

**MICROMORFOLOGÍA DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE PLANTAS SANAS Y
ENFERMAS DE *Agave tequilana* Weber**

ROSA ELIA MARGARITA HERNÁNDEZ VALENCIA

T E S I S

**Presentada como requisito parcial
para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
ÁREA: HORTICULTURA**

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

PROGRAMA DE POSGRADUADOS

Buenvista, Saltillo, Coah.

JUNIO 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

MICROMORFOLOGÍA DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE PLANTAS SANAS Y
ENFERMAS DE *Agave tequilana* Weber

TESIS

POR

ROSA ELIA MARGARITA HERNÁNDEZ VALENCIA

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como
requisito parcial para otorgar el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS, ÁREA: HORTICULTURA

COMITE PARTICULAR

Asesor principal:

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor :

Ph.D. Homero Ramírez Rodríguez

Asesor :

Ph.D. Alfonso Reyes López

Asesor :

Dr. José Angel Villarreal Quintanilla

Asesor :

Dr. Valentín Robledo Torres

Dr. Jerónimo Landeros Torres
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Junio 2005

AGRADECIMIENTOS

Innumerables son las personas que me dieron su apoyo. A todos ustedes vaya un abrazo fraternal en reconocimiento de su solidaridad y mi profunda gratitud por su valiosa comprensión, generosidad, tiempo y dedicación a mis múltiples solicitudes de apoyo

Expreso mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que laboran en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, *Campus* Monterrey y que gracias a su valiosísima colaboración logre el acceso al equipo, laboratorios y espacios físicos durante la realización de mis estudios de doctorado.

Expreso mi profundo agradecimiento y admiración al Dr. Adalberto Benavides Mendoza mi asesor principal, poseedor de una grandeza intelectual y rectitud extraordinaria, forjador de mentes científicas, motivador a explorar más allá de los límites convencionales del conocimiento científico. Honrada me siento por formar parte de sus discípulos.

A mi comité de asesores: PhD Homero Ramírez Rodríguez, PhD Alfonso Reyes López, Dr. José Angel Villarreal Quintanilla y Dr. Valentín Robledo Torres, mi agradecimiento por cada una de sus enseñanzas.

Al Ph D Mario Moisés Alvarez actual Director del Centro de Biotecnología del ITESM, *Campus* Monterrey, quién compartió su notable experiencia y proporcionó todos los privilegios inherentes para tener una excelente calidad de tiempo y espacio físico durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. Muchísimas gracias por su apoyo incondicional en mis difíciles circunstancias.

Al Dr. Ignacio del Real Laborde, por las facilidades brindadas para la toma de muestras vegetales, así como por el obsequio de hijuelos de *Agave tequilana*.

Al Q.B.P. José Ruíz Ordóñez que compartió su experiencia y proporcionó el valioso apoyo logístico de los laboratorios de Microscopía e Histología de la Facultad de Medicina y de la importantísima gestión para el uso del Microscopio Electrónico de Barrido de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, pieza clave de incalculable valor para la realización de esta investigación.

Al Biol. M.C. Gerónimo Cano Cano, por orientarme a través de su valiosa experiencia durante el desarrollo de esta investigación.

A la Ph D. Rosamaría Lopez Franco, quien facilitó el uso del microscopio óptico (BMax Olympus BX 50) y del analizador de imágenes Argus 20 (Hamamatsu) y por el apoyo, facilidades, sugerencias y recomendaciones otorgadas durante su

pasada gestión como Directora del Centro de Biotecnología del ITESM, *Campus Monterrey*.

Al Dr. Jorge Hernández de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por su valiosa ayuda al inicio de la investigación.

A Miriam Robledo Pérez del Centro de Biotecnología, a Marina Gaona García del Área de Agricultura y Tecnología de Alimentos, a Gabriela Lizardi Trujillo del Centro de Agronegocios del ITESM, *Campus Monterrey* y a Jemima Hernández Jiménez de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Muchísimas muchísimas gracias por todas las facilidades otorgadas y por brindarme su valiosa amistad en todos estos momentos.

Al Dr. Mario Moisés Alvarez, al Dr. Alfredo Navarro Ruiz de las Cuevas, a la Dra. Elsy Molina Solís y al Dr. Gabino de Alba Flores del ITESM, *Campus Monterrey* por su importantísima colaboración en la parte estadística.

Al Lic. Abenamar de la Cruz González y al M.C. José Gaytán Gamez del Centro de Agronegocios del ITESM, *Campus Monterrey*, por su valiosa ayuda en la asesoría de los aspectos económicos y técnicos, así como el apoyo brindado durante el desarrollo de mis estudios , principalmente gracias por su amistad.

A mis queridos amigos y colegas: Larry R. Lenwell, Francisco Sánchez Barra, Oscar González Ramírez, Dora Elia Hernández Narváez, Dora Bertha Rojas Herrera, Homero Gaona, Mario Manzano Camarillo, María Teresa Collados, Marcela González Alvarez, Ada Ita Garay, Claudia Ramos Silva, Rubén González Iglesias, Santiago Salazar Hernández, Rosalinda Morales Montemayor, Rubén Marroquín Flores, Oscar Briones Villarreal, José Marmolejo Monsivaís, Gabriela Ortiz Maciel, Consuelo Hori Ochoa, Hugo Hernández Herrera, Ruth Dávila Salinas, Florentino Salas García, Jorge Monsivaís. Por otra parte, reciban mi sincera disculpa a las personas que omití involuntariamente.

A todos los que están en el camino del conocimiento mi gesto de solidaridad para el logro de sus metas. ¡Nunca desistan!

DEDICATORIA

Honor y Respeto

A mi Abuelo Valentín, Indígena Yaki de Sonora, México

A Mi Madre Margarita Valencia Rodríguez

Mujer ejemplar y luchadora incansable que antepone su sabiduría y buen humor ante las cotidianidades y adversidades de la vida. Humildad y grandeza se conjuntan en ti, ¡pilar de mi vida!

In Memoriam

José Federico Hernández Contreras

El amor trascendió a tu materia y perdura en mi corazón.
Gracias por mostrarme el camino de la honradez y del trabajo constante.
Papá, ¡Hasta Siempre!

A Mis Hijos

Dario Edgar y Oscar Julián

Con profundo amor y agradecimiento por sus enseñanzas en mi vida diaria

A Mis Hermanos

Patricia Guadalupe, Edith Concepción y Federico

Con entrañable amor y profundo agradecimiento por todo su apoyo y generosidad

A Mis Familiares Con Amor

Adrián Marcel, Selene y al pequeño Diego Adrián, a Rosario, Atzcalli, Kuautzin y Chak Julián. A mis queridas Tías Fina y Socorro.

COMPENDIO

MICROMORFOLOGÍA DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE PLANTAS SANAS Y
ENFERMAS DE *Agave tequilana* Weber

POR

ROSA ELIA MARGARITA HERNÁNDEZ VALENCIA

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
ÁREA: HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENA VISTA, SALTILLO, COAHUILA. JUNIO 2005

DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA - Asesor -

Palabras claves: *Agave tequilana*, cutícula, papilas cuticulares, tapón de cera, cristales, oxalato de calcio, células epidérmicas, células anexas, células oclusivas, complejo estomático y papilas estomáticas, cámara supraestomática, cámara subestomática, densidad estomática, índice estomático y distancia interestomática.

En esta investigación, el propósito principal fue analizar la morfología foliar de la epidermis del *Agave tequilana* con interés particular en las características anatómicas y la organización del complejo estomático en plantas sanas y

enfermas de individuos jóvenes y adultos. Plantas, de Tequila Jalisco, México fueron muestreadas y preparadas para estudios en microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido. Las observaciones fueron para grosor de cutícula, papilas cuticulares, tapón de cera sobre la cámara supraestomática, presencia de cristales, células epidérmicas, células anexas, células oclusivas, morfología del complejo estomático y papilas estomáticas, cámara supraestomática, cámara subestomática, densidad estomática, índice estomático y distancia interestomática. Las principales diferencias fueron: las plantas adultas enfermas tienen en general la cutícula delgada en la superficie foliar adaxial. En plantas sanas, la cantidad de cera dentro de la cavidad supraestomatal fue similar para ambas superficies de la hoja, con una cantidad más alta dentro de las plantas adultas. Las plantas enfermas, tienen la cantidad más grande de cera en la superficie foliar abaxial. Los cuerpos del oxalato del calcio se observaron en concentraciones más altas en la superficie foliar de plantas enfermas. El complejo estomático es tetracístico, con cuatro células anexas en la superficie de la hoja. Estas células se proyectan en el tejido foliar, formando una cavidad o una cámara supraestomática. En el fondo de esta cavidad están las células oclusivas del estoma. Los cambios morfológicos observados en el grosor de la cutícula, de las diferencias en el tamaño de los cristales y de la acumulación de ceras, pueden representar un indicador de un estrés impuesto por factores biótico y abiótico.

ABSTRACT

MICROMORPHOLOGY OF THE FOLIAR EPIDERMIS OF HEALTHY AND DISEASED
PLANTS OF *Agave tequilana* Weber

BY

ROSA ELIA MARGARITA HERNÁNDEZ VALENCIA

DOCTOR IN AGRICULTURAL SCIENCES
ÁREA : HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENA VISTA, SALTILLO, COAHUILA. JUNIO 2005

DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA - Advisor -

Keywords: *Agave tequilana*, cuticle thickness and papillae, wax, crystals, calcium oxalate, epidermic cells, subsidiary cells, guard cells, stomatal complex and papillae, suprastomatal chamber, substomatal chamber, stomatal density, the stomatal index and interstomatal distance.

In this research, the main purpose was to analyze the foliar morphology of the *Agave tequilana* epidermis with particular interest in epicuticular characteristics and organization of stomatal complex in healthy and diseased

plants from young and adult individuals. Plants from Tequila, Jalisco, México were sampled and prepared for light microscopy, transmission electronic microscopy and scanning electronic microscopy studies. Observations were made for cuticle thickness and papillae, wax on suprastomatal cavity, presence of crystals, epidermic cells, subsidiary cells, guard cells, morphology of the stomatal complex and papillae, suprastomatal chamber, substomatal chamber, stomatal density, the stomatal index as well as the interstomatal distance. The main differences were: the adult diseased plants had in general thin cuticles on the adaxial leaf surface. In healthy plants, the amount of wax within the supraestomatal cavity was similar for both leaf surfaces, with higher amount within adult plants. Diseased plants, had larger amount of wax on the abaxial surface. Calcium oxalate bodies were observed in higher concentrations on leaf surface of diseased plants. The stomatal complex is tetracytic, with four subsidiary cells on the leaf surface. These cells project into the leaf tissue, forming a cavity or suprastomatal chamber. At the bottom of the cavity are the guard cells of the stomata. The observed morphologic changes in the thickness of cuticle, of the differences in size of crystals and the wax accumulation, can represent an indicator of a stress imposed by biotic and abiotic factors.

ÍNDICE DE CONTENIDO

COMPENDIO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	2
Objetivos Particulares.....	3
Justificación	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Generalidades y Morfología de Microestructuras Epidérmicas	4
Epidermis.....	4
Funciones	5
Cutícula.....	6
Cera	7
Cristales.....	8
Distribución	9
Formas.....	9
Estomas (componentes y arquitectura).....	10
Complejo estomático	11
Densidad Estomática.....	12
Modelo de Estudio: <i>Agave tequilana</i> Weber.....	13
Origen Geográfico	13
Importancia Económica	13
Superficie Plantada.....	13
Superficie Cosechada.....	14
Superficie Siniestrada.....	15
Producción	15

Volumen de Producción (ton.)	15
Valor de la Producción (\$)	15
Importancia Socioeconómica.....	15
Impacto Social	15
Estructura y Tendencia de las Exportaciones de Tequila.....	16
Generalidades del Cultivo de <i>Agave tequilana</i>	16
Características Ambientales del Cultivo	17
Enfermedades del Cultivo.....	18
Enfermedad y Síntomas	18
Agentes causales.....	19
Hongos.....	19
Bacterias	19
Insectos.....	19
Nematodos.....	20
Clasificación de <i>Agave tequilana</i>	20
Familia Agavaceae	20
Subgénero Agave	21
Grupo Rigidae.....	21
Agave tequilana Weber.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Selección de Plantas por Edad y Origen de Muestras Vegetales	24
Categorización de Plantas por Condición de Salud (sanas y enfermas).....	24
Características de los Cortes Vegetales	25
Categorización de Grupos de Plantas y Combinación de Variables en <i>Agave tequilana</i>	26
Microestructuras Epidérmicas y Repeticiones Evaluadas.....	27
Tratamiento de Muestras Vegetales para Microscopía.....	27

Improntas Foliare	27
Microscopía Óptica (MO)	28
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	28
Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	28
Cálculo de Densidad de Estomas y Células Epidérmicas	29
Cálculo de Índice Estomático	30
Mediciones de Microestructuras Epidérmicas	30
Determinación de la Naturaleza Química de los Cristales	31
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS	32
Descripción de Microestructuras Epidérmicas Foliare de <i>Agave tequilana</i>	32
Superficie Abaxial Foliar de Plantas Adultas Sanas de <i>Agave tequilana</i>	33
Superficie Adaxial Foliar de Plantas Adultas Sanas de <i>Agave tequilana</i>	34
Superficie Abaxial Foliar de Plantas Jóvenes Sanas de <i>Agave tequilana</i>	35
Superficie Adaxial Foliar de Plantas Jóvenes Sanas de <i>Agave tequilana</i>	36
Superficie Abaxial Foliar de Plantas Adultas Enfermas de <i>Agave tequilana</i>	37
Superficie Adaxial Foliar de Plantas Adultas Enfermas de <i>Agave tequilana</i>	38
Superficie Abaxial Foliar de Plantas Jóvenes Enfermas de <i>Agave tequilana</i>	39
Superficie Adaxial Foliar de Plantas Jóvenes Enfermas de <i>Agave tequilana</i>	40
Análisis Estadístico de Microestructuras Epidérmicas Foliare de <i>Agave tequilana</i>	41
Papilas Estomáticas	41
Cutícula	43

Células Epidérmicas	46
Densidad de Células Epidérmicas	47
Cristales	49
Complejo Estomático	51
Células Anexas	53
Cámara Supraestomática	55
Tapón de Cera	57
Células Oclusivas	59
Cámara Subestomática	60
Distancia Interestomática.....	62
Densidad Estomática	64
Índice Estomático.....	66
DISCUSIÓN	68
Presencia de Oxalato de Calcio	70
Cuerpos de Oxalato de Calcio.....	71
Cristales de Oxalato de Calcio	71
Presencia de Ceras	76
Cutícula	78
Papilas Cuticulares	83
Estado del Complejo Estomático.....	84
Células Anexas.....	86
Papilas estomáticas.....	87
Células Oclusivas	88
Cámara Subestomática	88
Cámara Supraestomática.....	89
Abertura de la Cavidad Supraestomática	89

Dimensiones del Tapón de Cera	90
Densidad Estomática.....	90
Distribución de Estomas	93
Índice Estomático	94
Distancia Interestomática	95
Dimensiones y Densidad de Células Epidérmicas	96
CONCLUSIÓN	97
LITERATURA CITADA.....	99
APÉNDICE	111

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Información económica del cultivo de <i>Agave tequilana</i> por entidad federativa de la Republica Mexicana del año 1998 al 2002.14
3.1	Grupos por combinación de variables: edad, condición de salud y superficie foliar.26
3.2	Microestructuras epidérmicas foliares y número de repeticiones evaluadas en <i>Agave tequilana</i>27
4.1	Análisis de varianza para papilas estomáticas en <i>Agave tequilana</i>42
4.2	Análisis de varianza para grosor de cutícula en <i>Agave tequilana</i>44
4.3	Análisis de varianza para células epidérmicas (área) en <i>Agave tequilana</i>47
4.4	Análisis de varianza para densidad de células epidérmicas en <i>Agave tequilana</i>48
4.5	Análisis de varianza para cristales en <i>Agave tequilana</i>50
4.6	Análisis de varianza para complejo estomático en <i>Agave tequilana</i>53
4.7	Análisis de varianza para células anexas en <i>Agave tequilana</i>54
4.8	Análisis de varianza para cámara supraestomática en <i>Agave tequilana</i>57
4.9	Análisis de varianza para tapón de cera en <i>Agave tequilana</i>58
4.10	Análisis de varianza para células oclusivas en <i>Agave tequilana</i>60
4.11	Análisis de varianza para cámara subestomática en <i>Agave tequilana</i>61
4.12	Análisis de varianza para distancia interestomática en <i>Agave tequilana</i>64
4.13	Análisis de varianza para densidad estomática en <i>Agave tequilana</i>65
4.14	Análisis de varianza para índice estomático en <i>Agave tequilana</i>67
5.1	Análisis cualitativo de cristales, ceras, cuerpos de oxalato de calcio y papilas estomáticas en <i>Agave tequilana</i>75
5.2 a	Comparación de microestructuras epidérmicas foliares en <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave spp</i>84
5.2 b	Comparación de microestructuras epidérmicas foliares en <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave spp</i>85

