

PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.) CON DOSIS SUBLETALES DE OZONO APLICADAS AL MEDIO DE CULTIVO

PROMOTING GROWTH OF LETTUCE PLANTS (*Lactuca sativa* L.) WITH SUBLETHAL OZONE DOSES APPLIED TO CULTURE MEDIUM

Jorge A. Vázquez-Ybarra¹, Cecilia B. Peña-Valdivia^{2*}, Carlos Trejo², Albino Villegas-Bastida³, Sergio Benedicto-Valdéz⁴ y Prometeo Sánchez-García⁴

¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad, Fisiología Vegetal, ²Posgrado en Botánica, ⁴Posgrado en Edafología, Colegio de Postgraduados. Km 35.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. ³Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Guillermo Massieu Helguera No. 239. 07320, Fracc. La Escalera, Ticomán, D.F., México.

*Autora para correspondencia (cecilia@colpos.mx; cecibetipv@gmail.com)

RESUMEN

Las plantas han desarrollado un conjunto de mecanismos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos de respuesta a los cambios ambientales de O₃. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dosis subletales de O₃, aplicadas al medio de cultivo, en el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Con base en el fenómeno denominado hormesis, la hipótesis fue que existe una dosis umbral de O₃ que modifica positivamente el metabolismo de las plantas e incrementan su crecimiento y productividad. En un sistema hidropónico de plantas en flotación se evaluaron nueve dosis entre 0.53 y 59.40 mg L⁻¹, aplicadas semanalmente, y se compararon con un testigo sin O₃. Las variables del crecimiento que se cuantificaron fueron: diámetro del tallo, altura del tallo, altura de hoja, número total de hojas, longitud de raíz, peso fresco de raíz, biomasa seca de raíz, peso fresco y biomasa del vástago. Las plantas completaron su ciclo de crecimiento sin algún daño en el crecimiento con concentraciones entre 0.53 y 5.94 mg de O₃ L⁻¹, pero 20, 40 y 60 mg L⁻¹ fueron letales en plantas de cinco semanas de edad. Estas dosis causaron oscurecimiento y necrosis acelerados de los tejidos foliares y muerte, los cambios de color de las hojas fueron evidentes desde los 20 min posteriores a la única aplicación de O₃. Además, las dosis de 2.66 y 3.96 mg L⁻¹ incrementaron significativamente ($P \leq 0.05$) el diámetro del tallo, la biomasa fresca en la raíz y el vástago y la biomasa seca en la raíz y el vástago, en promedio 16, 23, 15, 89 y 11 % con respecto al testigo, después de 10 semanas de crecimiento.

Palabras clave: *Lactuca sativa*, crecimiento, hormesis, raíz.

SUMMARY

Plants have developed a set of morphological, biochemical and physiological mechanisms in response to O₃ environmental changes. This study evaluated the effect of sub-lethal, O₃ doses in the growth media on lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. Based on the phenomenon called hormesis, we postulate that there is a threshold dose of O₃ that positively modifies plant metabolism that increases growth and productivity. Ozone doses between 0.53 and 59.40 mg L⁻¹ applied weekly were evaluated in plants in a hydroponic float system and compared to a control without O₃. Measured variables were root length, stem diameter, stem height, leaf number, leaf length, wet and dry root biomass, and wet and dry shoot biomass week every week. Plants completed their development with concentrations between 0.53 and 5.94 mg O₃ L⁻¹ without any

growth damage. O₃ doses of 20, 40 and 60 mg L⁻¹ were lethal to five weeks-old plants because they caused a rapid leaf tissue darkening and necrosis after 20 min of a single application. In contrast, 2.66 and 3.96 mg L⁻¹ significantly ($P \leq 0.05$) increased stem diameter, wet root and shoot biomass and dry root and shoot biomass gaining 16, 23, 15, 89 and 11%, compared to the control, after 10 weeks of growth.

Index words: *Lactuca sativa*, growth, hormesis, root.

INTRODUCCIÓN

Hormesis es un concepto toxicológico que se aplica a la respuesta o conjunto de procesos por los que un agente químico, físico o biológico en dosis baja es capaz de activar una respuesta adaptativa, que incrementa la resistencia de una célula u organismo frente al estrés, pero que en dosis altas es estresante o inhibidor (López-Díazguerrero *et al.*, 2013). Los primeros reportes aparecen en la década de 1880 por Hugo Schulz y Rudolph Arndt, quienes documentaron el fenómeno de respuesta estimuladora debida a sustancias tóxicas. Schulz fue uno de los primeros en observarlo al estudiar los efectos de distintas sustancias químicas en la fermentación por levaduras, y reportó que agentes tóxicos aplicados en concentraciones bajas estimulaban la producción de CO₂, mientras que dicha producción se inhibía al aplicarse en dosis altas (Schulz, 1887; citado por Calabrese y Baldwin, 2003).

La evidencia científica de la estimulación de sistemas biológicos con dosis bajas de sustancias tóxicas se ha documentado en publicaciones especializadas (Allender *et al.*, 1997; Appleby, 1998; Calabrese y Baldwin, 1999) y en las plantas los estudios se han hecho principalmente por especialistas de las malezas (Wiedman y Appleby, 1972). En 1865, Reveil (citado por Garzon y Flores, 2013) observó que el hipoclorito de sodio en concentraciones bajas estimuló la germinación de semillas mientras que en concentraciones mayores de 0.1 % tuvo un efecto fitotóxico.

Uno de los estudios más antiguos en plantas es el del herbicida 2-metil-4-cloro-fenoxiacético (MCPA). Desde la identificación de la sal sódica del MCPA como herbicida (Allen *et al.*, 1978) las auxinas sintéticas han sido reconocidas por sus efectos nocivos cuando se aplican en dosis altas, opuestos a su función de estimular la elongación de los tejidos vegetales, en los que se encuentran en concentraciones bajas (1 mg kg^{-1} de tejido; Cedergreen *et al.*, 2007).

