá en primer lugar de las características propias de la especie y variedad que tengan relación con la capacidad de optimización de los procesos de asimilación de carbono y evapotranspiración de agua; y en segundo lugar de las condiciones ambientales donde crece y se desarrolla la planta (Medrano et al., 2007).

Los estomas son importantes en la fisiología de las plantas, debido a que son responsables del intercambio de gases entre la atmósfera y la hoja y con ello evitan la excesiva pérdida de agua (Weeb y Baker, 2002; Fan et al., 2004). Estos también desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la planta, de ahí la importancia de conocer el número, forma y factores que controlan su apertura o cierre (Sánchez y Aguirreola, 1996).

La cantidad de estomas en la superficie adaxial (haz) en comparación con la abaxial (envés) es característica distintiva de diferentes especies. Las plantas con estomas en el haz son llamadas epiestomáticas, las que tienen en el envés son hipoestomáticas y aquellas con estomas en el haz y envés son anfiestomáticas (Gates, 1980; Larkin et al., 1996; Serna et al., 2002; Azcon-Bieto y Talón, 2008). Las anfiestomáticas es común encontrarlas en ambientes áridos, y hojas con estomas solo en el envés es más común encontrarlas en plantas de hábitats mesofíticos (Parkhurst, 1978), por otro lado es común encontrar hojas con estomas solo en la superficie adaxial en plantas acuáticas como el lirio de agua (Lawson, 2009).

Son diversos los factores que controlan la apertura y cierre de los estomas: la concentración de CO₂ en el interior de las hojas, humedad atmosférica, potencial hídrico de la hoja, temperatura y viento (Tibbitts, 1979; Comstock y Mecuccini, 1998; Cochard et al., 2002). En este sentido, Long et al. (1994) y Smirnoff (1993), mencionan que en las regiones de clima mediterráneo las diferentes especies se enfrentan de forma distinta a la falta de agua estival y adoptan estrategias fisiológicas (cierre de estomas), morfo-anatómicas (enrollamiento foliar, cambios en la reflexión, paraheliotropismo) o bioquímicas (Reacción de Mehler, ciclo Asada-Hallivell, fotorespiración).

Las plantas pueden ser evitadoras o tolerantes en condiciones de sequía, las evitadoras previenen el daño por déficit hídrico mediante un rápido cierre de estomas, evitando así cambios en el potencial hídrico de la planta pero limitando la asimilación de carbono. Las plantas tolerantes reducen la pérdida de agua manteniendo cierta asimilación de carbono y su potencial hídrico se reduce durante horas de luz y se recupera por la noche (Kramer, 1983; Jones, 1987).

El número de estomas en las diferentes especies vegetales es variable. Esau (1977) establece un rango de 100 a 300 estomas/mm² en angiospermas. Schoch et al. (1980), Cañizares et al. (2003), Pares et al. (2004), han encontrado en varias especies de cítricos y *Annona*, que el número de estomas varía en la superficie de la lámina con respecto al patrón o porta injerto utilizado.

La heterosis y nivel de ploidia en cítricos tienden a disminuir la frecuencia estomática e incrementar el tamaño de estomas (Costa et al., 2004). En razas y cultivares de aguacatero se ha encontrado que la densidad estomática puede variar de 100 a 610 estomas por mm². Barrientos-Priego (2003) encontraron que en la hoja once se detectó mayor densidad estomática en tres razas de aguacatero. Barrientos-Pérez y Sánchez-Colín (1983) proponen hacer preselección de genotipos en estado de plántulas de este cultivo con base en la densidad estomática. El número y densidad estomática es afectada por la salinidad en especies como *Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum* Mill, *Carica papaya* L. (Bethke y Drew, 1992; Salas et al., 2001; Pares et al., 2008).

El género *Vanilla* comprende más de 110 especies que se desarrollan en las áreas tropicales del mundo (Cameron y Chase, 1999; Soto-Arenas, 2003; Soto-Arenas y Cribb, 2010). *V. planifolia* G. Jackson es la especie más importante por sus características aromáticas y demanda en la industria alimentaria, debido a que el 95% de la producción mundial proviene de esta especie (Bory et al., 2008).

En México se cuenta con la declaración de denominación de origen vainilla de Papantla delimitado en la región Totonaca por un territorio de aproximadamente 7751 km², compartido por 39 municipios de los estados de Veracruz y Puebla (IMPI, 2009; SE, 2010). El cultivo de la vainilla en México presenta diversos problemas como la presencia de plagas y enfermedades, bajos precios del producto en

verde, así como insostenibilidad financiera, pérdida de conocimiento ancestral en el manejo diversificado de las selvas y acahuales (Hipólito, 2011).

Reyes et al. (2013), al realizar un diagnóstico de las anomalías de la temperatura y precipitación en la década de 1999 a 2009 con datos de 31 estaciones climatológicas ubicadas en la zona del Totonacapan, encontraron aumentos en la temperatura entre 1 a 2 °C y disminución de la precipitación de 30%, condiciones poco favorables para el cultivo de la vainilla en la franja costera de Veracruz y Puebla. Goyal (2004) menciona que los cambios de patrones climáticos afectan el desarrollo y los procesos fisiológicos de los cultivos. Ante esta situación es necesario conocer aspectos básicos de su biología, como es el caso de las características de los estomas que son importantes en el intercambio gaseoso, fotosíntesis y uso eficiente del agua (Cowan, 1977; Hinckley et al., 1980; Farquhar y Sharkey, 1982; MacDowell et al., 2008; Kim et al., 2010) para posteriormente generar recomendaciones técnicas que ayuden a mejorar su manejo sostenible.