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
3.1	Esquema de <i>Agave tequilana</i> mostrando los tipos de superficie foliar.26
4.1	Superficie abaxial foliar de plantas adultas sanas de <i>Agave tequilana</i>33
4.2	Superficie adaxial foliar de plantas adultas sanas de <i>Agave tequilana</i>34
4.3	Superficie abaxial foliar de plantas jóvenes sanas de <i>Agave tequilana</i>35
4.4	Superficie adaxial foliar de plantas jóvenes sanas de <i>Agave tequilana</i>36
4.5	Superficie abaxial foliar de plantas adultas enfermas de <i>Agave tequilana</i>37
4.6	Superficie adaxial foliar de plantas adultas enfermas de <i>Agave tequilana</i>38
4.7	Superficie abaxial foliar de plantas jóvenes enfermas de <i>Agave tequilana</i>39
4.8	Superficie adaxial foliar de plantas jóvenes enfermas de <i>Agave tequilana</i>40
4.9	Área de papilas estomáticas por edad, condición de salud y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>42
4.10	Grosor de cutícula por edad y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>45
4.11	Grosor de cutícula por edad y salud en <i>Agave tequilana</i>45
4.12	Área de células epidérmicas por edad, salud y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>47
4.13	Densidad de células epidérmicas por edad, salud y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>48
4.14	Área de cristales por edad y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>50
4.15	Área de complejo estomático por edad en <i>Agave tequilana</i>53
4.16	Área de células anexas en el complejo estomático por edad, salud y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>55
4.17	Área de cámara supraestomática por edad y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>57
4.18	Área de tapón de cera por edad en <i>Agave tequilana</i>59
4.19	Área de células oclusivas por superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>60
4.20	Área de cámara subestomática por edad en <i>Agave tequilana</i>62
4.21	Distancia interestomática por edad, salud y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>64
4.22	Densidad estomática por edad y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>66
4.23	Índice estomático por edad y superficie foliar en <i>Agave tequilana</i>67

INTRODUCCIÓN

La epidermis de la planta es la interfase entre los estímulos ambientales (plagas, enfermedades, contaminantes industriales y agroquímicos, así como a diversos tipos de estrés ambiental), particularmente, la cutícula vegetal actúa como la interfase entre los tejidos vegetales y la atmósfera (Jetter *et al.*, 2000). Como tejido multifuncional - la epidermis - , tiene una participación relevante en las relaciones hídricas, de protección (herbívoros) y atracción de polinizadores. La complejidad de estas funciones están determinadas por numerosas células especializadas, que muestran diferentes grados de especialización morfológica (Mauseth,1988, Glover, 2000). Las células epidérmicas constituyen tanto el sustrato primario para la acción de la señalización ambiental (Bird y Gray, 2003) como un vehículo para la absorción de agroquímicos, reguladores del crecimiento y compuestos señalizadores (Benavides, 2003).

Los rasgos anatómicos individuales de células o tejidos del cuerpo vegetal constituyen la estructura que participa funcionalmente en los complejos procesos fisiológicos. No es un hecho nuevo de que existe una interrelación muy cercana entre estructura y función vegetal (Dickison ,1999). La respuesta de adaptación de las plantas a los numerosos estímulos ambientales negativos cuya presión es constante se ve reflejado en cambios bioquímicos, fenotípicos,

de reducción de productividad, y de una merma considerable en las plantas cultivadas (Benavides, 2003).

En la actualidad son muy importantes los progresos en las investigaciones para reducir estas respuestas en las plantas cultivadas. Una mejor comprensión de la relación que existe entre la estructura anatómica y el efecto de las influencias externas del medioambiente sobre las plantas, permitirá generar e interpretar con apoyo de la microscopía moderna resultados básicos de anatomía vegetal de especies de importancia económica, en apoyo a las estrategias para aumentar la tolerancia de las plantas frente a diversos factores ambientales, y a su vez permitirán profundizar sobre los mecanismos intrínsecos de resistencia para disminuir las aplicaciones de pesticidas y reguladores sintéticos a cultivos de gran importancia económica (Benavides, 2003).

Por la importancia en México del cultivo de agave tequilero se utilizó como modelo de estudio las microestructuras epidérmicas foliares asociadas al complejo estomático de *Agave tequilana* Weber (Agavaceae).

Objetivo General

Documentar las diferencias anatómicas entre plantas cultivadas sanas y enfermas de *Agave tequilana*. Contribuir al conocimiento significativo que

aumente nuestra comprensión acerca de las respuestas de las plantas de *Agave tequilana* a los factores bióticos y abióticos.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar la anatomía epidérmica foliar de individuos cultivados sanos de *Agave tequilana*.
2. Caracterizar la anatomía epidérmica foliar de individuos cultivados enfermos de *Agave tequilana*.
3. Comparar los patrones anatómicos en epidermis de plantas cultivadas sanas y enfermas de *Agave tequilana*.

Justificación

De gran importancia son los estudios anatómicos del complejo estomático y de la epidermis foliar en *Agave tequilana* para profundizar en el diseño de estrategias eficientes para el manejo de patógenos y estrés ambiental.

REVISIÓN DE LITERATURA

Comprende características generales de la epidermis foliar y de las microestructuras asociadas al complejo estomático en *Agave tequilana*, modelo de estudio en esta investigación.

Generalidades y Morfología de Microestructuras Epidérmicas

Epidermis

La epidermis es la capa más exterior de las células de hojas, partes florales, frutos y semillas. Adicionalmente, la epidermis se encuentra en una posición única, es la interfaz entre el ambiente y la planta, por un lado los tejidos vegetales están protegidos y por el otro lado se encuentra el ambiente exterior, del cual la planta ejerce poco o ningún control. Un número grande de fuerzas, tanto biológicas como no biológicas, pueden actuar sobre la epidermis y el número de diferentes contingencias que cualquier célula simple puede afrontar es muy grande (Mauseth, 1988).

En relación con las diferentes funciones de la epidermis se pueden encontrar cuatro tipos básicos de células epidérmicas: las células epidérmicas ordinarias, las células oclusivas, tricomas o pelos y algunos tipos de apéndices. (Esau, 1972; Mauseth, 1988; Fahn, 1990).

Las especies del género *Agave* poseen epidermis típicas de plantas adaptadas a condiciones de aridez, con cutícula gruesa, revestimiento ceroso y estomas complejos. En promedio, la cutícula mide de 3 a 15 μm de espesor (Nobel, 1988) y la cutina es el principal componente, químicamente es un complejo de hidrocarburos poliméricos. En *Agave* como en otras plantas, la cutícula permite aislar e impermeabilizar la superficie foliar, particularmente esta característica vuelve impenetrable la cutícula a gases como el CO_2 y al vapor de agua (Wattendorff y Holloway, 1980 y 1982).

Funciones

La epidermis de una planta, cumple varias funciones como la limitación de la transpiración, la protección mecánica, el intercambio gaseoso (que se realiza a través de los estomas), el almacenaje de agua y de productos metabólicos (Essau, 1972). La interacción de las células epidérmicas proveen a la planta de una fuerza mecánica que permite tanto el crecimiento como la flexibilidad de los tejidos (Glover, 2000).

Cutícula

La cutícula vegetal es una membrana lipídica extracelular, compuesta por la cutina, un biopoliéster amorfo formado por condensación de hidroxiacidos de 16 y 18 átomos de carbono. Se ha identificado a la cutina como parte importante de la impregnación de las membranas (cutinización), sustancia grasa que determina la limitación de la transpiración por la epidermis. La capa interna de la cutina cubre las superficies exteriores de las células de la cutícula superficial y continúa a través de las aberturas de los estomas, cuyas células oclusivas están recubiertas en las superficies libres, además se localiza sobre las superficies libres del mesófilo de las hojas y sobre las membranas internas de la epidermis que están en contacto con los espacios aéreos internos (Esau, 1972).

La cutícula actúa como una interfase entre la célula epidérmica vegetal y el medio ambiente externo. De este modo, la membrana cuticular juega un papel clave en procesos tan importantes como la absorción y pérdida de agua desde el interior celular, la absorción y difusión de xenobióticos exógenamente aplicados y en la defensa frente al ataque de patógenos. El espesor de la cutícula puede variar en las diferentes especies, las condiciones ambientales pueden influir sobre su desarrollo (Mauseth, 1988).

Cera

Todas las partes aéreas de la superficie vegetal están cubiertas por ceras epicuticulares (capa de cera mas externa) que forman a su vez, una importante interfase entre la planta y el ambiente. Existen diferentes tipos de patrones de cristalización, composiciones químicas y relativa abundancia de ceras epicuticulares que cambian de acuerdo a la edad, desarrollo y medio ambiente en las plantas.

Las ceras epicuticulares poseen una alta cristalinidad, la composición química comprende una mezcla compleja de componentes hidrofóbicos, así como largas cadenas de hidrocarburos, terpenoides, cetonas, esterés, alcoholes alifáticos, ácidos grasos, aldehídos alifáticos y compuestos aromáticos. Algunos factores del microclima de la planta pueden afectar el contenido de ceras por ejemplo: temperaturas bajas (entre 15° y 25°C) incrementaron la cantidad de ceras por unidad de área foliar en *Brassica oleracea*, un efecto similar ocurre en *Nicotiana tabacum* (temperaturas entre 18° y 28° C) (Jenks y Ashworth, 1999).

Las propiedades físicas y químicas de las superficies cerosas en las plantas tienen una función muy importante en la resistencia vegetal a diversos factores del estrés ambiental como protección contra ataques de bacterias, hongos patógenos, virus e insectos fitófagos, (Jenks y Ashworth, 1999). Asimismo, las principales funciones de las ceras epicuticulares son: reducción de agua e intercambio gaseoso, reflexión de la radiación ultravioleta y control

de la temperatura, reducción de la contaminación por adhesión de sólidos y líquidos, temperaturas congelantes, daños mecánicos, lluvia ácida o daños por ozono. (Jenks y Ashworth, 1999; Hennig y Wirth, 2000).

La micromorfología de las ceras no depende generalmente de las condiciones ambientales, la diversidad de la estructura epicuticular parece ser genéticamente estable (Hennig y Wirth, 2000). La capa de ceras epicuticulares es la principal responsable de la difusión limitada de compuestos químicos de distinta naturaleza a través de la cutícula vegetal (Jenks y Ashworth, 1999).

Cristales

Los cristales están considerados como inclusiones no protoplásmicas en las células vegetales, la composición química de los cristales es principalmente de sales de calcio. En la gran mayoría de las familias vegetales son frecuentes los cristales de oxalato de calcio que son secretados como cristales monohídricos o trihídricos. Mientras que en Ulmaceae, Cannabaceae, Moraceae y Urticaceae los cristales están compuestos por carbonato de calcio (Dickison, 1999).

Distribución

Los cristales sobre todo de oxalato de calcio pueden encontrarse frecuentemente dentro de la célula, de la vacuola, (Essau, 1972), del citoplasma y de la pared celular, en ocasiones puede ser depositados en el exterior de la superficie de la pared celular. Cristales extracelulares se han registrado sobre las paredes exteriores del colénquima y las fibras del floema (Dickison, 1999).

Los cristales pueden ser abundantes en ciertas especies, en otras estos pueden tener una presencia consistente pero no abundantes hasta ausentes. Pueden estar restringidos a un tipo de célula o tejido o bien distribuidos en más de un tipo de estas estructuras (Dickison, 1999), los cristales de oxalato de calcio pueden disponerse uniformemente por todo el tejido o bien pueden estar más o menos restringidos a ciertas regiones del mismo (Essau, 1972).

Formas

Estiloides, es el nombre que reciben los cristales individuales y alargados, al menos cuatro veces el largo de su ancho. Rafidios, son cristales individuales agrupados en haces que están rodeados por una membrana, el haz entero frecuentemente se halla cubierto por una masa de mucílago, los rafidios se encuentran depositados dentro de largas células idioblásticas o idioblastos, conocidos también como sacos de rafidios (Dickison, 1999; Kostman *et al*, 2001). Estas células son notablemente grandes, en estado adulto se

convierten en estructuras muertas llenas de mucílago, parte de la membrana celular de los idioblastos permanece delgada y si el mucílago se hincha, la pared delgada se rompe y el rafidio es expulsado (Esau, 1972).

Otras formas son los cristales aciculares, pequeñas agujas que no se encuentran agrupados en haces. Las drusas y esferitos son formas compuestas agrupados en una masa esférica con puntas agudas dando la apariencia de una estrella.

Los cristales de forma prismática son individuales, rombohédricos u octohédricos, de varios tamaños, este tipo se encuentra frecuentemente en la madera. Finalmente la forma de cristal arena corresponde a una masa granular consistente de acumulaciones de partículas finas de microcristales diseminados en la célula con apariencia de arena (Dickison, 1999).

Estomas (componentes y arquitectura)

Los estomas -formados por un par de células oclusivas y la abertura situada entre éstas - son canales de comunicación e intercambio gaseoso (Willmer, 1983). En *Agave*, los estomas se presentan en ambas superficies de la hoja, (Gentry y Sauck, 1978; Nobel, 1988), condición que se conoce con el término anfistomática (Esau ,1972; Willmer ,1983). Debido a que la cutícula cerosa de la superficie foliar limita la difusión, la mayor parte del vapor de agua

y otros gases deben pasar por las aberturas (poros estomáticos u ostíolo) que hay entre las células oclusivas (Salisbury y Ross, 1992). El ostíolo conduce al interior de un amplio espacio intercelular llamado cámara subestomática, la cuál se continua con los espacios intercelulares del mesófilo (Esau,1972).

Complejo estomático

Complejo estomático o aparato estomático es un término incluyente para células oclusivas, el espacio entre las células oclusivas que se denomina poro estomático u ostíolo, un par de células anexas, subsidiarias, accesorias o adjuntas (células epidérmicas especializadas) situadas junto a las células oclusivas del estoma (Esau,1972; Salisbury y Ross,1992).

En el género *Agave*, el complejo estomático esta conformado por cuatro células epidérmicas (2 células polares y 2 células laterales) asociadas a las células oclusivas. La morfología de esta estructura vegetal en *Agave* es del tipo tetracístico, debido a la presencia constante de un grupo de cuatro células epidérmicas subsidiarias asociadas a las células oclusivas del estoma (Gentry y Sauck, 1978).

Densidad Estomática

La densidad estomática en varias especies de *Agave* varía de 30 a 50 estomas mm^2 (Gentry y Sauck, 1978), una menor frecuencia estomática ocurre en la superficie abaxial (10 estomas mm^{-2}) que en la superficie adaxial. Es importante señalar que la densidad estomática en *Agave* es mayor en la superficie adaxial (25%) en comparación con la superficie abaxial (Nobel, 1988).

La densidad estomática de las especies del género *Agave* es comparativamente inferior a la densidad presente en otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Essau, 1972; Nobel, 1983).

En estos grupos, los valores comunes alcanzan de 100 a 300 estomas mm^{-2} ; en avena, trigo, maíz, alfalfa y tomate la densidad estomática para la superficie adaxial oscila entre 25 y 169, mientras que en el lado abaxial los valores fluctúan de 23 a 203 estomas mm^{-2} (Verdugo *et al.*, 1999).

En otras especies como el manzano es posible encontrar valores superiores a 1000 estomas mm^{-2} (Rodríguez *et al.*, 2002). Específicamente en monocotiledóneas como el ajo (*Allium sativum* L.) se registran valores de 113 estomas mm^{-2} en el lado adaxial y 112 estomas mm^{-2} en el abaxial (Verdugo, *et al.* 1999); para el trigo (*Triticum aestivum*) los rangos se registran

de 84 a 132 y de 74 a 95, superficie adaxial y abaxial respectivamente (Benavides *et al.*, 2003).

Modelo de Estudio: *Agave tequilana* Weber

Origen Geográfico

Agave tequilana es fuente de la materia prima para la elaboración de tequila, bebida alcohólica tradicional. El centro de distribución geográfica de esta especie se encuentra en el municipio de Tequila, Jalisco, México, (Standley, 1926; Gentry, 1982). En el año 1600 se registra la primera plantación en la región de Nueva Galicia (Jalisco), actualmente el cultivo de esta especie ha trascendido a otras entidades mexicanas como Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (Yoldi, 2000; Flores *et al.*, 2002).

Importancia Económica

Superficie Plantada

El Estado de Jalisco tiene la mayor superficie de cultivo con *Agave tequilana* (78,895.28 Ha). Tres principales regiones abarcan las zonas protegidas por la denominación de origen: la región Centro, con 23, 672 Ha. de cultivo y 66´008,032 plantas; la región Altos con 36,840 Ha. de cultivo y 131´272,556 de plantas y la región Sur con 411 Ha. y 1´457, 432 de plantas

(Flores *et al*, 2002). En los últimos años, otros Estados de la República Mexicana han introducido este cultivo (Cuadro 2.1), entre estos se encuentra Nayarit (7519.5 Ha.), Guanajuato (1,090.56 Ha), Michoacán (301.09 Ha) y Tamaulipas (6,924 Ha.) (www.agrotamaulipas.gob.mx.; Consejo Regulator del Tequila; SIACON, 2002).

Cuadro 2.1 Información económica del cultivo de *Agave tequilana* por entidad federativa de la Republica Mexicana del año 1998 al 2002. (Fuente: Elaborado con datos de SIACON 2002).