La toxicidad de concentraciones iguales o superiores a $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ del antibiótico enrofloxacin se observó en plántulas de *Cucumis sativus* L., *Lactuca sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., y *Raphanus sativus* L., pero en concentraciones menores (50 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$) aceleró el crecimiento de las cuatro especies (Migliore *et al.*, 2003). También se ha evaluado el efecto de 23 fitotoxinas naturales y sintéticas y el extracto fitotóxico foliar de *Parthenium hysterophorus* L. en el crecimiento de la raíz de plántulas de amaranto (*Amaranthus hybridus* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), lechuga (*Lactuca sativa* cv. Maikönig), alfalfa (*Medicago sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y *Sinapis alba* L. (Belz y Piepho, 2012).

Este fenómeno de hormesis constituye un uso alternativo posible de esos y otros compuestos tóxicos para las plantas, como el O_3 , y que sin embargo está comprometido por la variabilidad aparente del fenómeno (Belz y Piepho, 2013). El O_3 es un oxidante fuerte y es desinfectante efectivo porque destruye impurezas y contaminantes biológicos (virales y bacterianos) a través de modificación o inactivación de moléculas mediante la oxidación de dobles enlaces (Booker *et al.*, 2009). Los efectos biológicos del O_3 en las plantas han sido estudiados por más de 50 años (Sudhakar *et al.*, 2011). Las plantas han desarrollado un conjunto de mecanismos de respuesta para responder a varias tensiones ambientales mediante cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos provocados por O_3 (Sudhakar *et al.*, 2007; Nagendra-Prasad *et al.*, 2009). Sin embargo, el O_3 en la troposfera es el contaminante atmosférico más fitotóxico, por su capacidad oxidante mayor que la del O_2 .

Los cultivos presentan sensibilidad diferente al O_3 troposférico (Mills *et al.*, 2003). Los síntomas por O_3 durante periodos cortos en plantas sensibles son: clorosis y necrosis en una o ambas caras de las hojas. Los síntomas crónicos se deben a la exposición frecuente, periódica e intermitente de las plantas a concentraciones altas de O_3 , mayores a las ambientales ($\geq 160 \mu\text{g m}^{-3}$; Olszyk *et al.*, 1990), que afectan negativamente el crecimiento, la productividad y la calidad de los cultivos (Biswas *et al.*, 2008). La pérdida de la producción global por este contaminante se ha calculado en 72 a 121 toneladas y 11 a 18 billones de dólares (Avnery *et al.*, 2011). El O_3 provoca cambios en la fisiología y el metabolismo de las plantas, al interactuar con los antioxidantes;

las primeras moléculas en reaccionar con esta molécula son los lípidos de la membrana plasmática, los aminoácidos de las proteínas de las membranas y los metabolitos localizados en la pared celular (Fiscus *et al.*, 2005).

De acuerdo con la reacción de los cultivos, Mills *et al.* (2003) los clasificó en cuatro grupos, de sensibles a insensibles. Lechuga, algodón (*Gossypium* spp.), cebolla (*Allium* spp.), nabo (*Brassica rapa*), sandía (*Citrullus lanatus*), soya (*Glycine max*), tomate (*Solanum lycopersicum*), y trigo son algunos de los cultivos identificados como sensibles al O_3 . Con la finalidad de determinar dosis de efecto hormético en alguno de esos cultivos se seleccionó la lechuga, ya que el tiempo para su cultivo es de 10 o 12 semanas y las evaluaciones a lo largo del desarrollo de las plantas pueden multiplicarse sin restricción de tiempo.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del O_3 aplicado al medio de cultivo en el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Con base en el fenómeno de dosis: respuesta, denominado hormesis, la hipótesis fue que existe una dosis umbral de O_3 que modifica positivamente el metabolismo de las plantas e incrementan su crecimiento y productividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un invernadero ubicado en Montecillo, Estado de México ($19^\circ 27' \text{ N}$, $98^\circ 54' \text{ O}$, 2220 msnm). Dentro del invernadero la temperatura media día/noche fue $30/16^\circ \text{C}$, la humedad relativa media día/noche fue 33/39 % y la iluminación fue natural, con radiación fotosintéticamente activa entre 115 y $615 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Se emplearon plántulas de lechuga de la variedad Bubba F1, de 30 d de edad, con 6 o 7 hojas, obtenidas de un invernadero para producción comercial de hortalizas. Las plantas se cultivaron en un sistema hidropónico con raíz flotante. Se usaron recipientes de material plástico, con capacidad de 4 L, cuya tapa sirvió de soportes a las plantas, con cuatro perforaciones equidistantes. En cada una se colocó una plántula. La aireación al medio se proporcionó con cuatro bombas generadoras de O_2 (ECOPET®, modelo 1688; México), que oxigenaba la solución 5 min al día (Figura 1 A).

Las plantas crecieron en solución nutritiva universal de Steiner, preparada con fertilizantes comerciales. Al inicio del ciclo del cultivo la solución Steiner se aplicó al 25 % de su concentración total, y durante 4 semanas se incrementó su concentración hasta llegar a 100 % con la que se continuó el resto del ciclo del cultivo. El pH y la conductividad eléctrica de la solución nutritiva se midió con un potenciómetro (Hanna®, modelo HI 99300; España), el pH durante el cultivo fue de entre 5.5 y 6.5. La temperatura dentro del