Son escasos los trabajos realizados con estomas en el género *Vanilla*. Bory et al. (2008), trabajaron en la diversificación de *Vanilla planifolia* G. Jackson (Orchidaceae) en Isla Reunión, donde clasificaron a los estomas según su tamaño. En México donde se considera centro de origen de *V. planifolia* G. Jackson no se reportan trabajos relacionados con estomas.

Es por lo anterior, que se planteó como objetivo del presente trabajo caracterizar los estomas en cinco especies del género *Vanilla*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó durante el año 2012, con material biológico del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicado en el municipio de Tenampulco, localizado en la parte noroeste del estado de Puebla. Sus coordenadas son el paralelo 20° 11' 49,9" de latitud norte y el meridiano 97° 22' 4,8" de longitud oeste, a una altura de 224 msnm.

Se utilizaron cinco accesiones del banco de germoplasma de vainilla correspondientes a las especies *planifolia* G. Jackson, *pompona* Schiede, *insignis* Ames, *inodora* Schiede y *odorata* Presl (Cuadro 1), las cuales se desarrollaron vegetativamente en condiciones similares de humedad de suelo, nutrición, cantidad de sombra, y manejo agronómico.

Se tomaron tres hojas maduras por planta de cada especie, se envolvieron en papel estraza húmedo, posteriormente fueron colocadas en bolsas de plástico y se trasladaron en una caja térmica al laboratorio para su análisis estomático. Para la observación y conteo estomático se utilizó el protocolo general para la preparación de tejidos comúnmente usado en laboratorio para microscopía electrónica (Bozzola y Russell, 1992), que consistió en obtener cortes de fragmentos de hoja menores a 5 mm², los tejidos se fijaron en glutaraldehído al 2,5% y en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0,1 M, con un pH 7,2 durante doce horas, luego se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con amortiguador de fosfatos Sorensen's.

Cuadro 1. Especies del género *Vanilla* utilizado para su caracterización estomática. Teziutlán Puebla, México. 2012.

Table 1. Species of the genus *Vanilla* used for the their stomatal characterization. Teziutlán Puebla, Mexico. 2012.

Especie	Accesión	Procedencia	Altura (msnm)
<i>V. planifolia</i> G. Jackson	35	La Palapa, Tenampulco Puebla	120
<i>V. pompona</i> Schiede	119	Arroyo Blanco, San José Acateno, Puebla	311
<i>V. insignis</i> Ames	77	Rancho Grande, Tuxtepec Oaxaca	850
<i>V. inodora</i> Schiede	31	Salsipuedes, Tenampulco, Puebla	204
<i>V. odorata</i> Presl	3	Ejido La Victoria, Marqués de Comillas, Chiapas	172

msnm: metros sobre el nivel del mar / masl: meters above sea level.

La deshidratación se realizó poniendo las muestras durante una hora en etanol a diferente concentración: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%. Las muestras se colocaron en Xileno (solvente) durante 48 horas en una estufa a 40 °C. Posteriormente, se colocaron en alcohol absoluto tres veces por espacio de una hora cada cambio, luego las muestras se colocaron en una secadora de punto crítico (Samdri-780A), y se orientaron sobre un portamuestras usando una cinta doble adhesiva de carbón. Luego se recubrieron con oro durante cuatro minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat). Finalmente, las muestras se observaron y se fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6390) operando a 15 Kv (Bozzola y Russell, 1992), considerando la parte abaxial y adaxial de la hoja.

Se contó el número de estomas y de células epidérmicas por campo de observación. El índice estomático (IE) se obtuvo con la fórmula sugerida por Wilkinson (1979):

$$IE = (NE * 100) / (CE + NE)$$

IE= Índice estomático.

NE= Número de estomas por campo de observación.
CE= Número de células epidérmicas en campo de observación.

Se midió el largo (LE) y ancho (AE) de los estomas en un analizador de imágenes motic images plus 2.0 ML. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posición de los estomas en las hojas

La posición de los estomas en las láminas foliares fue variable en las cinco especies estudiadas. En *V. planifolia* G. Jackson y *V. pompona* Schiede, especies cultivadas y comercializadas por sus cualidades aromáticas, se encontraron estomas únicamente en la parte abaxial (envés) de la hoja (Figura 1); mientras que *V. inodora* Schiede, *V. odorata* Presl y *V. insignis* Ames presentaron estomas en la parte abaxial (envés) y adaxial (haz) de la hoja.