Año	Superficie sembrada (Ha.)	Superficie cosechada	Superficie siniestrada	Volumen de Producción (Ton.)	Valor de Producción (\$)	Estado
1998	127	0	127	0	0	Guanajuato
1999	594	0	594	0	0	
2000	594	90	504	4725	34200000	
2001	841.99	128	713.99	8710	126149978.5	
2002	1090.56	0	1090.56	0	0	
1998	22666	3880	18786	403205	289847946.3	Jalisco
1999	21132	2588	18544	349425	430827048	
2000	62408	3923	58485	455132	3080561497	
2001	72549	2998	69551	311891	3212107648	
2002	78895	2082	76813.28	217671.95	2517322292	
1998	14	0	14	0	0	Michoacán
1999	18.9	0	18.9	0	0	
2000	93.3	0	93.3	0	0	
2001	134.3	0	134.3	0	0	
2002	301.09	0	301.09	0	0	
1998	91	0	91	0	0	Nayarit
1999	974	0	974	0	0	
2000	1055.25	0	1055.25	0	0	
2001	3832.5	0	3832.5	0	0	
2002	7519.5	5	7514.5	500	3500000	
1998	56	56	0	672	524160	Tamaulipas
1999	56	56	0	1232	1355200	
2000	300	300	0	770	7700000	
2001	0	0	0	0	0	
2002	0	0	0	0	0	

Superficie Cosechada

El Estado de Jalisco en el año 2000 cosechó, 3923 Ha, en el año 2001, 2998 Ha y en el año 2002, se reportaron 2082 Ha. El Estado de Guanajuato en el año 2000 cosechó, 90 Ha y en el 2001, 128 Ha; Nayarit registró cinco Ha de superficie cosechada en el año 2002. Mientras que en los Estados de

Michoacán y Tamaulipas aun no se registra superficie cosechada (Cuadro 2.1) (SIACON, 2002).

Superficie Siniestrada

Jalisco es el Estado con mayor cantidad de superficie siniestrada. En el año de 1998 se registraron 18786 Ha, misma que aumentó hasta alcanzar en el año 2002, la superficie de 76813.28 Ha afectadas (Cuadro 2.1), (SIACON, 2002).

Producción

Volumen de Producción (ton.)

La producción en el año 1998, fue de 403,205 toneladas, misma que en los años siguientes se redujo considerablemente, para el año 2002, este volumen fue de 217,617.95 toneladas, (Cuadro 2.1) (SIACON,2002).

Valor de la Producción (\$)

Jalisco, destacó en este rubro, en el año 2002 el valor de la producción ascendió a \$2517, 322,292 (Cuadro 2.1) (SIACON, 2002).

Importancia Socioeconómica

Impacto Social

En el Estado de Jalisco, la región Centro es la zona donde se concentra la mayor cantidad de productores, aquí se agrupan 1,786 productores. La región

Altos es la segunda en importancia con 1,428 productores, mientras que la región Sur cuenta con 23 productores (Flores *et al.*, 2002).

Estructura y Tendencia de las Exportaciones de Tequila

Estados Unidos de América es el país que mantiene con México una importante demanda de importaciones de tequila. A partir de 1992, las importaciones de EUA, mostraron un considerable incremento año con año. En el período de enero a marzo del 2002 la cifra alcanzó la cantidad en miles de US \$79,084.00, mientras que la venta de este producto mexicano en el mismo período en países como Alemania fue de US \$ 3,215.00, en los países bajos US \$3,355.00, Francia US \$1,317.00, Suiza US \$912.00, España US \$763.00, Canadá US \$ 700.00, Japón US \$517.00, Reino Unido US \$376.00 y Bélgica US \$218.00 (Apéndice A). United Status Internacional Trade Commission (2004) <http://dataweb.usitc.gov> y Secretaria de Economía (2004) <http://www.economia-snci.gob.mx>

Generalidades del Cultivo de *Agave tequilana*

El propágulo de plantación en *Agave tequilana* son los brotes o clones “hijuelos” que se separan de la planta madre, se seleccionan y se plantan de acuerdo al proceso tradicional que se realiza desde el año 1600. En los últimos años se han incorporado a las parcelas, lotes de material vegetativo libre de virus y enfermedades obtenidos de cultivo *in vitro*.

La planta requiere de un período aproximado de 8 a 10 años para lograr la producción óptima de azúcares necesarios para la elaboración del tequila. La parte vegetal que se utiliza en el proceso es el tallo reducido conocido como “piña” o “corazón de agave”. Los tallos o piñas se cosechan antes de la época de floración de la planta, ya que esta especie es monocárpica. Información más detallada sobre el cultivo de *Agave tequilana*, estadísticas e industria del tequila, se encuentra en el sitio web del Consejo Regulador del Tequila (CRT) (www.crt.org.mx).

Características Ambientales del Cultivo

Agave tequilana es una especie con requerimientos ambientales específicos sobre todo para lograr una buena producción de azúcares en la planta. Los suelos de cultivo deben ser arcillosos, con buen drenaje, ricos en minerales de origen volcánico, con bajo contenido de calcio.

Esta especie crece favorablemente en regiones de clima estable y una temperatura media aproximada de 20 °C, las heladas afectan tanto a plantas jóvenes como a las plantas adultas.

(www.amatitan.com/cultivoagaveintegral/cultivoagaveintegral.htm).

Enfermedades del Cultivo

Enfermedad y Síntomas

La principal enfermedad en *Agave tequilana* ha recibido algunas denominaciones entre las que se encuentran “la marchitez del agave “, “la pudrición del cogollo” (Moreno *et al.*, 2002) y “la tristeza y muerte del agave “(Fucikovsky 1999 a y b, 2002). Aproximadamente un 23% de las plantas de *Agave tequilana* en Jalisco son afectadas por la enfermedad de la tristeza y muerte del agave (Fucikovsky 1999 b, 2002). Los síntomas que se manifiestan corresponden entre otros en el aspecto exterior de la planta, a cambios de color de verde azul a gris o a verde amarillento, al enrollamiento de las hojas (llamado acigarramiento), a la marchitez de la hoja (síntoma que se presenta simultáneamente al enrollamiento de la hoja). Así mismo, posteriores pudriciones semiblandas se presentan tanto en el cogollo como en la base de las hojas (Moreno *et al.*, 2002).

En los últimos años, se ha presentado una problemática de sanidad en los cultivos de *Agave tequilana*, la enfermedad de rápida propagación, principalmente es de origen parasitario, aunque no se descartan efectos de deficiencias de minerales o desórdenes causados por estrés ambiental.

Agentes causales

Las enfermedades en el *Agave tequilana* son principalmente de tipo parasitarias cuyos agentes causales son hongos, bacterias, insectos y nemátodos.

HONGOS

Se han identificado los siguientes hongos que afectan al *Agave tequilana*: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Botrytis*, *Diplosporium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Mycelia sterilia* (Ochoa *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 1999; Fucikovsky, 2002; Castañeda, 2002; Moreno *et al.*, 2002).

BACTERIAS

Se han identificado las siguientes bacterias en *Agave tequilana*: *Pseudomonas fluorescens* biotipo I, *Erwinia* grupo *carotovora*, *Erwinia herbicola* (Fucikovsky, 2002; Castañeda, 2002).

INSECTOS

Los insectos más comunes reportados son: *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculinidae) “picudo” (Solís *et al.*, 1999, 2001; Rodríguez *et al.*, 1999), el escarabajo rinoceronte *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae, Dynastinae) (Fucikovsky, 2002).

NEMATODOS

Los principales nematodos reportados son: *Criconemoides*, *Tylenchus*, *Heterodera*, *Rotylenchus*, *Helicotylenchus*, *Xiphinema*, *Pratylenchus*, *Nacobus*, *Aphelenchoides* (Aceves, 2002).

Clasificación de *Agave tequilana*

Familia Agavaceae

Plantas perennes o multianuales, herbáceas, arbustivas o arborescentes, a menudo con rizomas cilíndricos o globosos, con raíces fibrosas bien desarrolladas; tallos gruesos, muy cortos a elongados. Hojas dispuestas en espiral, en rosetas basales o terminales, lineares o linear-lanceoladas, ampliamente lanceoladas a ovadas u oblanceoladas, membranoso-subcoriáceas, coriáceas a carnosas, ápice provisto o no de una espina terminal pungente, márgenes enteros, serrulados o con dientes aculeiformes, rara vez filíferos; inflorescencias terminales, en forma de racimo, espiga o panícula simple o compuesta, laxa o densa, con brácteas, algunas veces bulbíferas; flores actinomorfas o algo zigomorfas, hermafroditas o unisexuales, segmentos del perianto dispuestos en dos series de tres elementos cada una, libres o formando un tubo de longitud variable; estambres 6, insertos en la base de los segmentos o en el tubo, filamentos filiformes o a veces engrosados hacia la base, libres, anteras lineares, dorsifijas, de dehiscencia longitudinal; ovario súpero o ínfero, trilocular, con numerosos óvulos anátropos, estilo filiforme o

columnar, estigma capitado o trilobado; fruto en forma de una cápsula loculicida o a veces carnosos e indehiscente; semillas deltoideas a semicirculares, aplanadas, delgadas, negras, con fitomelano. Familia endémica del Nuevo Mundo, se distribuye del sur de Canadá hasta el norte de Sudamérica e islas del Caribe. Comprende ocho géneros (*Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Hesperaloë*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes* y *Yucca*) y alrededor de 300 especies (Henrickson y Johnston, 1997; Galván, 2001).

Subgénero *Agave*

Plantas perennes, generalmente vástagos presentes, en ocasiones bulbíferas a nivel de la inflorescencia, raíces fibrosas con desarrollo radial sómero, acaules o con tallos cortos y gruesos, simples o ramificados, hojas generalmente dispuestas en roseta, con frecuencia suculentas, ápice con espina terminal, márgenes enteros con dientes o filíferos, inflorescencia espigada racemosa o paniculada. Flores grandes en agregados umbelados sobre pedúnculos laterales, segmentos del perianto unidos en un tubo de longitud variable. Semillas planas, negras (Galván, 1988).

Grupo *Rigidae*

Plantas pequeñas a grandes, multianuales, desarrollan vástagos, tallos cortos a elongados, hojas ensiformes, carnosas, fuertemente fibrosas, generalmente extendidas, márgenes rectos con dientes de tamaño pequeño a mediano, espina terminal de tamaño variable pequeña a mediana, cónica a tubulada. La superficie superior abiertamente acanalada o plana.

Inflorescencia una panícula abierta con pocas ramas extendidas umbeladas, flores frecuentemente bulbíferas, protándricas, pequeñas a medianas, amarillas a verdes, fruto una cápsula. Distribuidos de México a América del Centro (Gentry, 1982).

***Agave tequilana* Weber**

Plantas monocárpicas de 1. 2 a 1. 8 m de alto, que desarrollan vástagos, esparcidos radialmente en la base de la planta, tallo corto, 30 a 50 cm de alto al madurar. Raíces en grupos densos y cortos. Hojas de 90 a 120 x 8 a 12 cm, lanceoladas, acuminadas, cóncavas rígidamente extendidas, horizontales y ascendentes, mas anchas hacia la parte media de la hoja, estrechas hacia la base, de color verde azulado a verde grisáceo, márgenes rectos a ondulados, dientes del márgen foliar, de 3 a 6 mm de longitud, ápices de los dientes curvados, de color café claro a café oscuro, distancia entre dientes de 1 a 2 cm regularmente, espina generalmente corta, de 1 a 2 cm de longitud, rara vez más larga, aplanada o abiertamente acanalada en la parte inferior, la base de la espina es ancha, de color café oscuro. Panícula de 5 a 6 m de alto, largas y densamente ramificadas, 20 a 25 flores por rama, flores de color verde con los estambres de color rosa, de 68 a 75 mm de longitud sobre pequeñas brácteas, pedicelos de 3 a 8 mm de longitud. Fruto una cápsula (Gentry, 1982).

Ambos tipos de reproducción se efectúan en *Agave tequilana*. La reproducción sexual, se logra por semillas, la floración se realiza en un ciclo

aproximado de 8 a 10 años, al término del proceso de fructificación la planta muere.

La reproducción asexual se lleva a cabo por la producción de los vástagos, clones o “hijuelos” que desarrollan en la base de la planta madre o por bulbillos que se desarrollan en las ramas laterales de la inflorescencia de la planta.

Tradicionalmente se utiliza la propagación vegetativa en el cultivo de *Agave tequilana*. En los últimos años se han incorporado plantas propagadas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de Plantas por Edad y Origen de Muestras Vegetales

Se seleccionaron plantas jóvenes de un año de edad y plantas adultas de cinco años de edad en diferentes condiciones de salud (plantas sanas y enfermas) de *Agave tequilana* Weber. Los individuos y muestras vegetales provienen de una plantación comercial de *Agave tequilana* ubicada en la localidad del municipio de Tequila, Jalisco, México (Castañeda, 2002). Con respecto a las denominaciones de salud (plantas sanas y enfermas), las características que se utilizaron para categorizar fueron exclusivamente visuales. Así mismo, es importante señalar que no se realizó estudio microbiológico alguno.

Categorización de Plantas por Condición de Salud (sanas y enfermas)

La denominación que aplicada a plantas de apariencia sana se le confirió a aquellos ejemplares de *Agave tequilana* cuyas hojas de la roseta tienen apariencia robusta, succulencia bien definida, color azul verdoso, lámina foliar

extendida sin enrollamientos, adelgazamientos, manchas o daños mecánicos, sin síntomas de ataque de algún patógeno (hongo, bacteria, insecto, etc). Se consideró además, que el sistema radical también estuviera en condiciones saludables, bien desarrollado y con un buen número y longitud adecuada de raíces.

La denominación aplicada a plantas de apariencia enferma se le adjudicó a los ejemplares de *Agave tequilana* cuyas hojas de la roseta presentaron un desarrollo raquíptico, no robusto, plantas donde las láminas foliares presentaron adelgazamiento en general (mal desarrollo de succulencia), enrollamientos de los bordes foliares (efecto llamado “acigarramiento”), decoloración foliar no típica de la especie, manchas foliares de color negruzco, en general plantas que presentaron algún tipo de síntomas que pudiera deberse a algún patógeno (hongo, bacteria, insecto, etc). Plantas con el sistema radical no desarrollado con raicillas escasas, cortas, y de apariencia raquíptica (Moreno *et al*, 2002).

Características de los Cortes Vegetales

Las muestras foliares se obtuvieron para cada grupo de estudio de cinco plantas, en el punto medio comprendido entre la base y el ápice a hojas totalmente extendidas ubicadas en la parte media de la roseta de la planta. Cortes de 1cm de grosor y una superficie de 1 cm² se efectuaron en las superficies abaxial y adaxial, posteriormente se realizaron cortes transversales de 1 a 2 mm. y se colocaron en los frascos con glutaraldehído al 2.5%.

Categorización de Grupos de Plantas y Combinación de Variables en *Agave tequilana*

Las muestras foliares de *Agave tequilana* se estudiaron bajo las siguientes variables, cada una con dos categorías: edad (plantas adultas y jóvenes), condición de salud (plantas sanas y enfermas) y superficie foliar (abaxial y adaxial). Los grupos de combinaciones de acuerdo a las variables anteriormente mencionadas se muestran en el cuadro 3.1. Una representación esquemática de *Agave tequilana* con la disposición de las superficies foliares se muestra en la Figura 3.1

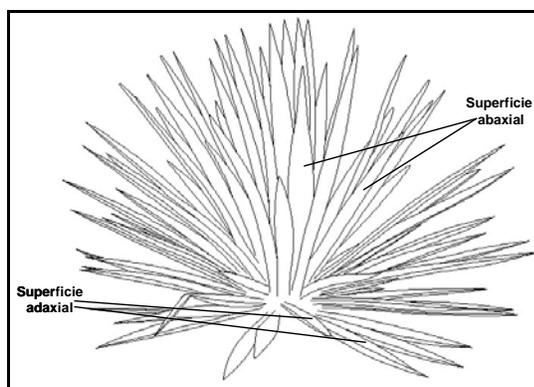


Figura 3. 1 Esquema de *Agave tequilana* mostrando los tipos de superficie foliar

Cuadro 3.1. Grupos por combinación de variables: edad, condición de salud y superficie foliar en plantas de *Agave tequilana*.

Edad	Condición de Salud	Superficie Foliar
Adultos	Sanas	Abaxial
Adultos	Sanas	Adaxial
Adultos	Enfermas	Abaxial
Adultos	Enfermas	Adaxial
Jóvenes	Sanas	Abaxial
Jóvenes	Sanas	Adaxial
Jóvenes	Enfermas	Abaxial
Jóvenes	Enfermas	Adaxial

Microestructuras Epidérmicas y Repeticiones Evaluadas

El número de repeticiones para cada microestructura epidérmica foliar de *Agave tequilana* varió de acuerdo a la disponibilidad de microestructuras epidérmicas en los cortes estudiados. El número de repeticiones para cada grupo por microestructura epidérmica foliar se observa en el Cuadro 3.2

Cuadro 3.2 Microestructuras epidérmicas foliares y número de repeticiones evaluadas en *Agave tequilana*.