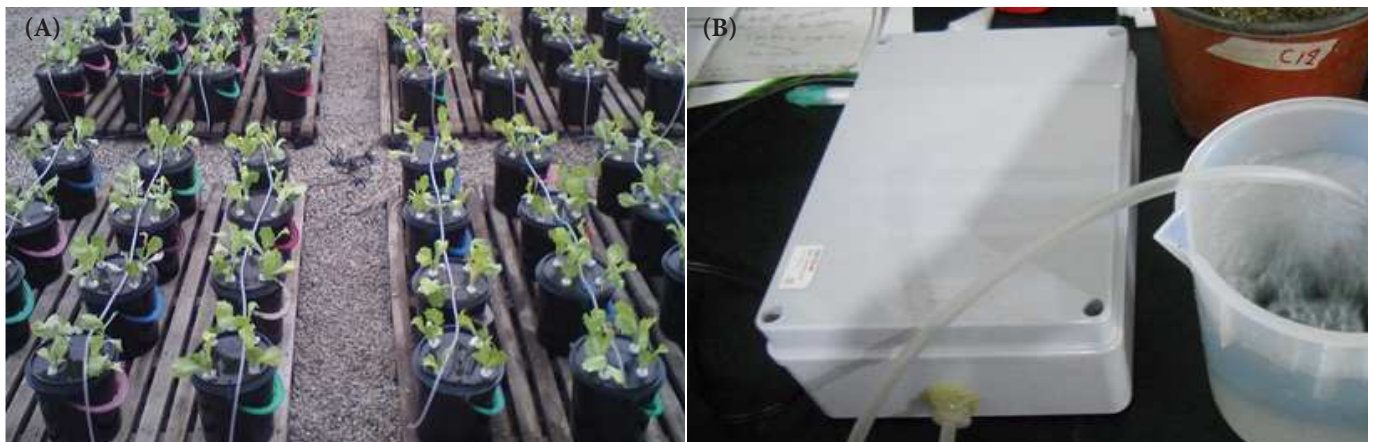


Figura 1. Organización de las plantas de lechuga cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante y aireación al medio (A) y ozonificador (B) utilizado en plantas de lechuga cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante.

invernadero se monitorio con un sensor HOBO (Onset®, modelo U12-001; EE.UU.) y la radiación con un sensor portátil QSPAR®, Hansatech Instruments, RU).

Después del trasplante se permitió que las plántulas se aclimataran a las condiciones de cultivo durante una semana. El O_3 atmosférico dentro del invernadero se consideró un factor constante al que estuvieron expuestos todos los tratamientos. Después, el O_3 se aplicó semanalmente, durante 6 semanas con un equipo generador de ozono (AQUA – EQUIPOS DE MEXICO®; México) (Figura 1 B), que genera 4 mg L^{-1} de O_3 por minuto. Las aplicaciones se hicieron burbujando la solución nutritiva con la corriente de ozono durante el tiempo necesario para obtener cada concentración de prueba.

Nueve dosis de O_3 , entre 0.53 y 59.40 mg L^{-1} , aplicadas en la solución nutritiva y un testigo sin O_3 se evaluaron inicialmente. En un primer ensayo se evaluó el efecto de dosis de O_3 de 20 , 40 y 60 mg L^{-1} . Los resultados sirvieron para seleccionar dosis de O_3 de entre 0.53 y 5.94 mg L^{-1} y determinar en un segundo ensayo si el O_3 modificaba la solución nutritiva. Las dosis se aplicaron semanalmente a la solución nutritiva de dos grupos de plantas de 5 semanas de edad; a un grupo con los 10 tratamientos se le renovó la solución 2 h después de las aplicaciones y al otro grupo una semana después. El crecimiento de las plantas se evaluó semanalmente por 6 semanas. Este ensayo se desarrolló con un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento, cada una representada por una planta. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) y a comparación múltiple de medias de Tukey (DSH) con el paquete SAS.

Esos resultados se utilizaron para seleccionar las dosis de

O_3 (2.66 y 3.96 mg L^{-1}) del tercer ensayo, que se aplicaron semanalmente por 10 semanas, y 2 h después de aplicar el O_3 la solución nutritiva se renovó. Las variables evaluadas fueron longitud de la raíz, diámetro del tallo, número de hojas y longitud de las hojas, biomasa húmeda y biomasa seca de raíz, biomasa húmeda y biomasa seca del vástago en plantas cosechadas semanalmente.

La longitud de la raíz se midió después de separar la raíz del vástago, y la longitud total del ápice al corte. El diámetro del tallo se midió en la base con un vernier con pantalla digital (Truper®, modelo Caldi – 6mp; México). El número total de hojas se contabilizó después de desprenderlas del tallo. Para cuantificar el crecimiento foliar, las hojas de las plantas seleccionadas se marcaron con etiquetas y se midieron cada 3 d. Al respecto, en un ensayo preliminar las mediciones se realizaron en hojas al azar, pero las tendencias del crecimiento fueron confundidas debido a que la aparición de las hojas es continua en la planta. La longitud del tallo se midió del ápice a la base.

La biomasa fresca de la raíz y del vástago se obtuvo después de separar y lavar ambas secciones de las plantas en balanza granataria (Scientech®, modelo SA 120; EE.UU.). La biomasa seca de ambas secciones de las plantas se obtuvo después de deshidratarlas en una estufa de secado, a 70°C por 68 h, en la misma balanza mencionada. La biomasa del vástago fue la suma de los valores independientes del tallo y las hojas previamente muestreadas y secadas por separado.

El estudio se estableció y analizó conforme al diseño experimental completamente al azar con dos concentraciones de O_3 y un testigo, y diez repeticiones por tratamiento, cada una representada por una planta. Los datos obtenidos en la cosecha se analizaron con ANDEVA y

comparación múltiple de medias de Tukey (DSH) con el paquete SAS. Las gráficas se desarrollaron en el programa Sigma Plot® de Jandel Scientific (Versión 10.0).

RESULTADOS

Las dosis de O_3 de 20, 40 y 60 mg L^{-1} fueron letales en plantas de cinco semanas de edad, porque causaron oscurecimiento y necrosis (degeneración del tejido) rápido de los tejidos foliares, que fueron evidentes desde los 20 min posteriores a la única aplicación de O_3 . Los daños ocasionados por la concentración menor iniciaron en la base y en los bordes de las hojas, y los de las concentraciones mayores se observaron en las hojas completas; además las plantas presentaban marchitamiento generalizado unas horas después y en 1 d murieron. En contraste, las concentraciones entre 0.53 y 5.94 mg L^{-1} permitieron el crecimiento de las plantas. Los resultados que a continuación se presentan corresponden a los tratamientos con 2.66 y 3.96 mg L^{-1} y al testigo sin O_3 , con renovación de la solución nutritiva 2 h después de aplicar el O_3 .

Longitud de raíz

Durante las 10 semanas de evaluación la raíz se alargó en forma no lineal en las plantas de los tres tratamientos. El crecimiento se mantuvo durante las cuatro primeras semanas y a partir de ese momento disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) en los tres tratamientos; pero al final, en la novena semana, se reactivó e incrementó ($P \leq 0.05$) entre 15 y 16 %. Estos resultados fueron evidencia de que el O_3 no afectó negativamente el crecimiento longitudinal de las raíces. El ANDEVA de longitud de raíz mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Figura 2 A).