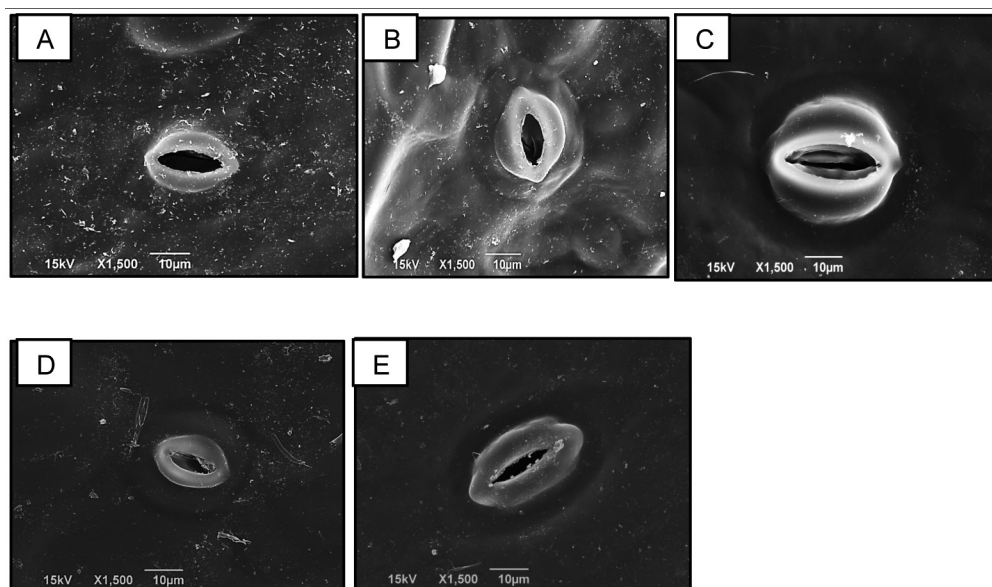


Figura 1. Estomas en la parte abaxial de la hoja. A: *V. planifolia* G. Jackson, B: *V. pompona* Schiede, C: *V. insignis* Ames, D: *V. inodora* Schiede, E: *V. odorata* Presl. Teziutlán Puebla, México. 2012.

Figure 1. Stomata on the abaxial part of the leaf. A: *V. planifolia* G. Jackson, B: *V. pompona* Schiede, C: *V. insignis* Ames, D: *V. inodora* Schiede, E: *V. odorata* Presl. Teziutlán Puebla, Mexico. 2012.

De acuerdo con la distribución de los estomas en la hoja de *V. planifolia* G. Jackson y *V. pompona* Schiede, se clasificarían como hipoestomáticas y *V. insignis* Ames, *V. inodora* Schiede y *V. odorata* Presl como anfiestomáticas. Estas diferencias encontradas pueden ser características distintivas de cada especie (Gates, 1980). Larking et al. (1996), Serna et al. (2002) mencionan que la diferenciación de las características de la distribución de estomas en las especies anfiestomáticas o hipoestomáticas es el último aspecto del desarrollo de la hoja. Por otro lado Mott y O'Leary (1984) señalan que la característica adaxial en las especies puede ser debido a que evolucionaron bajo condiciones sin restricciones de humedad. Camargo (2009) sugiere que el carácter hipoestomático es considerado como un rasgo primitivo en las plantas. Una ventaja de la distribución de estomas en ambos lados de la superficie de la hoja es el doble de la conductancia en la capa límite, por lo tanto, las hojas anfiestomáticas podrían ser ventajosas en ambientes cuando la tasa fotosintética podría ser potencialmente limitada por baja conductancia de hoja, como puede ser el caso de hojas expuestas a alta irradiación (Branco y Marengo, 2012).

La distribución de los estomas en la lámina foliar es variable y depende de la especie, Sánchez y Aguirreola (1996) consideran que es más frecuente encontrar los estomas en la parte abaxial de las hojas. Algunas orquídeas como *Laelia eyermaniana* RCHB.f. son consideradas como anfiestomáticas por presentar estomas en ambas regiones laminares (Francisco et al., 2011). Sin embargo, otras como *Maxillaria miniata* y *Pleurothallis cardiantha* sus hojas son hipoestomáticas con escasos tricomas glandulosos y estomas de tipo anomocítico (Ely et al., 2007). Las hojas de tomate son consideradas como anfiestomáticas. Sin embargo, en condiciones de salinidad produce un descenso en el número de estomas en la parte adaxial y un ligero aumento en la parte abaxial (Salas et al., 2001).

Índice y número estomático

El índice y número estomático para las especies hipoestomáticas y anfiestomáticas fueron estadísticamente diferentes tanto para el haz como el envés de la lámina foliar (Cuadro 2). Fueron *V. pompona* Schiede y *V. inodora* Schiede las que presentaron el mayor índice estomático en la parte

abaxial con 8,717 y 8,252, respectivamente seguido por *V. odorata* Presl con 4,419 y *V. insignis* Ames con 2,972. La especie *V. planifolia* G. Jackson fue la que presentó el menor índice estomático con 1,462. En la parte adaxial, el índice estomático para las especies anfiestomáticas resultaron con valores bajos que variaron de 0,239 a 0,66. En hojas anfiestomáticas, la frecuencia estomática es usualmente más grande en la parte abaxial que en la superficie adaxial (Voleniková y Tichá, 2001; Tari, 2003). El índice estomático es una función total de la radiación recibida y de las variaciones que se experimentan durante los días precedentes a la diferenciación de los estomas de la hoja (Schoch et al., 1980). En la mayoría de los casos la densidad estomática es más grande en la superficie abaxial de la hoja, la cual puede prevenir la pérdida de agua por estar menos expuesta al calentamiento (Martín y Glover, 2007). Sin embargo, esta puede variar en hojas de plantas de la misma especie, por variación de genotipos, CO₂ atmosférico, humedad, intensidad y calidad de la luz y radiación solar (Kakami et al., 2003). El aumento de la densidad estomática en algunos cultivos como el tomate, chícharo y algodón es debido a la domesticación (Cornish et al., 1991; Kebede et al., 1994).