Microestructura Epidérmica Foliar	Número de Repeticiones
Papilas estomáticas	20
Grosor de cutícula	20
Células epidérmicas	29
Densidad de células epidérmicas	30
Cristales	10
Complejo estomático	5
Células anexas	20
Cámara supraestomática	10
Tapón de Cera	10
Células oclusivas	20
Cámara subestomática	10
Distancia interestomática	20
Densidad estomática	30
Índice estomático	30

Tratamiento de Muestras Vegetales para Microscopía

Improntas Foliares

Para las impresiones foliares se utilizó la técnica mediante el uso del esmalte transparente de uñas (D'Ambrogio, 1986). Detalles en el Apéndice C.

Microscopía Óptica (MO)

La técnica de fijación para los estudios de microscopía óptica se basaron en D'Ambrogio, 1986; Fowke y Rennie, 1995; Yeung, 1999; Sepúlveda, 2001; Sepúlveda y Arredondo 2004. (Apéndice D).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para los estudios en el microscopio electrónico de barrido se utilizaron las técnicas de fijación, disección y montaje de acuerdo a Goldstein *et al.*, (1981), Klomparens *et al.*, (1986), Meyerowitz (<http://protocol.mit.edu/protocol/115.htm>), Robinson *et al.*, (1987); Fowke y Rennie (1995) y Sepúlveda y Arredondo (2004). Las muestras foliares para el MEB se deshidrataron en una serie de etanol- acetona, se secaron al punto crítico y se cubrieron con una capa fina de oro - paladio (Apéndice F).

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Tanto para el microscopio óptico (MO) como para el microscopio electrónico de transmisión (MET), las muestras se postfijaron en 1% de tetraóxido de osmio (OsO_4), la inclusión se realizó en resina Spurr[®] para seccionarse mediante los protocolos de Berlyn y Mikschel (1976), Maiti *et al.*, (1992), Sepúlveda y Arredondo (1994) y Richardson *et al.*, (2000).

Cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina para MO. Los cortes finos, realizados bajo el protocolo de MET, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Apéndice E)

Cálculo de Densidad de Estomas y Células Epidérmicas

El número de estomas y las células epidérmicas por mm^2 , se estudiaron bajo el microscopio óptico (BMAX Olympus BX 50, objetivo 40 x / 0.75 Ph2, ocular SWH 10 x – h 26.5), de improntas o impresiones foliares realizadas con esmalte transparente de uñas. Se usó un objetivo micrométrico American Optical Corporation (20 mm dia disc, 10 mm sq. Div), y un ocular micrométrico American Optical Corporation (2 mm div into, units of 0.01 mm).

Posteriormente se procedió a calcular el área del campo visual. El radio del campo visual circular con base a la escala milimétrica real.

Se contó el número de estomas o células epidérmicas en ese campo visual, posteriormente se calculó el número de estomas o células epidérmicas para un mm^2 .

Área: $r^2 (3.1416)$

Área = valor μm

Cuando se tiene el valor del área se realiza la operación de regla de tres simple para obtener el cálculo total de estomas o de células epidérmicas por unidad de área foliar (mm^2).

Cálculo de Índice Estomático

Para el cálculo del índice estomático en *Agave tequilana* se siguió la siguiente fórmula (Willmer, 1983) :

$$\text{Índice estomático} \left[\frac{\text{No. de estomas por unidad de área foliar}}{\text{No. de estomas por unidad de área foliar} + \text{No. de células epidérmicas por unidad de área foliar}} \right] 100$$

Mediciones de Microestructuras Epidérmicas

Se realizaron mediciones para el grosor de cutícula, área del complejo estomático y distancia interestomática directamente en el microscopio electrónico de barrido.

El contenido de cera dentro de la cámara supraestomática y el área de los cristales tipo estiloides fueron medidos a partir de las laminillas preparadas para el microscopio óptico, con la función del área del analizador de imágenes Argus 20 (Hamamatsu) para calcular la densidad estomática y la densidad de las células epidérmicas.

Posterior a la medición mediante el uso de la aplicación para medir microestructuras epidérmicas en el microscopio electrónico de barrido modelo Leo 502 y microscopio óptico (BMAX Olympus BX 50) usando la función línea y área del analizador de imágenes Argus 20 (Hamamatsu), se obtuvieron los promedios para cada variable analizada en ambas superficies foliares (abaxial y

adaxial). En el caso de los cristales, a pesar de ser estructuras tridimensionales, en este trabajo se tomaron las dimensiones del diámetro más ancho y el diámetro más pequeño, por lo que los datos aquí registrados aparecen como estructuras bidimensionales.

Determinación de la Naturaleza Química de los Cristales

Para determinar la naturaleza química de los cristales se realizó la prueba de solubilidad de ácidos para oxalato de calcio (Apéndice G).

Análisis Estadístico

Los datos numéricos se estudiaron estadísticamente mediante un análisis trifactorial combinatorio en diseño completamente al azar. En términos de tratamientos (*el que se hizo*) la unidad muestral es un tratamiento de un análisis trifactorial en donde cada factor está dividido en dos condiciones, por esta circunstancia se tienen ocho tratamientos :

A - Edad	[Adultos Jóvenes
B - Salud	[Sanos Enfermos
C - Posición Foliar	[Abaxial Adaxial

En términos de muestreo (*el cuanto se hizo, tamaño de muestra*). La unidad muestral son las repeticiones (Cuadro 3.2) que se hicieron para cada uno de los tratamientos donde se observaron las siguientes variables (Cuadro 3.2) en *Agave tequilana*.

Los valores obtenidos para cada una de las estructuras epidérmicas son válidos como individuos independientes, sin embargo no se pueden establecer asociaciones de estadísticos tipo regresión o correlación por ser muestras independientes. Para la elaboración de las gráficas, las barras del error se graficaron con el nivel de 0.05 de probabilidad de error o con el 95% de confiabilidad y se utilizó el intervalo de confianza para dar mayor precisión a los resultados (Steel y Torrie, 1988).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta investigación se presentan en dos secciones. En la primera sección se describen imágenes de las microestructuras epidérmicas foliares de *Agave tequilana*. Los mosaicos de imágenes que aquí se presentan no son uniformes en cuanto a la cantidad de imágenes debido al manejo de las muestras vegetales bajo los protocolos de la microscopía correspondiente señalada en el pie de grabado para cada grupo. Consultar el Apéndice I y J para términos y clave de siglas y abreviaturas.

En la segunda sección se presentan los resultados del análisis estadístico para cada una de las microestructuras epidérmicas foliares de *Agave tequilana*.

Descripción de Microestructuras Epidérmicas Foliares de *Agave tequilana*.

Se muestra y describe detalladamente una serie de imágenes por grupos de plantas de acuerdo a la variable edad (adultos – jóvenes), salud (sanas-enfermas) y a la superficie foliar (abaxial – adaxial), arreglos conformados de acuerdo a estas asignaciones.

Superficie Abaxial Foliar de Plantas Adultas Sanas de *Agave tequilana*.

En la Figura 4.1, se ilustran características de las microestructuras de la epidermis foliar abaxial de plantas adultas sanas de *Agave tequilana*. Las imágenes presentan con gran precisión características tanto de la superficie foliar como de cortes histológicos paradermal y transversal de la hoja observados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

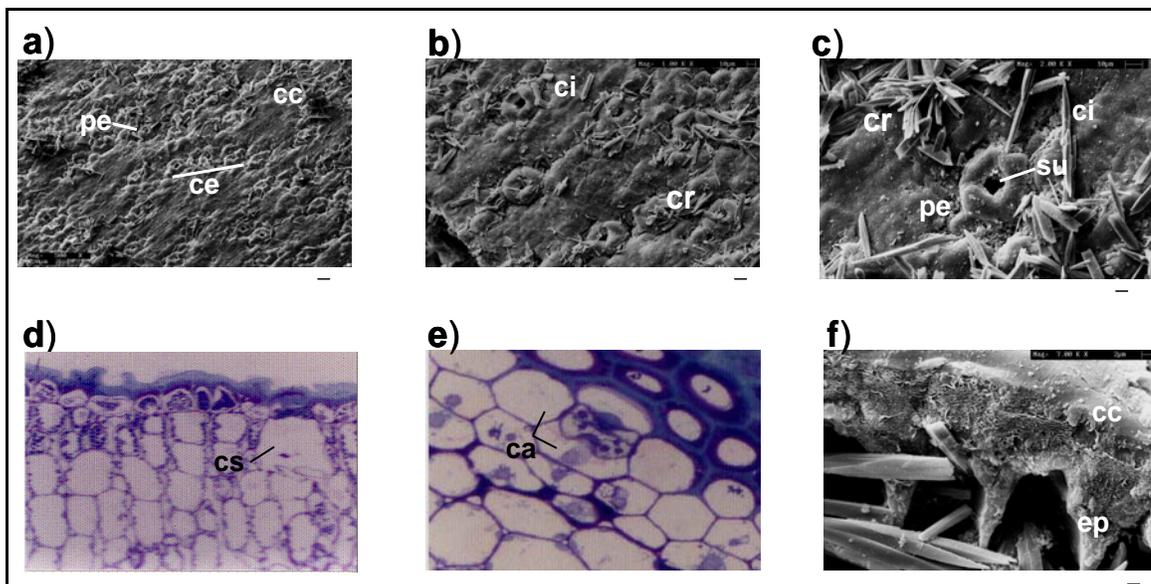


Figura 4.1 Superficie abaxial foliar de plantas adultas sanas de *Agave tequilana* en microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía óptica (MO). a) Vista general (MEB) de la superficie foliar y la distribución de los complejos estomáticos (ce) distribuidos en hileras cortas. Las papilas estomáticas (pe) representadas por cuatro proyecciones que rodean a la cámara supraestomática. Se aprecia la acumulación de cera (cc) en los espacios entre los grupos de complejos estomáticos, escala: 20 μm b) Las agrupaciones de cristales en forma de roseta (cr) son comunes en esta superficie, así como cristales individuales (ci) (MEB), escala: 10 μm c) Cristales agrupados en roseta (cr) y cristales individuales (ci) comunes en esta superficie. Se aprecian las papilas estomáticas (pe) que rodean la superficie exterior de la cámara supraestomática (su), la cual se encuentra abierta en esta imagen (MEB), escala: 10 μm d) Corte transversal que muestra las proyecciones cuticulares que dan origen a las papilas estomáticas (pe). A la derecha, se muestra una cámara subestomática donde las células acompañantes y papilas estomáticas están fuera del plano del corte (MO) e) Corte paradermal de la superficie foliar abaxial. Se observan las células anexas (ca) que rodean a las células oclusivas del estoma (MO) f) Corte transversal de la superficie foliar abaxial. Se observan las paredes celulares de las células epidérmicas (ep) sobre las cuales se deposita la cutícula cerosa (cc) MEB, escala: 2 μm .

Superficie Adaxial Foliar de Plantas Adultas Sanas de *Agave tequilana*.

En la Figura 4.2 se presentan imágenes que corresponden a la superficie adaxial foliar de plantas adultas sanas de *Agave tequilana*. Las imágenes presentan con gran precisión características morfológicas tanto de la superficie foliar como de cortes histológicos paradermal y transversal de la hoja observados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

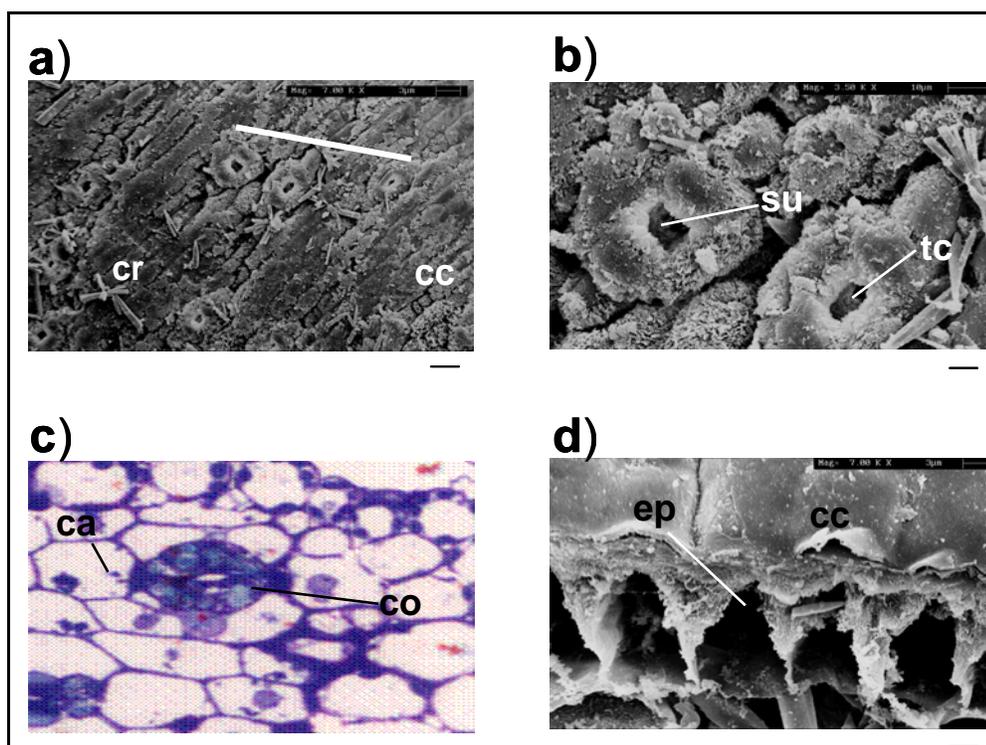


Figura 4.2. Vista general de la superficie adaxial foliar de plantas adultas sanas de *Agave tequilana*. a) Se aprecia una hilera corta de estomas (barra blanca). La cutícula cerosa (cc) se distribuye en manchones sobre la superficie y cristales en roseta (cr), (MEB), escala: 3 μm b) Detalle del complejo estomático. Dentro de la cámara supraestomática (su) se aprecia el tapón de material posiblemente ceroso (tc), MEB, escala: 10 μm c) Corte paradermal. Las células anexas (ca), rodean las células oclusivas (co) y éstas a su vez rodean el ostíolo estomático, (M.O.) d) Vista de las células epidérmicas (ep) y la capa de cera cuticular (cc) (MEB). escala: 3 μm

Superficie Abaxial Foliar de Plantas Jóvenes Sanas de *Agave tequilana*

En la Figura 4.3 se presentan imágenes que corresponden a la superficie abaxial foliar de plantas jóvenes sanas de *Agave tequilana*. Las imágenes presentan con gran precisión características morfológicas tanto de la superficie foliar como de cortes histológicos paradermal y transversal de la hoja observados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

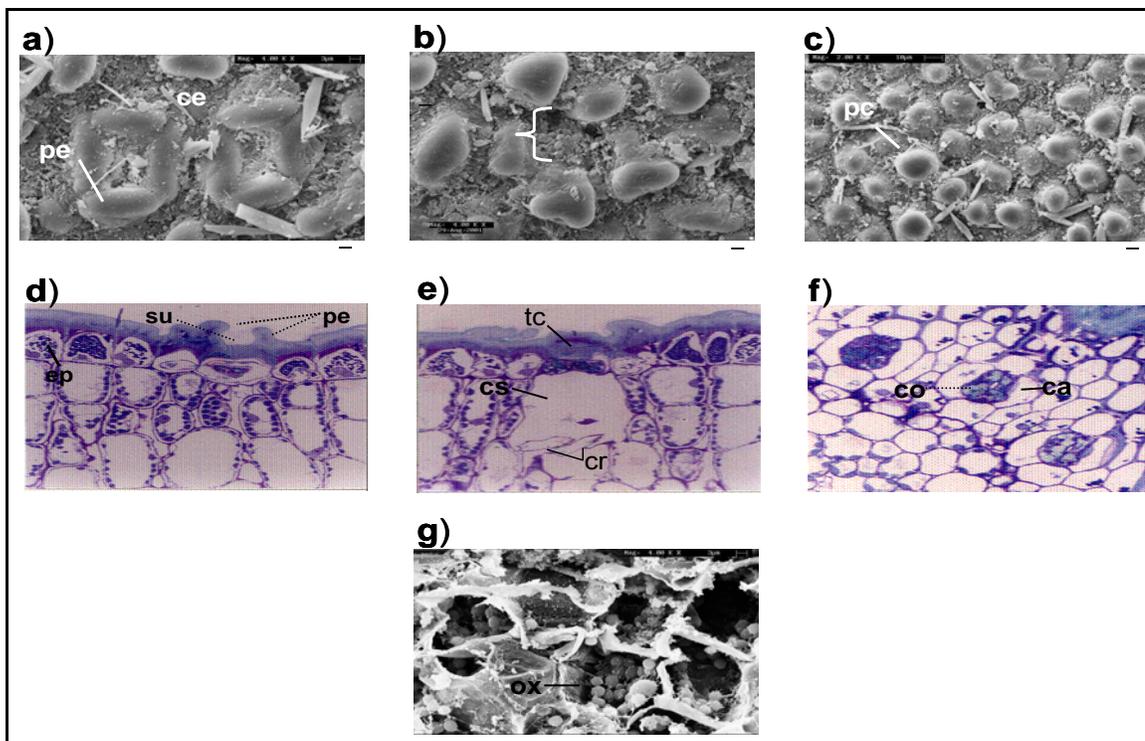


Figura 4.3 Superficie abaxial foliar de plantas jóvenes sanas de *Agave tequilana* a) Detalle de un par de complejos estomáticos (ce) con las cuatro papilas estomáticas (pe) que rodean la apertura de la cámara supraestomática que en este caso se encuentra ocupada por el tapón de cera (tc) (MEB). escala 3 μ m. b) Vestigio de un complejo estomático (}) delimitado por las papilas cuticulares (MEB). escala 3 μ m. c) Papilas cuticulares rodeadas de acumulaciones de cera (MEB). escala 10 μ m. d) En corte transversal de hoja, las papilas estomáticas (pe) se presentan como una continuación de la cutícula epidérmica, estas delimitan la cámara supraestomática (su). Se aprecian las células epidérmicas (ep) por debajo de la capa de cutícula cerosa (MO). e) Cámara subestomática (cs) situada debajo de las células oclusivas. Encima de éstas, se aprecia el tapón de cera (tc) de la cámara supraestomática. En la base de la cámara subestomática, se observa un cristal (ci) (MO). f) Corte paradermal que muestra el arreglo del estoma tetracístico con las cuatro células anexas (ca) y las células oclusivas (co). Al centro de las células oclusivas se aprecia parte del ostiolo parcialmente abierto (MO). g) Detalle del parénquima con inclusiones de cuerpos de oxalato de calcio (ox) (MEB). escala 3 μ m.