Altura del tallo

El tallo se alargó en forma lineal durante las 10 semanas de evaluación en los tres tratamientos, y a las 10 semanas de cultivo este órgano continuaba creciendo ($P \leq 0.05$) en las plantas de los tres tratamientos. Similar al crecimiento longitudinal de la raíz, estos resultados indicaron que el O_3 no afectó negativamente el crecimiento longitudinal (crecimiento primario) promedio del tallo (Figura 2 B). El ANDEVA de la altura del tallo después de 10 semanas de crecimiento mostró que no existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos.

Longitud de la hoja

La hoja en las plantas de los tres tratamientos incrementó aceleradamente su longitud en las primeras dos semanas, luego en las siguientes 3 semanas el crecimiento se desacele-

ró y después de la quinta semana alcanzó su valor máximo, cercano a 14 cm (Figura 2 C). Aunque el crecimiento longitudinal foliar del testigo presentó valores ligeramente menores que en los tratamientos con O_3 , en todo el ciclo de cultivo no existió diferencia significativa entre los tratamientos. Estos resultados indican que las dosis aplicadas de O_3 tampoco afectaron negativamente el alargamiento de las hojas.

Diámetro del tallo

El diámetro del tallo incrementó linealmente durante las 10 semanas de evaluación en los tres tratamientos. En los tratamientos con O_3 se observó crecimiento transversal mayor de ese órgano en comparación con el testigo. El ANDEVA del diámetro del tallo mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.03$) entre los tratamientos en las 10 semanas, y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$) mostró que la aplicación semanal de 2.66 y 3.96 mg de O_3 L^{-1} incrementó significativamente (16 %) el valor de sus medias con respecto al testigo, sin diferencia significativa entre los tratamientos con O_3 (Figura 3). Así, estos resultados indicaron que además que el O_3 no afectó negativamente el crecimiento transversal del tallo, la presencia de este compuesto a partir de la sexta semana promovió el incremento del crecimiento.

Número de hojas

El número de hojas por planta en las 10 semanas incrementó con una tendencia lineal en los tres tratamientos. Hasta las 10 semanas el número de hojas continuaba incrementando en las plantas de los tres tratamientos.

El ANDEVA indicó que a las 10 semanas de cultivo no existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (Figura 4). Esto mostró que el O_3 no afectó negativamente el incremento del número de hojas por planta.

Biomasa húmeda de raíz

El incremento de la biomasa húmeda en las raíces generó curvas sigmoideas de crecimiento durante las 10 semanas de evaluación en los tres tratamientos. Durante las primeras tres semanas la acumulación de biomasa húmeda en las raíces de las plantas de los tres tratamientos fue imperceptible. A partir de la cuarta semana y hasta la octava semanas de cultivo esta variable incrementó aceleradamente en las plantas de los tres tratamientos con diferencias entre ellos, y entre la novena y décima semana tendió a desacelerarse, principalmente en las plantas del tratamiento testigo. A partir de la cuarta semana en ambos tratamientos con O_3 el crecimiento fue gradualmente mayor que en el testigo (Figura 5 A).

El ANDEVA de la biomasa húmeda de la raíz mostró que existió diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos en la décima semana de crecimiento y que aque las plantas de ambos tratamientos con O_3 acumularon entre 21% y 24% más biomasa fresca en las raíces que el testigo (Figura 5 A). Esto indicó que el O_3 no afectó negativamente la acumulación de biomasa húmeda de la raíz y que aunque el O_3 no promovió el crecimiento longitudinal de las raíces, respecto al testigo, sí pudo haber propiciado su crecimiento transversal, e incrementó las raíces adventicias o ambos.

Biomasa húmeda del vástago

El incremento de la biomasa húmeda del vástago generó curvas de tipo sigmoideo de crecimiento en los tres tratamientos durante las 10 semanas de evaluación. Las curvas de acumulación de esta variable en el tiempo fueron notablemente similares a las obtenidas con el peso húmedo

en las raíces (Figura 5 A y B), la diferencia principal fue la magnitud del peso acumulado en cada órgano. El vástago alcanzó hasta cinco veces más biomasa húmeda que la raíz (en promedio 40.5 g y 217 g). Así, durante las primeras 3 semanas la ganancia de biomasa húmeda en el vástago de las plantas de los tres tratamientos fue casi imperceptible. A partir de la cuarta semana y hasta la sexta o séptima semanas de cultivo la acumulación de biomasa húmeda en el vástago de las plantas de los tres tratamientos incrementó aceleradamente independientes del tratamiento, hasta alcanzar valores cercanos a los 250 g.

El ANDEVA de la biomasa total del vástago mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, al menos en una fecha. La comparación múltiple de medias indicó que las dosis de 2.66 y 3.96 mg de O_3 L⁻¹ propiciaron acumulación significativamente mayor de 12 y 17 % de biomasa húmeda en el vástago, respecto al testigo, en la décima semana de desarrollo (Figura 5 B).