El índice estomático se afecta en porta injertos de frutales como lima-persa injertadas en *Citrangue carrizo* (Cañizares et al., 2003), naranjo valencia injertado en porta injertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (Arrieta-Ramos et al., 2010). También puede ser afectado por la salinidad, Pares et al. (2008) encontraron en plantas de *Carica papaya*, una disminución del índice estomático cuando fueron sometidas a cuatro concentraciones de salinidad, resultados similares encontraron Salas et al. (2001) en plantas de tomate sometidas a tratamientos salinos.

El número estomático también fue variable para la parte abaxial y adaxial de la lámina foliar, siendo *V. inodora* Schiede la que presentó el mayor número de estomas en la parte abaxial con 24,590 estomas por mm² seguido por *V. odorata* Presl y *V. pompona* Schiede con 14,973 y 11.913 estomas por mm², respectivamente. *V. planifolia* G. Jackson y *V. insignis* Schiede presentaron las menores cantidades de estomas por mm² con 10.984 y 10 546, respectivamente. En la parte adaxial de la hoja se registraron bajas cantidades de estomas en *V. inodora* Schiede, *V. insignis* Ames y *V. odorata* Presl, los cuales variaron de 3278 a 0,4 estomas por

Cuadro 2. Índice y caracterización estomática en cinco especies del género *Vanilla*. Teziutlán Puebla, México. 2012.
Table 2. Index and stomatal characterization of five species of the genus *Vanilla*. Teziutlán Puebla, Mexico. 2012.

Especie	IEH	IEE	NEE	NEH	LEH	LEE	AEH	AEE
<i>planifolia</i> G. Jackson	0,0 b	1,462 d	10,984 c	0,0 b	0,0 d	41,864 b	0,0 c	31,682 ab
<i>pompona</i> Schiede	0,0 b	8,717 a	11,913 b	0,0 b	0,0 b	52,393 a	0,0 c	33,019 ab
<i>insignis</i> Ames	0,666 a	2,972 c	10,546 c	3,278 a	42,238 a	56,041 a	33,829 a	38,665 a
<i>inodora</i>	0,223 ab	8,252 a	24,590 a	0,4 b	8,609 b	38,219 b	7,079 c	26,529 b
<i>odorata</i>	0,239 ab	4,419 b	14,973 b	1,147 ab	28,474 a	51,022 a	21,856 b	33,250 ab
CV	214,88	27,249	23,343	231,585	85,944	18,014	85,522	21,150
DMS	0,497	1,442	3,493	2,283	13,975	8,845	11,004	7,073

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey $\leq 0,05$) / Means with equal letters are not statistically different (Tukey $\leq 0,05$).

IEH= índice estomático por haz (mm²). IEE= índice estomático por envés (mm²). NEE= Número de estomas por el envés. NEH = Número de estomas por el haz. LEH= longitud del estoma por haz (μ m). LEE= longitud del estoma por envés (μ m). AEH= Ancho de estoma por el haz (μ m). AEE= Ancho de estoma por el envés (μ m). CV= Coeficiente de variación, DMS = Diferencia mínima significativa / IEH = Stomatal index on the adaxial leaf surface (mm²). IEE = Stomatal index on the abaxial leaf surface (mm²). NEE= Number of stomata on the underside of leaf. NEH = Number of stomata on the upper side of leaf. LEH = Stomata length on the upper side of leaf (μ m). LEE = Stomata length on the underside of leaf (μ m). AEH = Stomata width on the upper side of leaf (μ m). AEE = Stomata width on the underside of leaf (μ m). CV = Coefficient of variation, DMS = Minimum significant difference.

mm². Resultados semejantes se obtuvieron en plantas de orquídeas de *Laelia eyermaniana* RCHB.f. con 2,5 estomas por mm² en la parte adaxial de la hoja (Francisco et al., 2011).

En las orquídeas *Maxillaria miniata* y *Pleurothallis cardiantha*, se reportó una densidad de 260 (80-300) estomas por mm² (Ely et al., 2007). Howard (1969) mencionó que comúnmente cada milímetro cuadrado de superficie foliar tiene unos 100 estomas, aunque puede ser diez veces mayor llegando a un máximo de 2230. Esau (1977) establece un rango de 100 a 300 estomas /mm² en angiospermas. Ayala-Cordero et al. (2006) encontraron una variación de estomas entre 414,63 a 473,89/mm² en cuatro genotipos de aguacate. Berdeja-Arbeu et al. (2010), encontraron que en porta injertos de lima-persa la variación fue de 287 a 331 estomas/mm². Sin embargo, en un trabajo con veinte poblaciones de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex. Pfeiff) Console, se reportó que el número de estomas varió de 18 a 30/mm² (Hernández et al., 2007). Considerando estos resultados, las cinco especies de *Vanilla*, en número de estomas, se asemejan más a las cactáceas, debido a que se obtuvo una variación entre

10,6 a 24,6 estomas por mm², para *V. insignis* Ames y *V. inodora* Schiede, respectivamente. Las plantas CAM presentan estomas pequeños generalmente encristados, cutículas gruesas y baja frecuencia de estomas que limitan la pérdida de agua (Sharkey, 1993).