Superficie Adaxial Foliar de Plantas Jóvenes Sanas de *Agave tequilana*

En la Figura 4.4 se presentan imágenes que corresponden a la superficie adaxial foliar de plantas jóvenes sanas de *Agave tequilana*. Las imágenes muestran características morfológicas de la superficie foliar como detalles de los cristales y del complejo estomático, observados por microscopía electrónica de barrido.

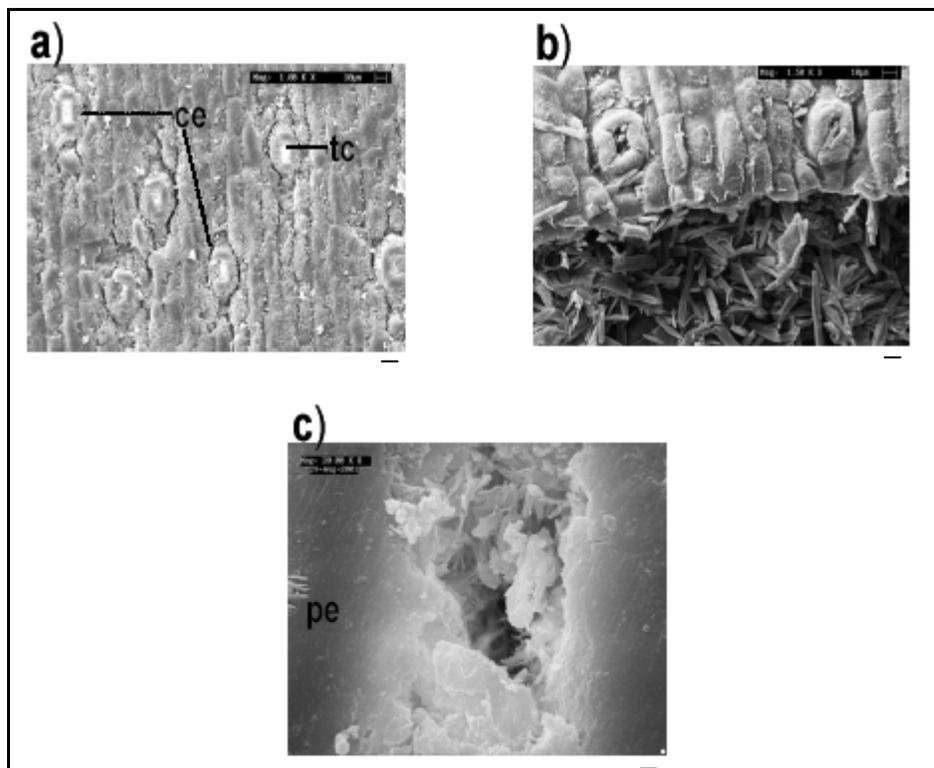


Figura 4.4. Superficie adaxial foliar de plantas jóvenes sanas de *Agave tequilana* (MEB). a) Complejos estomáticos (ce) con las aperturas de las cavidades supraestomatales totalmente bloqueadas por el tapón de cera (tc). Nótese la ausencia de cristales en la superficie. escala: 10 μm b) Vista parcial de la superficie y el corte transversal de la hoja. Nótese la gran acumulación de cristales en el interior de la hoja. Probablemente las paredes celulares del parénquima se colapsaron durante el corte por la gran densidad de cristales, escala: 10 μm c) Detalle de la apertura supraestomática delimitada por las papilas estomáticas (pe). Se observa la acumulación de cera en la luz de la cavidad supraestomática. Aumento: 20,000x

Superficie Abaxial Foliar de Plantas Adultas Enfermas de *Agave tequilana*

En la Figura 4.5 se presentan imágenes que corresponden a la superficie abaxial foliar de plantas adultas enfermas de *Agave tequilana*. Las imágenes muestran características morfológicas tanto de la superficie foliar como de cortes histológicos paradermal y transversal de la hoja, observados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

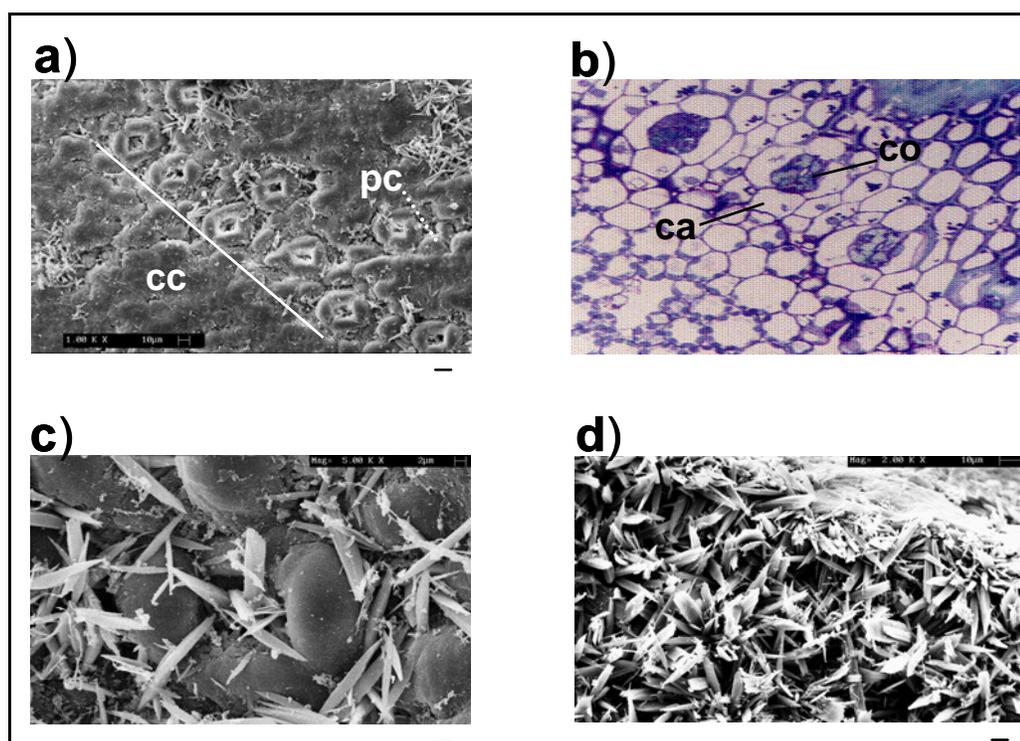


Figura 4.5. Superficie abaxial foliar de plantas adultas enfermas de *Agave tequilana*. a) Se muestra claramente la disposición de complejos estomáticos en hileras (línea blanca) y se observa la cavidad de la cámara supraestomática total o parcialmente despejada. La acumulación de cera cuticular (cc) es evidente y se observan algunas papilas cuticulares (pc) parcialmente cubiertas de cera (MEB). escala 10 μm b) Hilera corta de tres estomas tetracísticos en corte paradermal. Se aprecian las células anexas (ca) y las células oclusivas (co) del estoma (MO). c) Detalle de un complejo estomático con acumulación de cristales que en ocasiones invaden hasta la cámara supraestomática (MEB). escala 2 μm d) Detalle de un corte transversal que muestra la gran acumulación de cristales en el interior de la célula (MEB). escala 10 μm .

Superficie Adaxial Foliar de Plantas Adultas Enfermas de *Agave tequilana*

En la Figura 4.6 se presentan imágenes que corresponden a la superficie adaxial foliar de plantas adultas enfermas de *Agave tequilana*. Las imágenes muestran características morfológicas tanto de la superficie foliar como de cortes histológicos transversal de la hoja, observados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

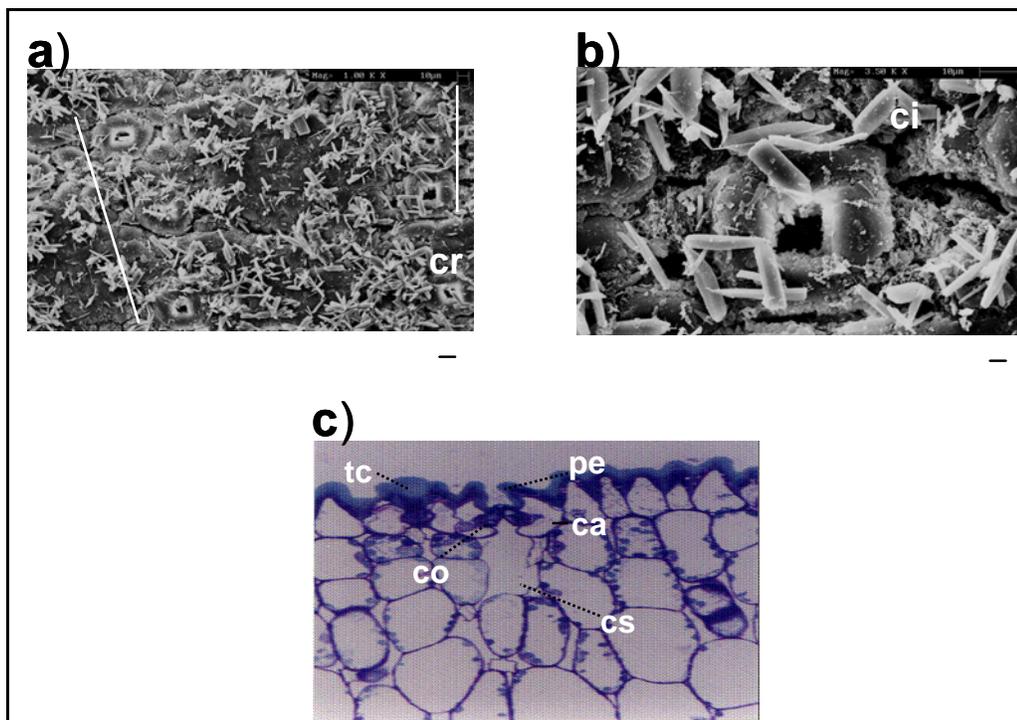


Figura 4.6 Superficie adaxial foliar de plantas adultas enfermas de *Agave tequilana*. a) Se observan dos hileras cortas de complejos estomáticos (líneas) a cada lado de la imagen, así como una gran presencia de cristales. En la esquina inferior derecha se observan cristales agrupados en rosetas (cr) (MEB) escala 10 μm b) Detalle de un complejo estomático que muestra la apertura de la cavidad estomática libre y cristales individuales (ci) alrededor del complejo estomático (MEB), escala 10 μm c) Corte transversal del complejo estomático. Se muestran las papilas estomáticas (pe), las células anexas (ca), células oclusivas (co) y la cámara subestomática (cs). La cámara supraestomática se encuentra libre de cera en el complejo estomático del centro de la imagen, mientras que en el complejo estomático de la porción izquierda, la cámara supraestomática se encuentra llena por el tapón de cera (tc) (MO).

Superficie Abaxial Foliar de Plantas Jóvenes Enfermas de *Agave tequilana*

En la Figura 4.7 se presentan imágenes que corresponden a la superficie abaxial foliar de plantas jóvenes enfermas de *Agave tequilana*. Las imágenes muestran características morfológicas de la superficie foliar y en corte transversal de papilas cuticulares, cristales, cutícula, células epidérmicas y del complejo estomático, observados por microscopía electrónica de barrido.

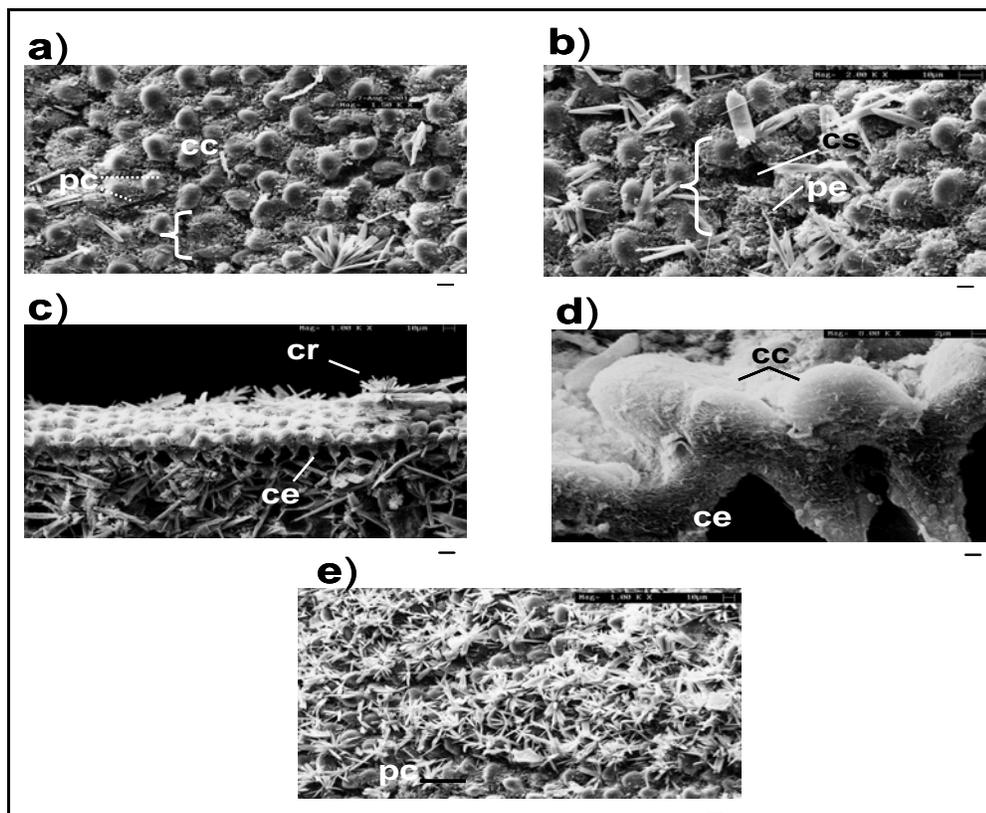


Figura 4.7 Superficie abaxial foliar de plantas jóvenes enfermas de *Agave tequilana* (MEB). a) Porción de la superficie desprovista de cristales, a excepción de la porción inferior izquierda. Se aprecian las papilas cuticulares (pc) rodeadas de la capa de cera (cc). Se observa el complejo estomático deteriorado ({}). b) Complejo estomático deteriorado al centro de la figura ({}), y las papilas estomáticas (pe) casi totalmente colapsadas, que rodean irregularmente a la apertura de la cavidad supraestomática (cs). escala 10 μm c) Corte transversal que muestra las células epidérmicas (ce) por debajo de la capa de cera. Se aprecia acumulación de cristales en el parénquima y en la superficie de la hoja. En la esquina superior derecha un cristal en forma de roseta (cr). escala 10 μm d) Detalle del corte transversal que muestra la acumulación de cera cuticular (cc) sobre las células epidérmicas (ce). escala 2 μm e) Porción de la superficie foliar tapizada con cristales en roseta, se aprecian algunas papilas cuticulares (pc). escala 10 μm .