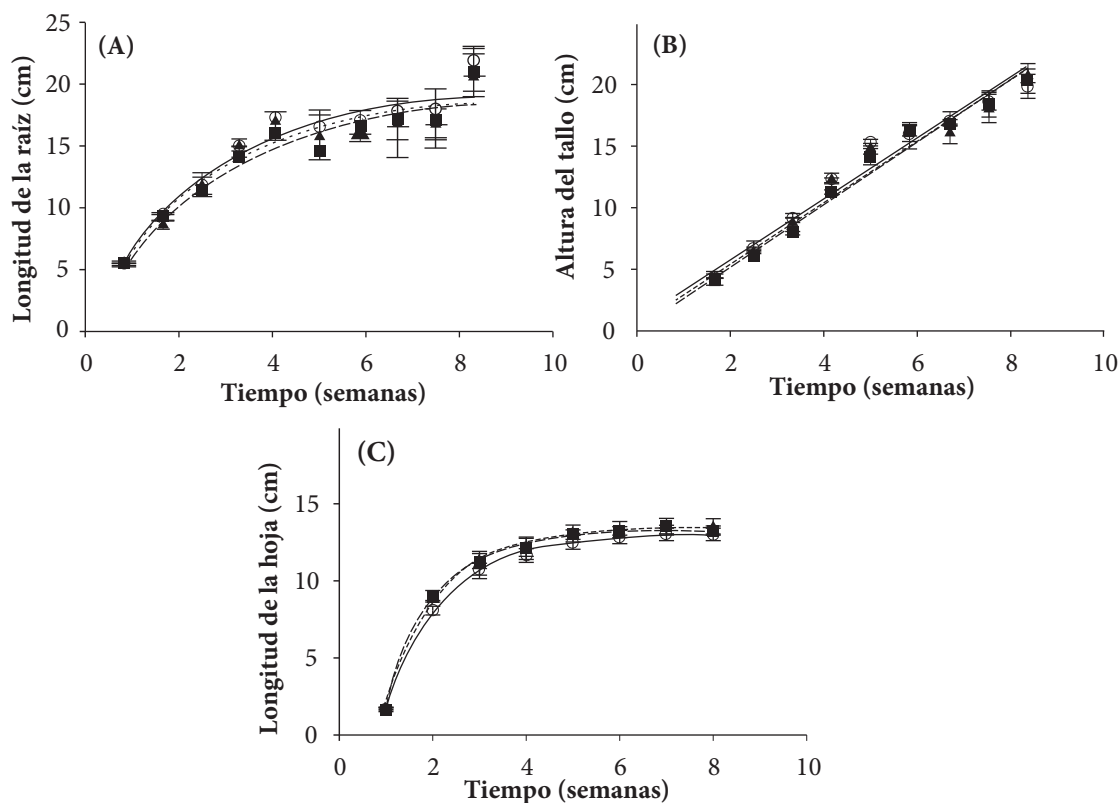


Figura 2. Crecimiento acumulado en longitud de la raíz (A), altura del tallo (B) y longitud de la hoja basal (C) de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) durante 10 semanas, cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante. Círculos vacíos: testigo sin O_3 , con aplicaciones semanales, por 6 semanas, de 2.66 mg L⁻¹ (cuadros negros) o 3.96 mg L⁻¹ (triángulos negros). En (A) el incremento de los tres tratamientos se ajustó a un modelo de crecimiento exponencial máximo ($y = y_0 + a(1 - e^{-bx})$) con r^2 entre 0.801 y 0.860; (B) crecimiento lineal ($y = ax + b$) con r^2 entre 0.922 y 0.935; (C) crecimiento exponencial máximo con r^2 entre 0.901 y 0.933.

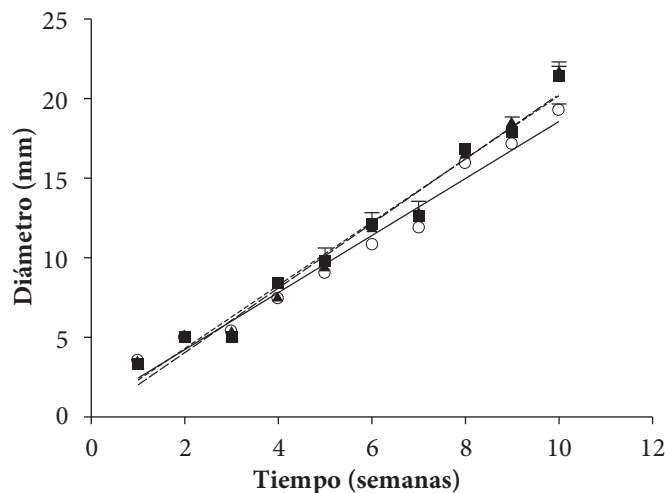


Figura 3. Crecimiento del diámetro del tallo de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) durante 10 semanas, cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante. Círculos vacíos: testigo sin O₃, con aplicaciones semanales, por 6 semanas, de 2.66 mg L⁻¹ (cuadros negros) o 3.96 mg L⁻¹ (triángulos negros). El crecimiento de los tres tratamientos se ajustó a un modelo lineal ($y = ax + b$) con r^2 entre 0.920 y 0.936.

Biomasa seca de raíz

Similar al incremento de la biomasa húmeda de la raíz, la acumulación de biomasa seca en las raíces generó curvas sigmoideas de crecimiento en los tres tratamientos. En las primeras tres semanas la acumulación de biomasa seca en las raíces de las plantas de los tres tratamientos fue mínima y a partir de la cuarta y hasta la sexta semana la tendencia de acumulación de biomasa seca mostró diferencias entre los tratamientos. En el tratamiento control la acumulación de biomasa seca de la raíz se desaceleró, por lo que en las últimas semanas el aumento fue mínimo y entre la octava y décima semana alcanzó el máximo valor (1.4 g). Esta tendencia contrastó con la descrita por la acumulación de biomasa húmeda del mismo órgano de las plantas testigo, que continuó incrementando hasta las 10 semanas. Además, la tendencia de acumulación de biomasa seca de las plantas del tratamiento testigo contrastó con el de las plantas de ambos tratamientos con O₃, ya que éstas continuaron acumulando biomasa seca en sus raíces después de la séptima semana (Figura 6 A).

El ANDEVA de la biomasa seca de raíz mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos, y la prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) mostró que la aplicación semanal de O₃ tuvo efecto positivo en la acumulación de biomasa seca en ese órgano, pues incrementó significativamente respecto al testigo