Conocer el número e índice estomático, es importante, ya que se ha demostrado que la máxima conductancia estomática de vapor de agua, está determinada por el tamaño y densidad de estomas, siendo más bajo en especies de pastos C₄ que en especies C₃ (Taylor et al., 2012).

En general los estomas fueron más largos que anchos, tanto en la parte abaxial como adaxial de la hoja. *V. pompona* Schiede, *V. insignis* Ames y *V. odorata* Presl presentaron mayores valores de longitud y ancho de estomas en la parte abaxial de la hoja. *V. planifolia* G. Jackson, la especie más cultivada, presentó valores intermedios de LE, AE de 41,864 y 31,682 μ m, respectivamente, en la parte abaxial de la hoja. *V. insignis* Ames y *V. odorata* Presl fueron las que presentaron estomas más grandes en la parte adaxial de la hoja, estos resultados coinciden con lo registrado por Bory et al. (2008), quienes al trabajar

con material biológico de vainilla de Islas Reunión reportan promedios de longitud de estomas en seis accesiones de *V. planifolia* G. Jackson entre 37,65 μm a 48,25 μm , agrupando a las accesiones con longitud de estomas pequeños las que presentaron entre 37 a 41,5 μm , los intermedios con 43 a 44 μm , y las que presentaron longitudes de estomas más grandes mayores de 47 μm .

Todas las especies estudiadas de vainilla en el presente trabajo presentaron estomas más pequeños en la parte adaxial de la hoja. Toral et al. (2010) encontraron estomas más pequeños y menos densos en *Sequoia sempervirens* bajo condiciones climáticas restrictivas, como baja humedad atmosférica, precipitación, y cultivadas en suelos de alta densidad aparente y poco profundos. Los estomas pequeños presentan respuesta más rápida, comparados con estomas grandes, y combinados con la alta densidad estomática muestran alta conductancia en condiciones desfavorables (Drake et al., 2013), las características dinámicas de los estomas pequeños pueden ser parte de una selección integral para una alta conductancia estomática, acompañado de una alta capacidad fotosintética. Hetherington y Woodward (2003), mencionan que bajo un ambiente de alta irradiación, los estomas pequeños confieren una ventaja adaptativa a las plantas, porque pueden abrir y cerrar más rápidamente, y por lo tanto ser más eficientes en el uso del agua, en la fotosíntesis y en la transpiración. Este principio puede ser aplicado a la selección de plantas en mejoramiento genético. En el presente trabajo fue *V. inodora Schiede* la especie que presentó el mayor número de estomas y más pequeños, por lo que debería considerarse como una característica favorable, ya que podría integrarse en los programas de mejoramiento genético de este género.

Las diferencias estadísticas en las variables medidas de los estomas en las diferentes especies de vainilla que se cultivan en México, indican variabilidad genética que puede ser utilizada en la creación de nuevos genotipos. Por otro lado, se ha observado que del material biológico del banco de germoplasma de vainilla *V. planifolia* G. Jackson aborta sus frutos (80%) de 1 a 1,5 meses después de la polinización. En este sentido, Reyes et al. (2013), considerando 31 estaciones meteorológicas, reporta que los meses con mayor temperatura son mayo y junio y los más

secos son de enero a abril, así mismo los meses más húmedos corresponden de agosto a septiembre. La época de floración de vainilla es de marzo a abril, y considerando que el aborto de frutos se da de 1 a 1,5 meses de la polinización, se infiere que la etapa crítica se presenta en el mes de mayo, por las altas temperaturas y baja precipitación, otras especies del banco de germoplasma como *insignis* Ames, *inodora Schiede* y *odorata Presl*, sus frutos no son dehiscentes y los mantienen todo el año sin tirarlos.

Estas características nos permiten diferenciar el germoplasma que, conjuntamente con sus características estomáticas, abren nuevas líneas de investigación en el comportamiento estomático sobre todo para el mejoramiento genético donde se toman en cuenta características como el tamaño de estomas para estudiar diversidad, resistencia a enfermedades, enfriamiento por evaporación, retención de contaminantes y el uso eficiente del agua (Jones, 1987; Farooq et al., 2009; Medrano et al., 2007).

Los nuevos escenarios de cambio climático indican que entre 1961-2003 y 205-2060, la temperatura media de mayo a octubre se incrementará 1,9, 1,9, 2,0, 1,9 y 1,8 °C en las zonas del trópico, subtropical, transicional de altura, valles altos y valles muy altos, respectivamente, mientras que la precipitación en la misma temporada del año disminuirá 4,4, 3,8, 4,1, 4,5, 4,4% en las mismas zonas bajo esta situación (Ruiz et al., 2011). Conocer las características de los estomas en el género *vanilla* en México aporta conocimientos básicos en su biología. Además, conocer la variabilidad genética ayudará a afrontar el constante aumento de temperatura, CO₂ atmosférico y disminución de la precipitación, por lo que se debe trabajar con genotipos de vainilla tolerantes a la alta radiación.