Superficie Adaxial Foliar de Plantas Jóvenes Enfermas de *Agave tequilana*

En la Figura 4.8 se presentan imágenes que corresponden a la superficie adaxial foliar de plantas jóvenes enfermas de *Agave tequilana*. Las imágenes muestran características morfológicas del complejo estomático, cámara supraestomática y subestomática, células anexas, células epidérmicas y cutícula en la superficie foliar como en cortes histológicos paradermal y transversal de la hoja, observados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

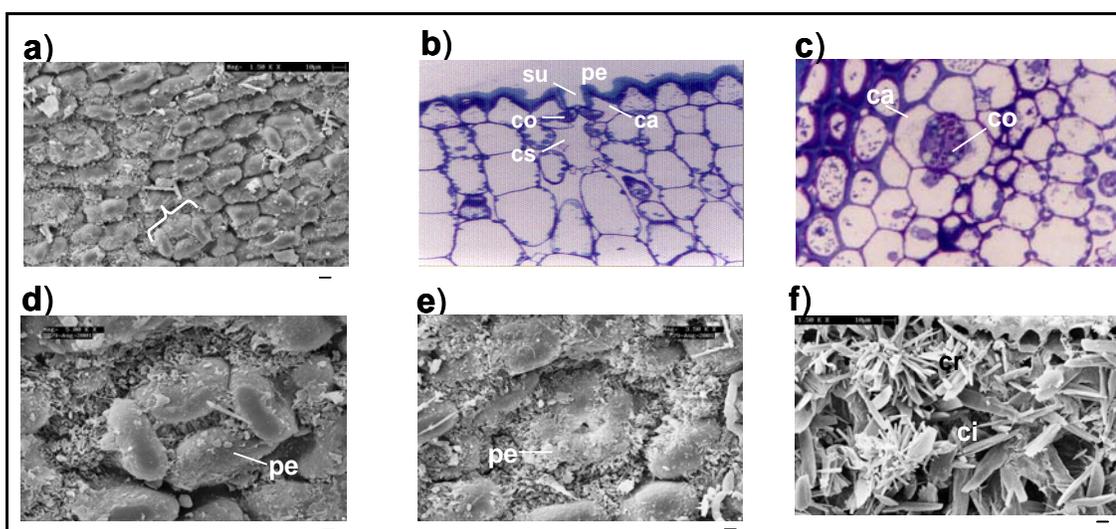


Figura 4.8 Superficie adaxial foliar de plantas jóvenes enfermas de *Agave tequilana* a) Distribución heterogénea de cristales sobre la superficie. Complejo estomático parcialmente colapsado ({} (MEB). escala 10 μm b) Corte transversal que muestra un complejo estomático: papilas estomáticas (pe), células anexas (ca), células oclusivas (co) y la cámara subestomática (cs). La cámara supraestomática (su) está libre del tapón de cera (MO). c) Corte paradermal que muestra el estoma tetracístico: células anexas (ca) y las células oclusivas (co). d) y e) Complejos estomáticos en diferentes estados de deterioro (MEB). En d) se muestran las papilas estomáticas parcialmente colapsadas, mientras que en e) éstas se muestran más colapsadas, f) Corte transversal que muestra la gran acumulación interna de cristales en forma de roseta (cr) y otros cristales individuales tipo estiloides (ci) MEB). escala 10 μm

Análisis Estadístico de Microestructuras Epidérmicas Foliar de *Agave tequilana*

Los resultados del análisis estadístico trifactorial, donde A= edad, B= salud y C = superficie foliar, además de las interacciones dobles y triples combinatorias de estas tres variables, se presentan en el cuerpo del texto para cada microestructura epidérmica foliar de *Agave tequilana*.

Papilas Estomáticas

Las papilas estomáticas son acumulaciones de cera que se depositan sobre las proyecciones de las células anexas, estas microestructuras epidérmicas foliares se encuentran tanto en la superficie foliar abaxial como en la adaxial y se ubican por encima de la depresión que contiene las células oclusivas del complejo estomático de *Agave tequilana*. La designación del nombre papilas estomáticas se da porque estas microestructuras epidérmicas foliares actúan como una señal, que denota la presencia del estoma en las superficies foliares de esta especie.

El análisis estadístico para papilas estomáticas reveló que la variable edad y la interacción doble AB (edad- salud) son altamente significativas al 0.01. Mientras que para la variable superficie foliar y la interacción doble AC (edad- superficie foliar) son significativas al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4. 1

El área de las papilas estomáticas resultó tener un área mayor en la superficie foliar abaxial de los individuos adultos sanos, sin embargo se observa

una reducción en la superficie foliar abaxial de los adultos enfermos. Los valores de las medias para el área de las papilas estomáticas de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice 11.3 y se representan en la Figura 4.9.

Cuadro 4.1 Análisis de varianza para papilas estomáticas en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	97031.37	97031.37	66.87	3.84	6.63	**
B	1	1982.75	1982.75	1.37	3.84	6.63	ns
C	1	11346.12	11346.12	7.82	3.84	6.63	*
AB	1	15732.73	15732.73	10.84	3.84	6.63	**
AC	1	9211.53	9211.53	6.35	3.84	6.63	*
BC	1	14.02	14.02	0.01	3.84	6.63	ns
ABC	1	3644.47	3644.47	2.51	3.84	6.63	ns
ERROR	152	220544.93	1450.95				
TOTAL	159	359507.90					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

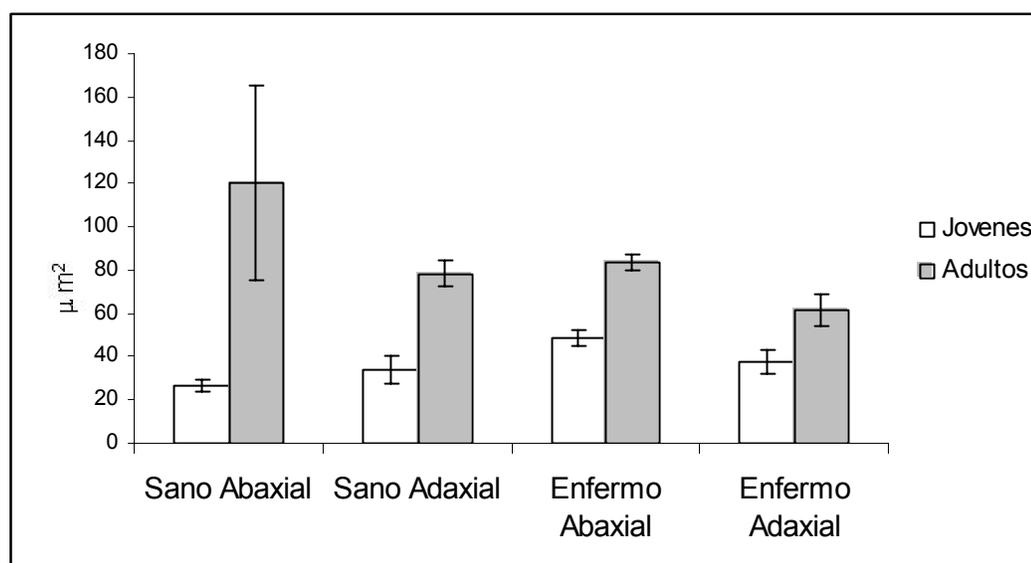


Figura 4.9. Área de papilas estomáticas por edad, condición de salud y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 20 mediciones para cada grupo.

Cutícula

La cutícula en *Agave tequilana* forma una capa continua en la superficie de las hojas, se ve interrumpida solamente por los orificios que forma el espacio entre las células anexas del estoma.

En la superficie foliar abaxial y adaxial de las plantas jóvenes de *Agave tequilana*, se presentan numerosas protuberancias del tipo tubérculo semejando papilas epidérmicas o papilas cuticulares. La forma globosa de estas estructuras no se observa en la superficie foliar de plantas adultas, posiblemente se deba a la acumulación progresiva de cera que se lleva a cabo en las etapas de crecimiento de la hoja juvenil a la hoja adulta.

En hojas de plantas adultas de *Agave tequilana* Weber, la acumulación de los depósitos de cera en el revestimiento cuticular, logran formar una superficie plana de forma irregular, que puede presentar protuberancias, grietas o depresiones, además de cera y cristales de oxalato de calcio.

El análisis estadístico para grosor de cutícula reveló que las variables edad y superficie foliar, así como las interacciones dobles AB (edad- salud), AC (edad- superficie foliar), BC (salud- superficie foliar) así como la interacción triple ABC (edad – salud – superficie foliar) resultaron altamente significativas al 0.01. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.2.

Los adultos tienen una cutícula con mayor grosor que los jóvenes. El espesor de la cutícula en hojas adultas en condición sana muestra valores iguales en ambas superficies foliares (9 μm).

La superficie foliar abaxial de plantas enfermas, es semejante que en los adultos sanos (10 μm), mientras que el grosor de la cutícula disminuyó notoriamente en la superficie adaxial de los individuos adultos enfermos (5 μm), valores que se representan en la Figura 4.10 y 4.11. Los valores de las medias para el grosor de la cutícula, de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H.

Cuadro 4.2. Análisis de varianza para grosor de cutícula en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	480.4993724	480.4993724	168.67	3.84	6.63	**
B	1	0.296939655	0.296939655	0.10	3.84	6.63	ns
C	1	191.6099379	191.6099379	67.26	3.84	6.63	**
AB	1	97.24155172	97.24155172	34.14	3.84	6.63	**
AC	1	47.75718793	47.75718793	16.76	3.84	6.63	**
BC	1	116.3838897	116.3838897	40.86	3.84	6.63	**
ABC	1	111.3678776	111.3678776	39.09	3.84	6.63	**
ERROR	224	638.1053586	2.848684637				
TOTAL	231	1683.262116					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

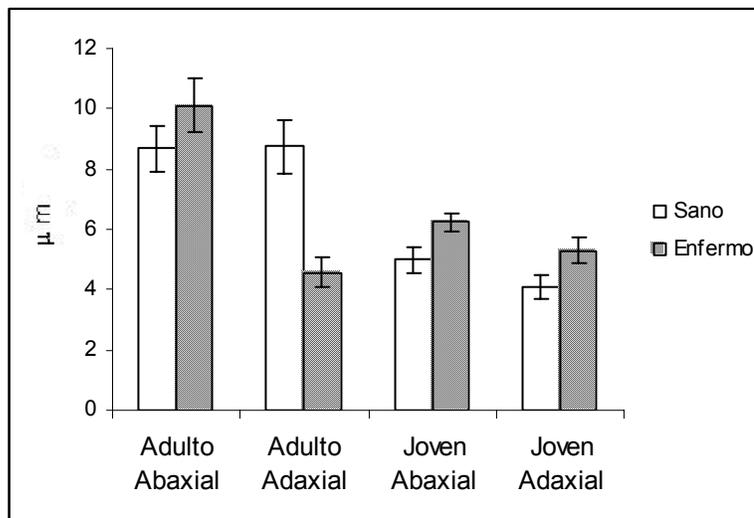


Figura 4.10 Grosor de cutícula por edad y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 29 mediciones para cada grupo.

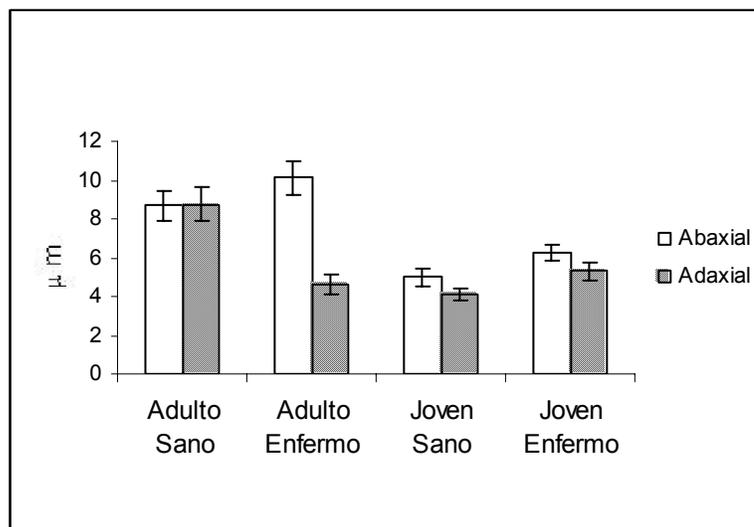


Figura 4.11 Grosor de cutícula por edad y salud en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 29 mediciones para cada grupo.

Células Epidérmicas

Las células epidérmicas son isodiamétricas y papilosas (con proyecciones hacia el exterior), se presentan en las superficies foliares abaxial y adaxial tanto en plantas jóvenes como en las plantas adultas de *Agave tequilana*.

El análisis estadístico para células epidérmicas (área) reveló que la variables edad, salud y superficie foliar, así como la interacción doble AC (edad-superficie foliar) y la interacción triple ABC (edad – salud – superficie foliar) resultaron altamente significativas al 0.01. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.3.

Las células epidérmicas en los individuos sanos tanto en adultos como en los individuos jóvenes tienen un área muy similar, la superficie foliar abaxial muestra una tendencia de área mayor (Apéndice H).

En los individuos adultos enfermos se mantiene un área mayor en la superficie foliar adaxial ($62 \mu\text{m}^2$), aproximadamente un 40% más grande que en el adulto sano ($38 \mu\text{m}^2$).

En la superficie foliar abaxial de los individuos jóvenes enfermos el área de las células epidérmicas muestra el valor más alto de todos los grupos, representados en la Figura 4.12. Las medias para células epidérmicas (área), de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H.

Cuadro 4.3. Análisis de varianza para células epidérmicas (área) en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	2913.70	2913.70	8.77	3.84	6.63	**
B	1	3987.49	3987.49	12.00	3.84	6.63	**
C	1	20384.11	20384.11	61.36	3.84	6.63	**
AB	1	884.45	884.45	2.66	3.84	6.63	ns
AC	1	8458.38	8458.38	25.46	3.84	6.63	**
BC	1	413.14	413.14	1.24	3.84	6.63	ns
ABC	1	9500.44	9500.44	28.60	3.84	6.63	**
ERROR	72	23920.03	332.22				
TOTAL	79	70461.74					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

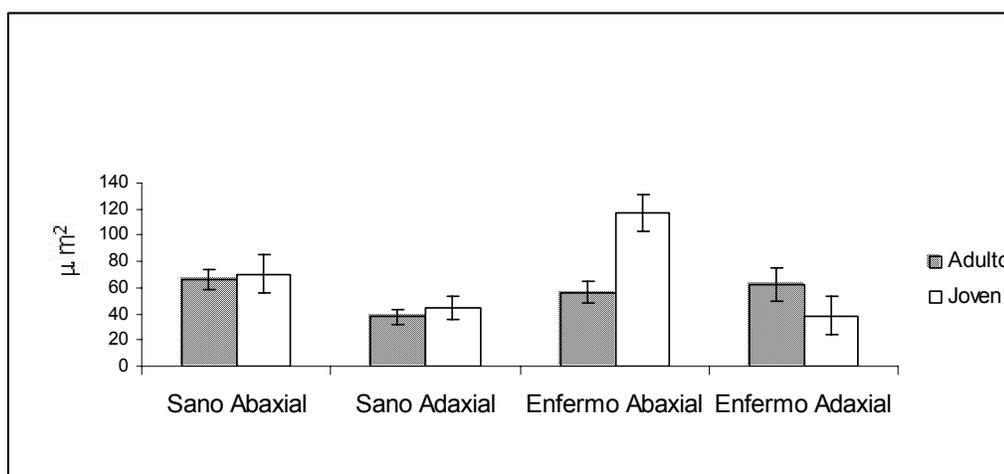


Figura 4.12. Área de células epidérmicas por edad, salud y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 10 mediciones para cada grupo.

Densidad de Células Epidérmicas

En el grupo de los adultos se obtuvo un promedio de 1385 células epidérmicas por milímetro cuadrado para la superficie foliar abaxial, mientras que en la superficie adaxial, se obtuvo un promedio de 1451 células epidérmicas. En el grupo de las plantas jóvenes, la densidad en la superficie

abaxial fue de 1439 y en la superficie adaxial de 1501 células epidérmicas por milímetro cuadrado.

El análisis estadístico para la densidad de células epidérmicas reveló que para las variables edad, salud y superficie foliar, así como las interacciones dobles y la interacción triple ABC el resultado fue no significativo al 0.01 y al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.4. Las medias para células epidérmicas (área), de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H y se representan en la Figura 4.13.

Cuadro 4.4. Análisis de varianza para densidad de células epidérmicas en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	178683	178683	-5.05	3.84	6.63	ns
B	1	6084	6084	-0.17	3.84	6.63	ns
C	1	262739	262739	-7.43	3.84	6.63	ns
AB	1	1857888	1857888	-52.55	3.84	6.63	ns
AC	1	0	0	0.00	3.84	6.63	ns
BC	1	158552	158552	-4.48	3.84	6.63	ns
ABC	1	2249928	2249928	-63.64	3.84	6.63	ns
ERROR	232	-8201848	-35353				
TOTAL	239	-3487974					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

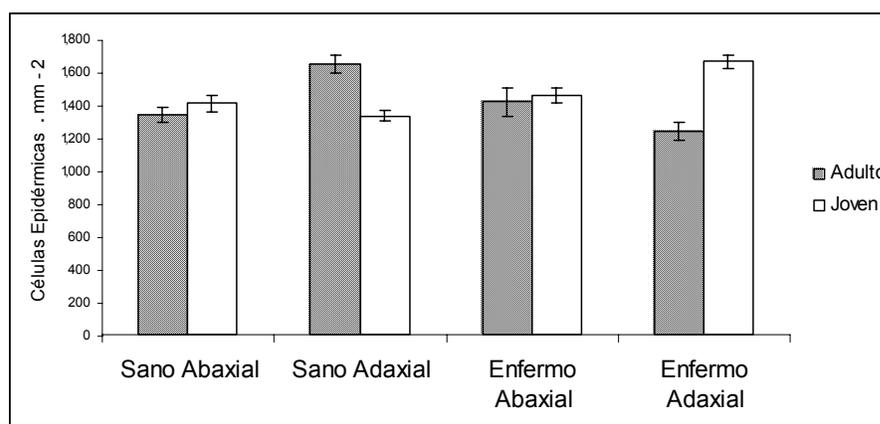


Figura 4.13. Densidad de células epidérmicas por edad, salud y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 30 mediciones para cada grupo.