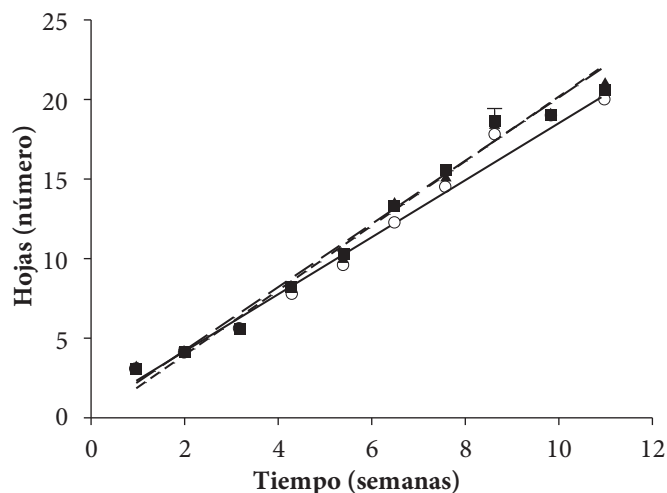


Figura 4. Acumulación en número de hojas por planta de lechuga (*Lactuca sativa*) durante 10 semanas, cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante. Círculos vacíos: testigo sin O₃, con aplicaciones semanales, por 6 semanas, de 2.66 mg L⁻¹ (cuadros negros) o 3.96 mg L⁻¹ (triángulos negros). El crecimiento de los tres tratamientos se ajustó a un modelo lineal ($y = ax + b$) con r^2 entre 0.965 y 0.971).

a partir de la octava semana de evaluación. La comparación estadística también indicó que 2.66 mg L⁻¹ de O₃ tuvo efecto mayor, pues en la evaluación final la diferencia en biomasa seca acumulada alcanzó el doble con la dosis menor de O₃ y 78 % con la mayor respecto al testigo (Figura 6 A).

Biomasa seca del vástago

El crecimiento del vástago, durante las 10 semanas, expresado como cantidad de biomasa seca en las plantas de los tres tratamientos mostró tendencia sigmoidea simple y fue similar a la tendencia de acumulación de la biomasa húmeda de los mismos vástagos. Esa acumulación en las plantas de los tres tratamientos en las primeras 3 semanas fue cercana a cero y se aceleró a partir de la cuarta semana. En esta etapa de incremento la acumulación de biomasa seca en el vástago de las plantas con O₃ tendió a ser mayor que en el testigo (Figura 6 B).

El ANDEVA de biomasa seca del vástago mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0215$) entre los tratamientos, y la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) señaló que la aplicación semanal de 2.66 y 3.96 mg de O₃ L⁻¹ tuvo efecto positivo en el crecimiento, al incrementar significativamente el valor de sus medias, entre 10 y 11 %, con respecto al testigo, sin diferencia significativa entre los dos tratamientos con O₃. (Figura 6 B). Como en el caso de las otras variables del crecimiento, los

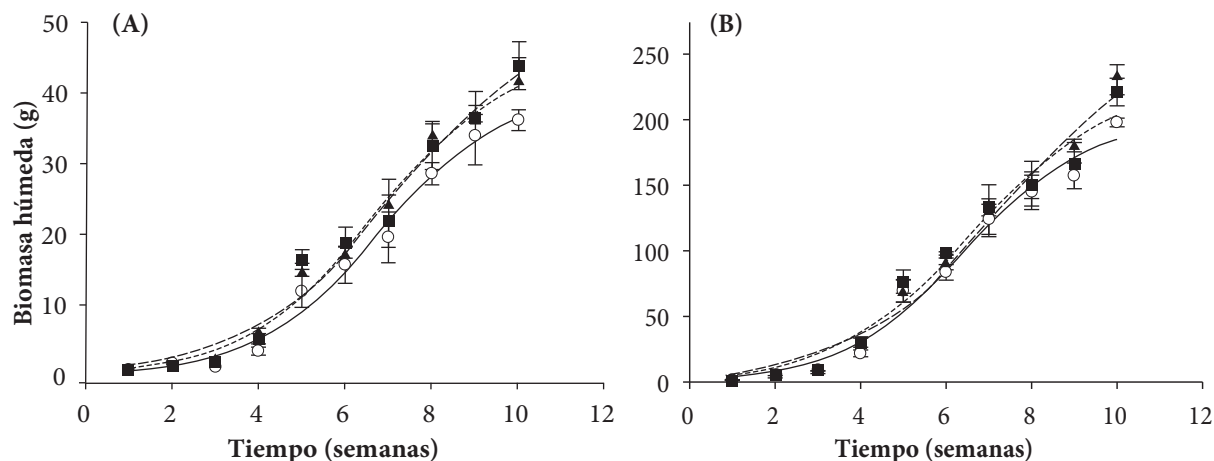


Figura 5. Acumulación de biomasa total (peso fresco) de raíz (A) y vástago (B) de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) durante 10 semanas, cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante. Círculos vacíos: testigo sin O_3 , con aplicaciones semanales, por 6 semanas, de 2.66 mg L^{-1} (cuadros negros) o 3.96 mg L^{-1} (triángulos negros). En (A) el crecimiento de los tres tratamientos se ajustó a un modelo sigmoideal ($y = a/(1 + e^{-(x-x_0/b)})$) con r^2 entre 0.850 y 0.874; (B) modelo sigmoideal con r^2 entre 0.880 y 0.923.

resultados de acumulación de biomasa seca del vástago indicaron que el O_3 no afectó negativamente el crecimiento de las plantas y sí promovió el crecimiento.

DISCUSIÓN

Los cultivos difieren en la susceptibilidad al O_3 y han sido clasificados como sensibles o tolerantes (Mills *et al.*, 2007). La variación intra e interespecífica de sensibilidad de las plantas al O_3 es amplia (Brosche *et al.*, 2010), y estudios recientes han identificado algunos sitios del genoma asociados a la resistencia o susceptibilidad este gas en trigo y arroz (Ainsworth *et al.*, 2008; Frei *et al.*, 2010). Sin embargo, la definición de cultivo sensible a O_3 es imprecisa, ya que los cultivos pueden ser identificados como sensibles si los daños en el follaje son visibles en las primeras etapas del crecimiento, pero esto no necesariamente da lugar a un impacto negativo en el rendimiento de semilla o fruto en los cultivos al final del desarrollo. Al respecto Sawada y Kohno (2009) demostraron en arroz y Picchi *et al.* (2010) en trigo que cultivares en los que el rendimiento de semilla son impactados mayormente por O_3 son aquellos que mostraron signos de daño visible en las hojas.