LITERATURA CITADA

- Arrieta-Ramos, B., A. Villegas-Monter, A. Hernández-Bautista, M.N. Rodríguez-Mendoza, L.M. Ruiz-Posadas, y E. García-Villanueva. 2010. Estomas y vigor de naranjo "Valencia" injertado en portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos. *Rev. Fitotec. Mex.* 33:257-263.
- Ayala-Cordero, G., T. Terrazas, L. López-Mata, y C. Trejo. 2006. Cambios morfo-anatómicos y metabolismo

- fotosintético de plantas *Stenocereus beneckeii* en semilleros, bajo déficit hídrico de agua en el suelo. (En inglés) *J. Exp. Bot.* 57:3165-3174.
- Azcón-Bieto, J., y M. Talón. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2nd ed. Mc Graw-Hill Interamericana, ESP.
- Barrientos-Pérez, F., y C. Sánchez-Colín. 1983. Variabilidad de altura obtenida a partir de una nueva población de árboles de aguacate enano. (En inglés) *Acta Hort.* 140:162-168.
- Barrientos-Priego, A., M. Borys, C. Trejo, y L. López-López. 2003. Índice y densidad estomática foliar en plántulas de tres razas de aguacatero. *Rev. Fitotec. Mex.* 26:285-290.
- Berdeja-Arbeu, R., A. Villegas-Monter, L.M. Ruíz-Posadas, J. Sahagún-Castellanos, y M.T. Colinas-León. 2010. Interacción lima persa-portainjertos. Efecto en características estomáticas de hoja y vigor de árboles. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 16:91-97.
- Bethke, P., y M. Drew. 1992. Componentes estomáticos y no estomáticos que inhiben la fotosíntesis en hojas de *Capsicum annuum* durante la progresiva exposición a la salinidad NaCl. (En inglés) *Plant Physiol.* 99:219-226.
- Bory, S., L. Lubinsky, A.M. Risterucci, J.L. Noyer, M. Grisoni, M.F. Duval, y P. Besse. 2008. Patrones de introducción y diversificación de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) en Islas Reunión. (En inglés) *Am. J. Bot.* 95:805-815.
- Bozzola, J., and L. Russell. 1992. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. 2nd ed. Carlisle Publishers Services, Toronto, CAN.
- Branco, M.A., y R.A. Marengo. 2012. Crecimiento, características foliares y estomáticas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) en Amazona Central. (En inglés) *Rev. Árvore, Vicosa-MG* 36:7-16.
- Camargo, M.A.B. 2009. Stomatal characteristics in tree species of Central Amazonia. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA)/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, BRA.
- Cameron, M., y M. Chase. 1999. Relaciones filogenéticas de *pogoniinae* (Vainilloideae, Orchidaceae): un ejemplo fitogeográfico de herbáceas del este de América del Norte y este de Asia Oriental. (En inglés) *J. Plant. Res.* 112:317-329.
- Cañizares, A., M.E. Sanabria, D.A. Rodríguez, y Y. Perozo. 2003. Características de los estomas, índice y densidad estomática de las hojas de lima Tahití (*Citrus latifolia tanaka*) injertada sobre ocho patrones cítricos. *Rev. Cien. UDO Agríc.* 3:59-64.
- Cochard, H., L. Coli, X. Le Roux, y T. Ameglio. 2002. Descifrando los efectos hidráulicos de plantas en el cierre de estomas durante el estrés hídrico en nogal. (En inglés) *Plant Physiol.* 128:282-290.
- Comstock, J., y M. Mencuccini. 1998. Control de la conductancia estomática por el potencial hídrico de la hoja en *Hymenoclea salsola* (T. y G.), un subarbusto del desierto. (En inglés) *Plant Cell Environ.* 21:1029-1038.
- Cornish, K., J.W. Radin, E.L. Turcotte, Z. Lu, y E. Zeiger. 1991. Incremento de la fotosíntesis y conductancia estomática de algodón pima (*Gossypium barbadense* L.) mejorados para el incremento en rendimiento. (En inglés) *Plant Physiol.* 97:484-489.
- Costa, M.A.P., W.A.B. Almeida, F.A.A. Mourao Filho, B.M.J. Mendes, y A.P.M. Rodríguez. 2004. Análisis estomático de híbridos somáticos en cítricos obtenidos por fusión de protoplastos. (En inglés) *Pesqui. Agrop. Bras.* 39:297-300.
- Cowan, I.R. 1977. Comportamiento estomático y medio ambiente. (En inglés) *Adv. Bot. Res.* 4:117-228.
- Drake, P., R. Froend, y P. Franks. 2013. Estomas más pequeños y rápidos: Escala de tamaño de estomas, índice de respuesta y conductancia estomática. (En inglés) *J. Exp. Bot.* 64: 495-505.
- Ely, F., F. Torres, F. Rada, y Y. León. 2007. Estudio morfo-anatómico de dos orquídeas de una selva nublada tropical. *Interciencia* 32:410-418.
- Esau, K. 1977. Anatomy of seed plants. 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., NY, USA.
- Fan, M., Z. Zhao, y M. Assmann. 2004. Células guarda: un modelo dinámico de señalización. (En inglés) *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:537-546.
- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, y S.M. Basra. 2009. Estrés por sequía en plantas: manejo, mecanismos y efectos. (En inglés) *Agron. Sustain. Dev.* 29:185-212.
- Farquhar, G., y T. Sharkey. 1982. Conductancia estomática y fotosíntesis. (En inglés) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:17-45.
- Francisco, J.J., A. Jiménez-Aparicio, A. De Jesús-Sánchez, M.L. Arenas-Ocampo, E. Ventura-Zapata, y S. Evangelista-Lozano. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laella Eyermaniana RCHB. f.* generadas *in vitro*. *Polibotánica* 32:107-117.
- Gates, D.M. 1980. Biophysical ecology. Springer-Verlag New York Inc., NY, USA.
- Goyal, R.K. 2004. La sensibilidad de la evapotranspiración al calentamiento global :un caso de estudio de la zona