Cristales

Plantas adultas y jóvenes de *Agave tequilana* presentan cristales en ambas superficies foliares (abaxial – adaxial), la composición química de los cristales de acuerdo a los resultados de la prueba química realizada correspondió a oxalato de calcio.

Los cristales en *Agave tequilana* corresponden al tipo morfológico de estiloides y ráfidios. Adicionalmente se encuentran agrupaciones de cristales en forma de roseta.

Los cristales se localizan en áreas que comprenden desde la superficie foliar, la cutícula, las células de corcho, células epidérmicas, células del parénquima esponjoso hasta la región donde se encuentran los haces vasculares.

El análisis estadístico para cristales (área) de oxalato de calcio reveló que para la variable salud, así como la interacción doble BC (salud- superficie foliar) el resultado fue significativo al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.5.

En las plantas adultas sanas, la cara expuesta de los cristales estiloides que se localizan en la superficie foliar adaxial son de mayor tamaño ($35 \mu\text{m}^2$) que en la superficie abaxial ($18 \mu\text{m}^2$).

Cabe destacar como en las plantas adultas de los individuos enfermos se desarrollan cristales de mayor tamaño en la superficie abaxial ($48 \mu\text{m}^2$), en contraste con el adulto sano ($18 \mu\text{m}^2$). Los valores de las medias para cristales (área), de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H y se representan en la Figura 4.14.

Cuadro 4.5. Análisis de varianza para cristales (área) en *Agave tequilana*.

Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	331	331	0.47	3.84	6.63	ns
B	1	3983	3983	5.63	3.84	6.63	*
C	1	258	258	0.36	3.84	6.63	ns
AB	1	0	0	0.00	3.84	6.63	ns
AC	1	344	344	0.49	3.84	6.63	ns
BC	1	2952	2952	4.17	3.84	6.63	*
ABC	1	347	347	0.49	3.84	6.63	ns
ERROR	72	50936	707				
TOTAL	79	59151					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

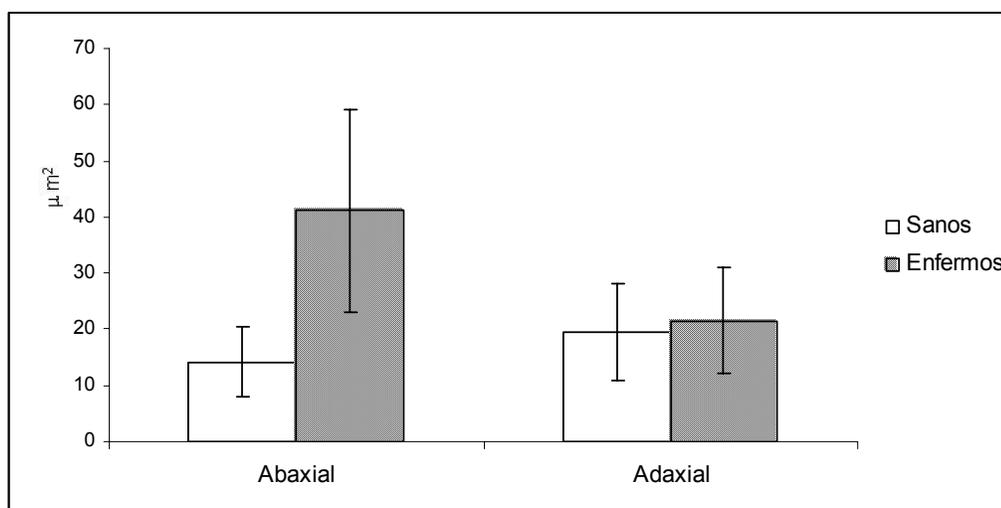


Figura 4.14 Área de cristales por edad y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 20 mediciones de la cara expuesta de los cristales tipo estiloides para cada superficie en *Agave tequilana*.

Complejo Estomático

Los estomas se presentan en ambas superficies foliares (abaxial y adaxial) en *Agave tequilana*. El término complejo estomático se asigna a la conjunción de varias microestructuras morfológicas que participan cercana y fisiológicamente asociadas al estoma en *Agave tequilana*.

La organización del complejo estomático corresponde al tipo tetracístico (Gentry y Sauck, 1978), consta de cuatro células anexas (adjuntas o subsidiarias) que se asocian a las células oclusivas del estoma, por el poro estomático u ostíolo y la cavidad que se forma entre las células adjuntas.

Las células oclusivas se localizan por debajo del nivel de las células anexas, al fondo de la cavidad llamada cámara supraestomática. Por debajo de las células oclusivas se forma una cavidad denominada cámara subestomática que conecta con los espacios intercelulares del mesófilo de la hoja de *Agave tequilana*.

El complejo estomático en la superficie foliar abaxial tiene un área expuesta de $1899 \mu\text{m}^2$ en promedio, mientras que en la correspondiente adaxial tiene un área de aproximadamente $1867 \mu\text{m}^2$.

La superficie del complejo estomático se haya cubierto por depósitos considerables de cera y de cristales de oxalato de calcio. En la oquedad entre las células anexas tanto la cera cuticular como los cristales tipo estiloides

bloquean casi por completo el acceso a las células oclusivas. El complejo estomático o los estomas se localizan en hileras en posición longitudinal y ligeramente sinuosa.

El análisis estadístico para complejo estomático (área) reveló que la variable edad es altamente significativa al 0.01. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.6.

Es importante señalar que el área del complejo estomático resultó tener tanto en las plantas sanas como en las enfermas, un incremento al pasar de individuos jóvenes a los adultos. Al nivel de las plantas jóvenes el área del complejo estomático es igual.

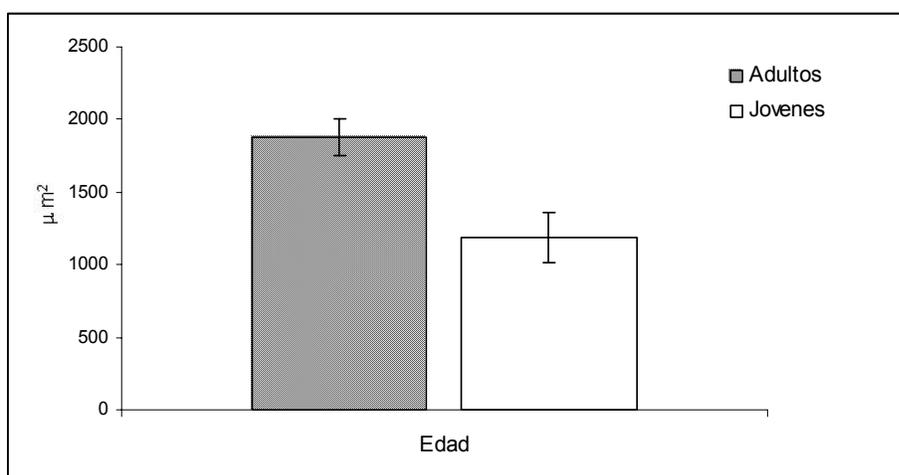
Al comparar la superficie abaxial de los grupos de adultos sanos y enfermos, se observa que el área del complejo estomático es muy similar. No obstante, la superficie adaxial muestra un contraste, esta diferencia es más marcada en los individuos adultos enfermos. Las medias para el área del complejo estomático de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Ápéndice H y se representan en la Figura 4.15.

Cuadro 4.6. Análisis de varianza para complejo estomático en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	4857197	4857197	44.69	3.84	6.63	**
B	1	223385	223385	2.06	3.84	6.63	ns
C	1	22236	22236	0.20	3.84	6.63	ns
AB	1	121460	121460	1.12	3.84	6.63	ns
AC	1	62248	62248	0.57	3.84	6.63	ns
BC	1	150507	150507	1.38	3.84	6.63	ns
ABC	1	353163	353163	3.25	3.84	6.63	ns
ERROR	32	3478016	108688				
TOTAL	39	9268212					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar

ns = no significativo

Figura 4.15. Área de complejo estomático por edad en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 20 mediciones para cada grupo.

Células Anexas

La presencia de cuatro células anexas a las células oclusivas del estoma es constante, lo cual permite ubicar morfológicamente como tetracístico al complejo estomático de *Agave tequilana*.

Cada una de las células anexas de los individuos adultos en la superficie foliar abaxial tiene un área expuesta de $176 \mu\text{m}^2$; la célula anexa en la

superficie adaxial posee un área expuesta de $136 \mu\text{m}^2$ (medidas en el microscopio electrónico de barrido).

El análisis estadístico para células anexas con datos obtenidos en el microscopio óptico (BMAX Olympus BX 50) usando la función área del analizador de imágenes Argus 20 (Hamamatsu), reveló para las variables edad, salud y superficie foliar, así como la interacciones dobles indican un resultado no significativo al 0.01 y al 0.05. Mientras que para la interacción triple ABC el resultado fue altamente significativo. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.7, las medias para el área de las células anexas de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H y se representan en la Figura 4.16.

Cuadro 4.7. Análisis de varianza para células anexas en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	2282	2282	6.22	3.84	6.63	ns
B	1	1723	1723	4.70	3.84	6.63	ns
C	1	1482	1482	4.04	3.84	6.63	ns
AB	1	1949	1949	5.31	3.84	6.63	ns
AC	1	104	104	0.28	3.84	6.63	ns
BC	1	1032	1032	2.81	3.84	6.63	ns
ABC	1	9732	9732	26.53	3.84	6.63	**
ERROR	152	55761	367				
TOTAL	159	74065					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

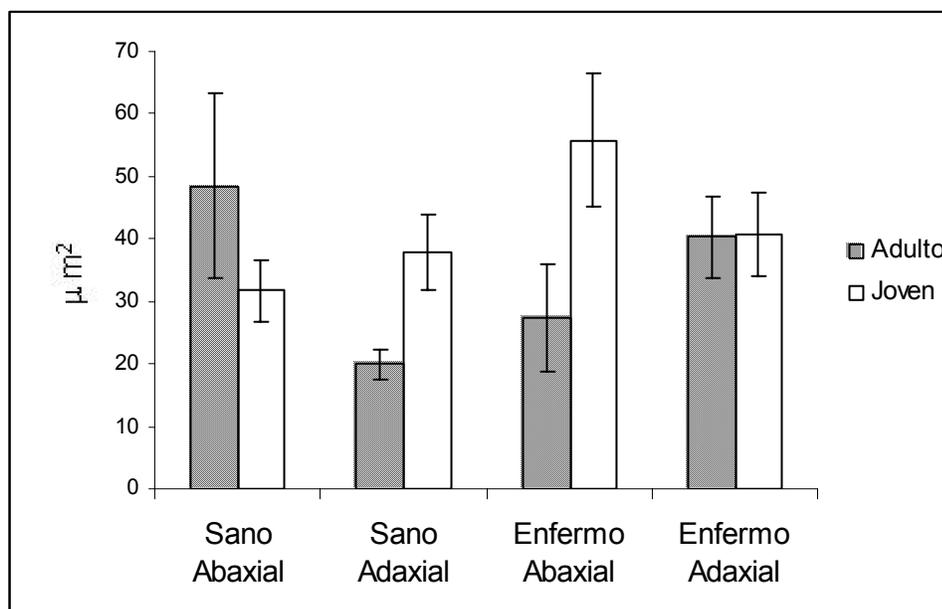


Figura 4.16. Área de células anexas en el complejo estomático por edad, salud y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 20 mediciones para cada grupo.

Cámara Supraestomática

Por encima de las células oclusivas y por debajo de las proyecciones denominadas papilas estomáticas, se encuentra un espacio libre que forma la cavidad de la cámara supraestomática del complejo estomático en *Agave tequilana*.

El área de la cámara supraestomática se encuentra tanto libre, como cubierta por cera y cristales de oxalato de calcio. En ocasiones la cámara supraestomática se encuentra con una cobertura total de cera y cristales. El área que se midió fue el espacio libre de la cámara supraestomática.

El análisis estadístico para cámara supraestomática (área) reveló que las variables edad y superficie foliar resultaron altamente significativas al 0.01. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.8.

La entrada a la cámara supraestomática mide $132 \mu\text{m}^2$ en el lado abaxial, mientras que en el adaxial es de $42 \mu\text{m}^2$ (mediciones realizadas en el microscopio electrónico de barrido).

La cámara supraestomática tiene un área libre de cuerpos de cera y cristales mayor en la superficie abaxial ($81 \mu\text{m}^2$) de los individuos adultos sanos. Se observa que el área disminuyó notoriamente en la superficie adaxial de los adultos sanos ($39 \mu\text{m}^2$), mientras que una tendencia similar se observó en la superficie abaxial ($87 \mu\text{m}^2$) de los individuos adultos enfermos, en tanto se presentó una reducción de los valores en la superficie adaxial de los adultos enfermos ($42 \mu\text{m}^2$).

La concentración de cera es mayor en la superficie adaxial de adultos. Las medias para el área de la cámara supraestomática de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H, valores que se representan en la Figura 4.17.

Cuadro 4.8. Análisis de varianza para cámara supraestomática en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	41692	41692	130.32	3.84	6.63	**
B	1	105	105	0.33	3.84	6.63	ns
C	1	10728	10728	33.53	3.84	6.63	**
AB	1	49	49	0.15	3.84	6.63	ns
AC	1	8140	8140	25.44	3.84	6.63	**
BC	1	572	572	1.79	3.84	6.63	ns
ABC	1	337	337	1.05	3.84	6.63	ns
ERROR	72	23034	320				
TOTAL	79	84657					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

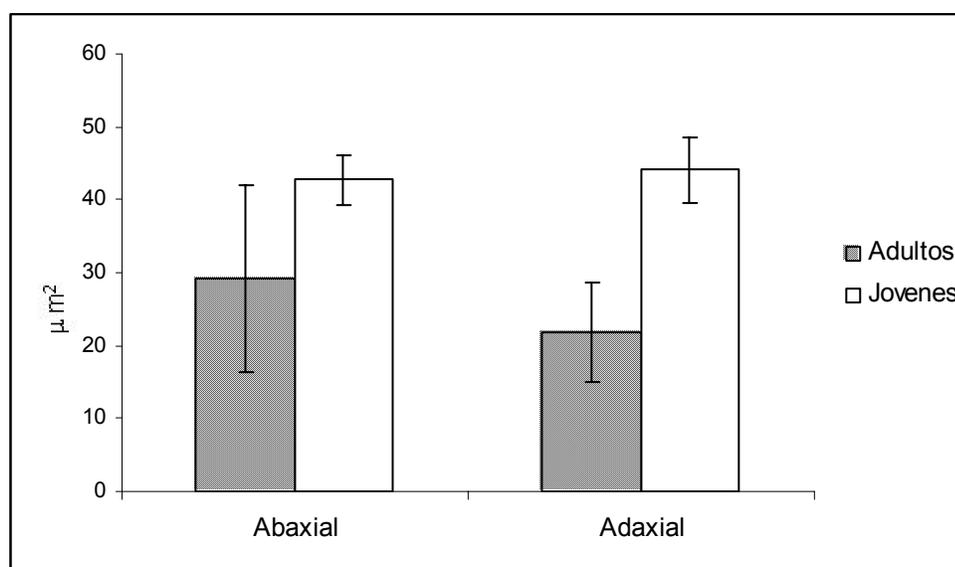


Figura 4.17. Área de cámara supraestomática por edad y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 20 mediciones para cada grupo.

Tapón de Cera

El tapón de cera corresponde a la acumulación de cera dentro de la cavidad de la cámara supraestomática del complejo estomático de *Agave tequilana*.

El análisis estadístico para el área del tapón de cera reveló que la variable edad resultó altamente significativa al 0.01. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.9.

El tapón de cera es mayor en los individuos adultos que en los jóvenes, tanto en las plantas sanas como enfermas. (Apéndice H)

En las plantas adultas sanas el área del tapón de cera es igual tanto para la superficie abaxial ($36\mu\text{m}^2$) como la adaxial ($34\mu\text{m}^2$).

El tapón de cera en la superficie abaxial ($32\mu\text{m}^2$) de las plantas enfermas es semejante a las adultas sanas. Sin embargo, se observa una reducción considerable en la superficie adaxial de los adultos enfermos ($13\mu\text{m}^2$). Las medias para el tapón de cera, de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H, valores que se representan en la Figura 4.18.