En el presente estudio los signos de daño en las hojas fueron evidentes con dosis de 20 a 60 mg L^{-1} . Los estomas son las estructuras foliares que responden a la presencia de O_3 en el ambiente. Picchi *et al.* (2010) proponen que la tolerancia puede estar relacionada con la variación genotípica de la capacidad de cierre estomático en reacción al O_3 . Así, los cultivares que reaccionan al O_3 con el cierre de los estomas podría considerarse relativamente insensibles a este

gas pues las lesiones serán menos visibles, dado que la dosis de O_3 se reducirá con el cierre estomático. Sin embargo, el cierre estomático prolongado reducirá la fijación de C, y en consecuencia se afectarán el crecimiento y el rendimiento.

En el presente estudio el O_3 estuvo en contacto inicialmente con la raíz, por el burbujeo, especialmente las concentraciones mayores a 20 mg L^{-1} en la solución nutritiva, pero también pudo haber contacto del gas con las hojas y así haber potenciado su efecto, al rebasarse la concentración óptima de solubilidad (20 mg L^{-1} de agua a 1 atm y 12°C ; Babor e Ibarz, 1974). Al respecto, Goumenaki y Barnes (2009) señalaron que los estomas en las hojas de lechuga son particularmente sensibles a la presencia de ese gas en el aire y que los síntomas de daño en el follaje de lechuga 'Paris Island' después de la exposición a $100 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$, pero en 'Grenada' están relacionados con alteraciones en la pared celular, la muerte celular programada y acumulación de metabolitos tóxicos producidos durante la pérdida de los mecanismos antioxidantes de protección.

En cambio, puesto que dosis de 5.94 mg L^{-1} o menores aplicadas semanalmente por periodos de 6 a 10 semanas no afectaron negativamente el crecimiento y en algunos casos lo promovieron (poco más de la mitad de las variables evaluadas incrementaron significativamente después de 10 semanas), es posible señalar que las plantas de lechuga realizaron una sobrecompensación a la alteración en la homeostasis generada por el O_3 (Goumenaki *et al.*, 2007), debido a la estimulación directa, o la adaptación a estas dosis aplicadas. De acuerdo con Goumenaki *et al.* (2007) la explicación biológica para la reacción positiva del follaje

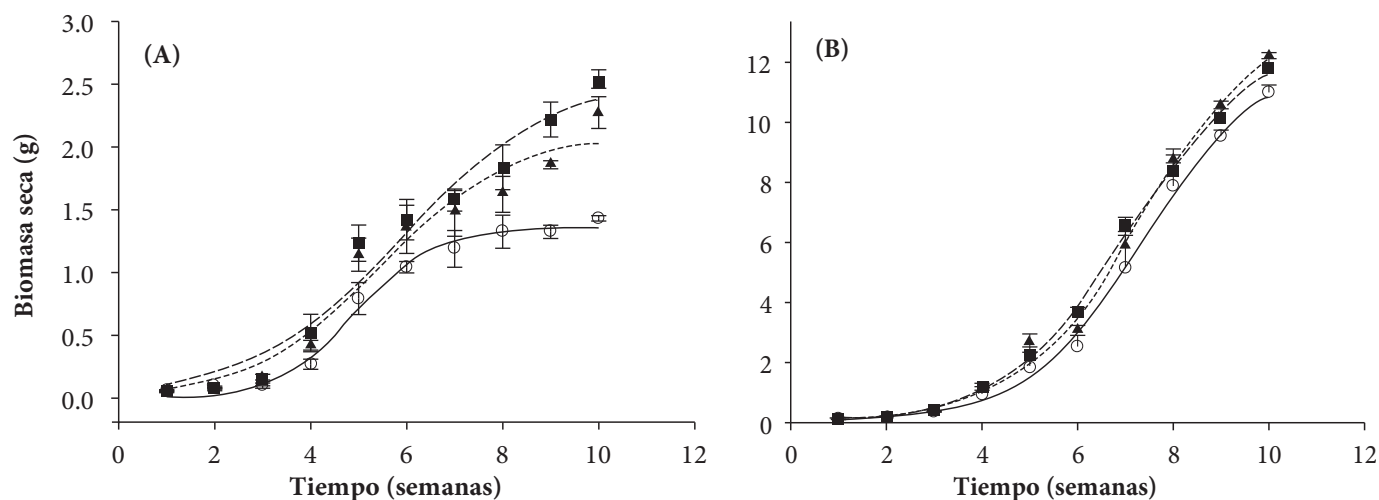


Figura 6. Acumulación de biomasa seca en raíz (A) y vástago (B) de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) durante 10 semanas cultivadas en invernadero en sistema hidropónico con raíz flotante. Círculos vacíos: testigo sin O₃, con aplicaciones semanales, por 6 semanas, de 2.66 mg L⁻¹ (cuadros negros) o 3.96 mg L⁻¹ (triángulos negros). En (A) el crecimiento de los tres tratamientos se ajustó a un modelo sigmoidal ($y = a / (1 + e^{-(x-x_0/b)})$) con r² entre 0.875 y 0.882; (B) modelo sigmoidal con r² entre 0.918 y 0.981.

a concentraciones umbrales de O₃ es que los tejidos exhiben una capacidad intrínseca para: 1) Desintoxicar una fracción de la zona de flujo del gas; y 2) Reparar parte del daño oxidativo resultante del O₃ en el interior de los tejidos en reacciones celulares “clave”. Lo anterior es aplicable a las otras estructuras de la planta, como la raíz, que entren en contacto con el O₃. Estas respuestas de las plantas de lechuga al O₃ son acordes al concepto de hormesis.

Las dosis subletales de O₃ modifican positivamente el metabolismo de las plantas de lechuga y propician el incremento significativo de su crecimiento y productividad.