- árida de Rajasthan (India). (En inglés) *Agric. Water Manage* 69:1-11.
- Hernández, M., T. Terrazas, A. Delgado, y M. Luna. 2007. Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex. Pfeiff) Console (Cactaceae): variación en su área de distribución. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:235-240.
- Hetherington, M., y F. Woodward. 2003. El papel de los estomas en la detección y manejo del cambio ambiental. (En inglés) *Nature* 424:901-908.
- Hinckley, M., F. Duhme, A. Hinckley, y H. Richter. 1980. Relaciones hídricas de resistencia a la sequía de los arbustos: potencial osmótico y la reactivación de los estomas. (En inglés) *Plant Cell Environ.* 3:131-140.
- Hipólito, R.E. 2011. Modelo de intervención con enfoque ecosistémico para el desarrollo empresarial rural de pequeños productores: Estudio de caso en la región Totonaca del estado de Veracruz, México. Tesis Doctoral. Universidad Veracruzana Centro de Investigaciones Tropicales, Xalapa de Enríquez, Veracruz, MEX.
- Howard, R.A. 1969. La ecología de un bosque enano en Puerto Rico 8. Estudios de crecimiento del tallo y de la forma y estructura de la hoja. (En inglés) *J. Arnold Arbor.* 50:225-267.
- IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial) 2009. Declaratoria general de protección de la denominación de origen Vainilla de Papantla. Diario oficial de la federación (jueves 5 de marzo). MEX. p. 107-109.
- Jones, H.G. 1987. Breeding for stomatal characters. In: Zeiger et al., editors, *Stomatal function*. Stanford University Press, Stanford, CA, USA. p. 431-443.
- Kakami, V., K. Reddy, D. Zhao, y A. Mohammed. 2003. Efectos de radiación ultravioleta-B en algodón (*Gossypium hirsutum* L.) morfología y anatomía. (En inglés) *Ann. Bot.* 91:817-826.
- Kebede, H., B. Martin, J. Nienhuis, y G. King. 1994. Anatomía de la hoja de dos especies de *Lycopersicon* con propiedades de contraste en el intercambio de gases. (En inglés) *Crop. Sci.* 34:108-113.
- Kim, Tae-Houn, M. Böhmer, H. Honghong, N. Nishimura, y J. Schroeder. 2010. Señal de las células guarda en la red de traducción: los avances en el conocimiento del ácido abscísico, CO₂ y Ca²⁺ señalización. (En inglés) *Annu. Rev. Plant Biol.* 2(61):561-591.
- Kramer, P.J. 1983. *Water relations on plants*. Academic Press, NY, USA.
- Larkin, J., N. Young, M. Prigge, y M. Marks. 1996. El control de separación y el número de tricomas en *Arabidopsis*. (En inglés) *Development* 122:997-1005.
- Lawson, T. 2009. Fotosíntesis en células guarda y la función de los estomas. (En inglés) *New Phytol.* 181:13-34.
- Long, S.P., S. Humphries, y P.G. Falkowski. 1994. Fotorregulación de la fotosíntesis en la naturaleza. (En inglés) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45:633-662.
- Martin, C., y B. Glover. 2007. Aspectos funcionales del patrón celular en la epidermis aérea. (En inglés) *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:70-82.
- McDowell, N., T. Pockman, D. Allen, D. Breshears, N. Cobb, T. Kolb, J. Plaut, J. Sperry, A. West, G. Williams, y A. Yezzer. 2008. Los mecanismos de supervivencia de las plantas y la mortalidad durante la sequía: ¿Por qué sobreviven algunas plantas, mientras que otras sucumben a la sequía? (En inglés) *New Phytol.* 178:719-739.
- Medrano, H., J. Bota, J. Cifre, J. Flexas, M. Ribas-Carbó, y J. Gulias. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Invest. Geogr.* 43:63-84.
- Mott, K., y J. O'Leary. 1984. Comportamiento estomático e intercambio de CO₂ en hojas con características anfiestomáticas. (En inglés) *Plant Physiol.* 74:47-51.
- Pares, J., M. Arizaleta, M.E. Sanabria, y L. Brito. 2004. Características de los estomas, densidad e índice estomático y su variación en función a la injertación en *Annona muricata* y *A. montana* (Annonaceae). *Bioagro* 16:213-218.
- Pares, J., M. Arizaleta, M.E. Sanabria, y G. García. 2008. Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, índice estomático y el grosor foliar en plantas de *Carica papaya* L. *Acta Bot. Venez.* 31(1):27-34.
- Parkhurst, D.F. 1978. El significado adaptativo de la existencia de estomas en una o ambas superficies de las hojas. (En inglés) *J. Ecol.* 66:367-383.
- Reyes, L.D., A.D. Martínez, F.R. Pascual, I.R. Villegas, J.C. Alonso, J.V. Quiroz, H.A.B. Kelso, y M.L. Huerta. 2013. Diagnóstico de las anomalías de la temperatura y precipitación y su relación con el cultivo de vainilla. En: Álvarez, G.F. et al., editores, *Agricultura Sostenible*. Vol. 9 primera edición. Colegio de Postgraduados. MEX. p. 1235-1244.
- Ruiz, J.A., G. Medina, J.L. Ramírez, H.E. Flores, G. Ramírez, J.D. Manríquez, P. Zarazúa, D.R. Gonzales, G. Díaz, y C. De la Mora. 2011. Cambio climático y sus implicaciones en cinco zonas productoras de maíz en México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2:309-323.
- Salas, J., M. Sanabria, y R. Pire. 2001. Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate

- (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos. *Bioagro* 13:99-104.
- Sánchez, M., y J. Aguirreola. 1996. Relaciones hídricas. En: B.J. Azcon., y M. Talón, editores, *Fisiología y bioquímica vegetal*. Edigrafos, Madrid, ESP. p. 49-90.
- SAS Institute. 2009. Versión 9.2 para Windows. SAS Inst., Cary, NC, USA.
- SE (Secretaría de Economía). 2010. Proyecto de norma oficial mexicana (PROY-NOM-182-SCFI-2010), Vainilla de Papantla, extractos y derivados – Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). Poder Ejecutivo Federal, MEX.
- Serna, L., J. Torres-Contreras, y C. Fenoll. 2002. Análisis clonal del desarrollo y patrones de los estomas en hojas de *Arabidopsis*. (En inglés) *Dev. Biol.* 241:24-33.
- Schoch, P., C. Zinsou, y M. Sibi. 1980. La dependencia del índice estomático en los factores ambientales durante la diferenciación estomática en las hojas de *Vigna sinensis* L: Efecto de diferente intensidad de luz. (En inglés) *J. Exp. Bot.* 31:1211-1216.
- Sharkey, T. 1993. Fotosíntesis. En: B.J. Azcon, y M. Talón, editores, *Fisiología y bioquímica vegetal*. Editorial Mac Graw-Hill, ESP. p. 81-85.
- Smirnoff, N. 1993. El papel del oxígeno activo en la respuesta de las plantas al déficit hídrico y desecación. (En inglés) *New Phytol.* 125:27-58.
- Soto-Arenas, M. A. 2003. *Vanilla*. In: A.M. Pridgeon et al., editores, *Orchids of México*, parts 2 and 3. *Icones Orchidacearum fasc. 5-6*, Herbario AMO. MEX. p. 321-334.
- Soto-Arenas, M.A., y P. Cribb. 2010. Una nueva clasificación infragenérica y sinopsis del género *Vanilla* Plum. ex Mill (*Orchidaceae: Vanillinae*). (En inglés) *Lankesteriana* 9:355-398.
- Tari, I. 2003. Densidad estomática abaxial y adaxial, conductancias estomáticas y estatus del agua en las primeras hojas de frijol como es afectado por paclobutrazol. (En inglés) *Biol. Plant.* 47:215-220.
- Taylor, S., P. Franks, S. Hulme, E. Spriggs, P. Christin, E. Edwards, F. Woodward, y C. Osborne. 2012. Vía fotosintética y adaptación ecológica que explican las características estomáticas y diversidad entre pastos. (En inglés) *New Phytol.* 193:387-396.
- Tibbitts, T.W. 1979. Humedad y plantas. (En inglés) *Bioscience* 29:358-363.
- Toral, M., A. Manríquez, R. Navarro-Cerrillo, D. Tersí, P. Naulin. 2010. Características de los estomas, densidad e índice estomático en secuoya (*Sequoia sempervirens*) y su variación en diferentes plantaciones de Chile. *Bosque* 31(2):157-164.
- Voleniková, M., y I. Tichá. 2001. Perfiles de inserción en densidad y tamaño de estomas en *Nicotiana tabacum*. (En inglés) *Biol. Plant.* 44:161-165.
- Weeb, A.R., y A. Baker. 2002. Biología estomática: nuevas técnicas, nuevos descubrimientos. (En inglés) *New Phytol.* 513:365-370.
- Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). In: C.R. Metalcafe, and L. Chalk, editors, *Anatomy of the dicotyledons*. Vol. 1. Clarendon Press, Oxford, USA. p. 97-117.