CONCLUSIONES

A pesar de la toxicidad del O₃ en los sistemas vegetales es posible identificar dosis que pueden ser clasificadas como subletales para el crecimiento de las plantas de lechuga en hidroponía. Las dosis subletales de O₃ utilizadas en el presente estudio estimularon el crecimiento en biomasa de las plantas de lechuga, con incrementos que pueden calificarse como discretos. En otras variables como longitud de órganos y número de hojas, no hubo incrementos detectables, pero en ningún caso las dosis subletales produjeron síntomas de toxicidad ni de reducción del crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Ainsworth E. A., A. Rogers and A. D. B. Leakey (2008) Targets for crop biotechnology in a future high-CO₂ and high-O₃ world. *Plant Physiology* 147:13-19.
 Allen H. P., R. C. Brian, J. E. Downes, G. C. Mees and R. H. Springett

(1978) Selective herbicides. In: Peacock F. C. (ed.), Fifty Years of Agricultural Research (1928-1978). The Kynoch Press, Birmingham. pp:35-41.
 Allender W. J., G. C. Cresswell, J. Kaldor and I. R. Kennedy (1997) Effect of lithium and lanthanum on herbicide induced hormesis in hydroponically-grown cotton and corn. *Journal of Plant Nutrition* 20:81-95.
 Appleby A. P. (1998) The practical implications of hormetic effects of herbicides on plants. *Human and Experimental Toxicology* 17:270-271.
 Avnery S., D. L. Mauzerall, J. Liu and L. W. Horowitz (2011) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. *Atmospheric Environment* 45:2284-2296.
 Babor J. A. y J. Ibarz (1974) Química General Moderna. Ed. Marín Barcelona, España. 1144 p.
 Belz R. G. and H. P. Piepho (2012) Modeling effective dosages in hormetic dose-response studies. *Plos* 7:1-10.
 Belz R. G. and H. P. Piepho (2013) Variability of hormetic dose responses of the antiauxin PCIB on *Lactuca sativa* in a plant bioassay. *Weed Research* 53:418-428.
 Biswas D. K., M. H. Xu, Y. G. Li, M. Z. Liu, Y. H. Chen, J. Z. Sun and G. M. Jiang (2008) Assessing the genetic relatedness of higher ozone sensitivity of modern wheat to its wild and cultivated progenitors/relatives. *Journal of Experimental Botany* 59:951-963.
 Booker F. L., R. Muntiferling, M. McGrath, K. O. Burkey, D. Decoteau, E. L. Fiscus, W. Manning, S. Krupa, A. Chappelka and D. A. Grantz (2009) The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology* 51:337-351.
 Brosche M., E. Merilo, F. Mayer, P. Pechter, I. Puzorjova, G. Brader, J. Kangasjarvi and H. Kollist (2010) Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant, Cell and Environment* 33:914-925.
 Calabrese E. and L. Baldwin (1999) Chemical hormesis: It's historical foundations as a biological hypothesis. *Toxicologic Pathology* 27:195-216.
 Calabrese E. J. and L. A. Baldwin (2003) Hormesis: the dose-response revolution *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*

- 43:175-197.
- Cedergreen N., J. C. Streibig, P. Kudsk, S. K. Mathiassen and S. O. Duke (2007) The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response* 5:150-162.
- Fiscus E. L., L. Booker and K. Burkey (2005) Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environment* 28:997-1011.
- Frei M., J. P. Tanaka, C. P. Chen and M. Wissuwa (2010) Mechanisms of ozone tolerance in rice: characterization of two QTLs affecting leaf bronzing by gene expression profiling and biochemical analyses. *Journal of Experimental Botany* 61:1405-1417.
- Garzon C. D. and F. J. Flores (2013) Hormesis: Biphasic Dose-Responses to Fungicides in Plant Pathogens and their Potential Threat to Agriculture. In: Nita M. (ed.), Fungicides- Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World. InTech, Europe. pp. 311-328.
- Goumenaki E. and J. Barnes (2009) Impacts of tropospheric ozone on growth and photosynthesis of lettuce. *Acta Horticulturae* 817:169-176.
- Goumenaki, E., I. González F., A. Papanikolaou, D. Papadopoulou, C. Askianakis, G. Kouvarakis and J. Barnes (2007) Derivation of ozone flux-yield relationships for lettuce: A key horticultural crop. *Environmental Pollution* 146:699-706.
- López-Díazguerrero N. E., P. V. Y. González, R. J. Hernández-Bautista, A. Alarcón-Aguilar, A. Luna-López y F. M. Königsberg (2013) Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta Médica de México* 149:438-447.
- Migliore L., S. Cozzolino and M. Fiori (2003) Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52:1233-1244.
- Mills G., A. Buse, B. Gimeno, V. Bermejo, M. Holland and L. Emberson (2007) A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmospheric Environment* 41:2630-2643.
- Mills G., M. Holland, A. Buse, S. Cinderby, F. Hayes, L. Emberson, H. Cambridge, M. Ashmore and A. Terry (2003) Introducing response modifying factors into a risk assessment for ozone effects on crops in Europe. In: Karlsson, P. E., G. Sellden and H. and Pleijel (eds.). Establishing Ozone Critical Levels II. UNECE Workshop Report. IVL Report B 1523. IVL Swedish Environmental Research Institute, Gothenburg, pp.74-88.
- Nagendra-Prasad D, N. Sudhakar, K. Murugesan and N. Mohan (2009) Application of ozone on induction of resistance in *Vigna unguiculata* cv. Co 6, against *Fusarium wilt*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42:633-642.
- Olszyk D. M., G. Kats, C. L. Morrison, P. J. Dawson, I. Gocka, J. Wolf and C. R. Thompson (1990) Valencia orange fruit yield with ambient oxidant or sulfur dioxide exposures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115:878-883.
- Picchi V., M. Iritia, S. Quaroni, M. Saracchic, P. Viola and F. Faoro (2010) Climate variations and phenological stages modulate ozone damages in field-grown wheat. A three-year study with eight modern cultivars in Po Valley (Northern Italy). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 135: 310-317.
- Sawada H. and Y. Kohno (2009) Differential ozone sensitivity of rice cultivars as indicated by visible injury and grain yield. *Plant Biology* 11:70-75.
- Sudhakar N., D. Nagendra-Prasad, N. Mohan and K. Murugesan (2007) Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against cucumber mosaic virus by using ozone. *Journal of Virological Methods* 139:71-77.
- Sudhakar N., D. Nagendra-Prasad, N. Mohan, B. Hill, M. Gunasekaran and K. Murugesan (2011) Assessing influence of ozone in tomato seed dormancy alleviation. *American Journal of Plant Sciences* 2:443-448.
- Wiedman S. J. and A. P. Appleby (1972) Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides. *Weed Research* 12:65-74.