Cuadro 4.9 Análisis de varianza para tapón de cera en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	9521	9521	14.35	3.84	6.63	**
B	1	711	711	1.07	3.84	6.63	ns
C	1	723	723	1.09	3.84	6.63	ns
AB	1	740	740	1.12	3.84	6.63	ns
AC	1	401	401	0.60	3.84	6.63	ns
BC	1	656	656	0.99	3.84	6.63	ns
ABC	1	164	164	0.25	3.84	6.63	ns
ERROR	72	47757	663				
TOTAL	79	60674					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar

ns = no significativo

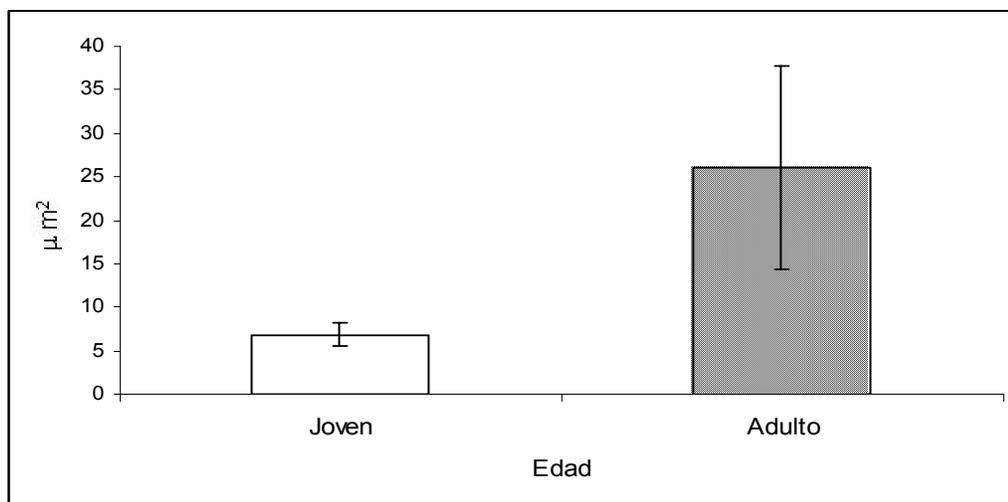


Figura 4.18. Área de tapón de cera por edad en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 40 mediciones para cada grupo.

Células Oclusivas

Las células oclusivas se encuentran en depresiones formadas por la confluencia de las cuatro células anexas del complejo estomático de *Agave tequilana*.

El análisis estadístico para células oclusivas reveló que la variable superficie foliar resultó significativa al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.10.

El área de las células oclusivas es semejante en las plantas adultos como en las jóvenes tanto sanas como enfermas, el área representó un promedio de $23 \mu\text{m}^2$ tanto para la superficie abaxial como adaxial, a excepción de la superficie abaxial de los adultos sanos con un área de $36 \mu\text{m}^2$. Las medias para células oclusivas (área), de acuerdo a la condición de edad, salud y

superficie foliar se muestran en el Apéndice H, y se representan en la Figura 4.19.

Cuadro 4.10. Análisis de varianza para células oclusivas en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	189	189	0.95	3.84	6.63	ns
B	1	241	241	1.21	3.84	6.63	ns
C	1	1470	1470	7.39	3.84	6.63	*
AB	1	938	938	4.71	3.84	6.63	ns
AC	1	26	26	0.13	3.84	6.63	ns
BC	1	533	533	2.68	3.84	6.63	ns
ABC	1	790	790	3.97	3.84	6.63	ns
ERROR	152	30233	199				
TOTAL	159	34420					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

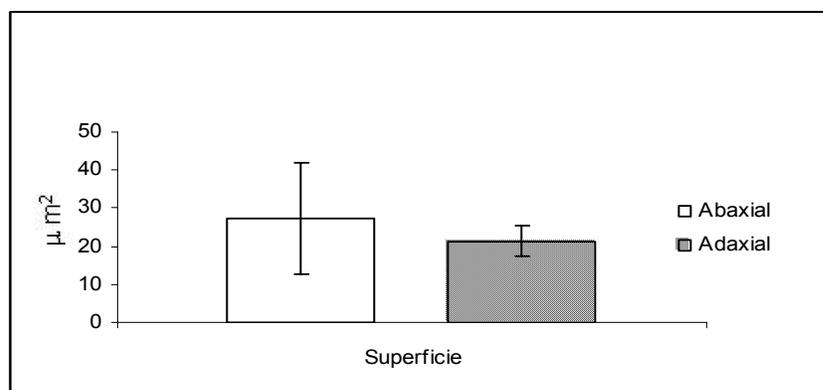


Figura 4.19 Área de células oclusivas por superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 80 mediciones para cada grupo.

Cámara Subestomática

La cámara subestomática corresponde al espacio que se encuentra por debajo de las células oclusivas, esta cavidad se encuentra delimitada por las células del parénquima esponjoso en el complejo estomático de *Agave tequilana*.

El análisis estadístico para cámara subestomática reveló que la variable edad resultó altamente significativa al 0.01. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.11.

El área de la cámara subestomática es mayor en los individuos adultos. En los individuos jóvenes el promedio fue de $148 \mu\text{m}^2$. Al pasar a la etapa adulta el área se incrementa considerablemente, hasta $538 \mu\text{m}^2$.

El área de la cámara subestomática en la superficie foliar abaxial es mayor que en la correspondiente superficie adaxial. Las medias para cámara subestomática (área), de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H, y se representan en la Figura 4.20.

Cuadro 11. Análisis de varianza para cámara subestomática en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	3048126	3048126	51.22	3.84	6.63	**
B	1	101367	101367	1.70	3.84	6.63	ns
C	1	100983	100983	1.70	3.84	6.63	ns
AB	1	8224	8224	0.14	3.84	6.63	ns
AC	1	40631	40631	0.68	3.84	6.63	ns
BC	1	1380	1380	0.02	3.84	6.63	ns
ABC	1	1969	1969	0.03	3.84	6.63	ns
ERROR	72	4284482	59507				
TOTAL	79	7587162					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

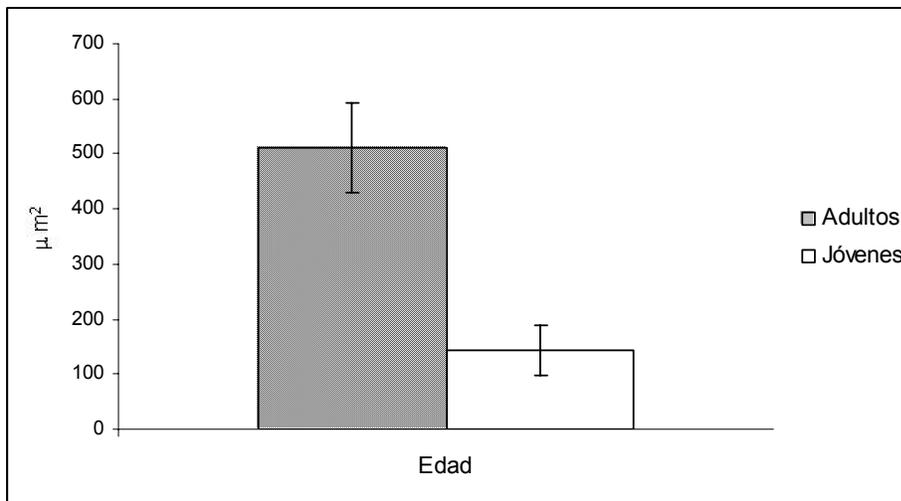


Figura 4.20 Área de cámara subestomática por edad en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 40 mediciones para cada grupo.

Distancia Interestomática

Los estomas están distribuidos más o menos al azar en hileras onduladas no rectilíneas en la superficie foliar de *Agave tequilana*. Es común encontrar grupos de 3 a 7 estomas alineados en hileras cortas, separadas por un promedio de 50 μm tanto para la superficie abaxial como adaxial en las plantas adultas sanas. Los depósitos de cutina sobre la superficie foliar muestran áreas libres de estomas.

El espacio entre dos estomas está ocupado por varias células epidérmicas típicas cuyo número fluctúa entre cuatro y diez células de una misma hilera.

El espacio entre estomas de hileras continuas suele ser menor y corresponde a dos o tres células epidérmicas.

El análisis estadístico para distancia interestomática reveló que para la variable edad resultó significativo al 0.05, mientras que para la variable superficie foliar y la interacción triple ABC (edad - salud - superficie foliar) el resultado fue significativo al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.12.

En las plantas adultas enfermas se observa una diferencia en la distancia interestomática, para la superficie abaxial es de 27 μm , mientras que es 69 μm en la superficie adaxial. Esta diferencia puede ser quizás a la necrosis de estomas observada en las imágenes del microscopio electrónico de barrido.

En las plantas jóvenes sanas, la superficie abaxial registró 18 μm , en tanto para la superficie adaxial la distancia interestomática fue mucho mayor (65 μm).

No se presenta diferencia en la distancia interestomática en los individuos jóvenes enfermos. Las medias para distancia interestomática, de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H, y se representan en la Figura 4.21.

Cuadro 4.12 Análisis de varianza para distancia interestomática en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	6838	6838	5.46	3.84	6.63	*
B	1	1931	1931	1.54	3.84	6.63	ns
C	1	19162	19162	15.31	3.84	6.63	**
AB	1	661	661	0.53	3.84	6.63	ns
AC	1	34	34	0.03	3.84	6.63	ns
BC	1	99	99	0.08	3.84	6.63	ns
ABC	1	20411	20411	16.31	3.84	6.63	**
ERROR	152	190258	1252				
TOTAL	159	239394					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

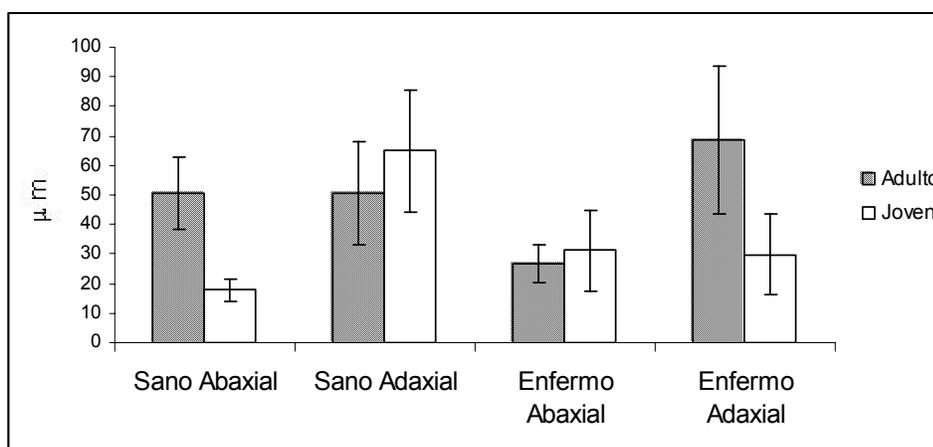


Figura 4.21 Distancia interestomática por edad, salud y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 20 mediciones para cada grupo.

Densidad Estomática

El análisis estadístico para densidad estomática en *Agave tequilana* reveló que la variable edad resultó altamente significativa al 0.01 y la interacción AC (edad- superficie foliar) fue significativa al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.13.

En la superficie adaxial de plantas adultas se muestra la mayor densidad estomática, así mismo los valores fueron muy similares tanto para el grupo de plantas sanas (100) como para las enfermas (99) estomas por milímetro cuadrado. En los individuos adultos sanos y enfermos, la densidad estomática para la superficie abaxial el número de estomas . mm^{-2} es de 95 y 91 estomas respectivamente.

La densidad estomática es igual en las plantas jóvenes sanas en ambas superficies foliares y ligeramente superior en las plantas jóvenes enfermas. La densidad estomática en las plantas sanas (tanto en jóvenes y adultos) es diferente, los jóvenes sanos tienen menor densidad estomática.

Las medias para densidad estomática, de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H, y se representan en la Figura 4.22.

Cuadro 4.13. Análisis de varianza para densidad estomática en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	10797	10797	60.48	3.84	6.63	**
B	1	350	350	1.96	3.84	6.63	ns
C	1	25	25	0.14	3.84	6.63	ns
AB	1	1603	1603	8.98	3.84	6.63	ns
AC	1	1896	1896	10.62	3.84	6.63	*
BC	1	34	34	0.19	3.84	6.63	ns
ABC	1	473	473	2.65	3.84	6.63	ns
ERROR	232	41420	179				
TOTAL	239	56599					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

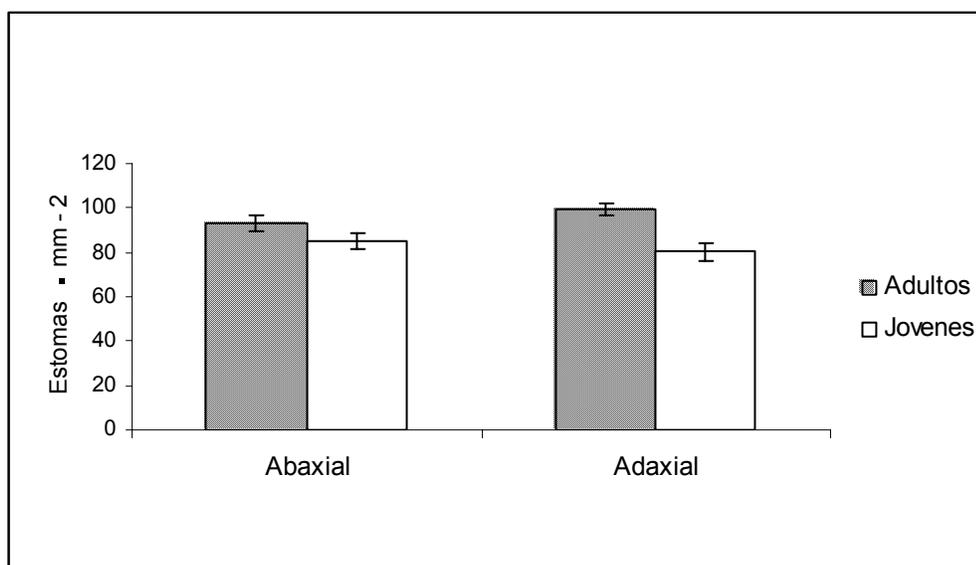


Figura 4.22. Densidad estomática por edad y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 40 mediciones para cada grupo.

Índice Estomático

El análisis estadístico para índice estomático en *Agave tequilana* reveló que la variable edad y la interacción triple ABC (edad – salud - superficie foliar) resultaron altamente significativas al 0.01 y las interacciones dobles AB (edad-salud) y AC (edad- superficie foliar) fueron significativas al 0.05. Los valores de la F calculada y la F tabular se observan en el Cuadro 4.14.

El cálculo del índice estomático muestra valores cercanos tanto para la superficie abaxial y adaxial para las plantas adultas y jóvenes, sanas y enfermas, en promedio 6 estomas por cada cien células epidérmicas. Las

medias para distancia interestomática, de acuerdo a la condición de edad, salud y superficie foliar se muestran en el Apéndice H y se representan en la Figura 4.23.

Cuadro 4.14. Análisis de varianza para índice estomático en *Agave tequilana*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	F Tabular 0.05 *	F Tabular 0.01 **	Significancia estadística
A	1	76	76	67	3.84	6.63	**
B	1	3	3	2	3.84	6.63	ns
C	1	2	2	1	3.84	6.63	ns
AB	1	8	8	7	3.84	6.63	*
AC	1	7	7	6	3.84	6.63	*
BC	1	3	3	3	3.84	6.63	ns
ABC	1	50	50	44	3.84	6.63	**
ERROR	232	264	1				
TOTAL	239	411					

A = Edad B = Salud C = Superficie foliar ns = no significativo

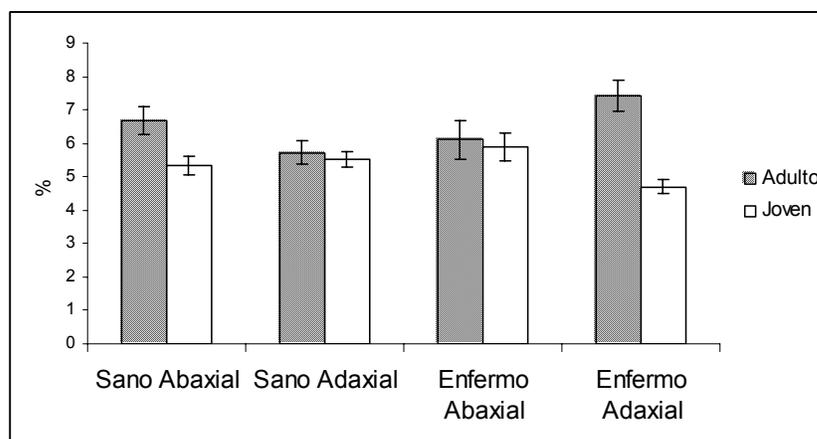


Figura 4.23. Índice estomático por edad y superficie foliar en *Agave tequilana*. Los valores representan el promedio de 30 mediciones para cada grupo.

DISCUSIÓN

Una de las funciones cruciales de las células vegetales es la capacidad de responder a fluctuaciones en su ambiente (Lerner, 1999 ; Grene, 2001). Las plantas mantienen la capacidad de diferenciar nuevos órganos durante todo su ciclo vital, lo cuál permite modificaciones en el proceso de desarrollo posteriores a la etapa embrionaria. Adicionalmente, las células vegetales son capaces de responder a las condiciones ambientales locales (plasticidad fenotípica) de una forma sutil y compleja, a través de una red de rutas bioquímicas, celulares y morfogenéticas (Coupland *et al*, 2003; Inzé, 2003).

Uno de los elementos más importantes de este proceso es el que las diferentes familias de proteínas reguladoras actúan jerárquicamente a modo de interruptores moleculares, estimulando o reprimiendo rutas de señalización, al interactuar con los factores endógenos de la planta y mensajeros químicos como las hormonas. El resultado final de esta interacción bioquímica determina el destino de las células y así la arquitectura y función de órganos y tejidos (Coupland *et al*, 2003; Nusse *et al*, 2003)

Además de la variación genética que ocurre naturalmente en las plantas, la plasticidad fenotípica puede ser expresada en una variedad de formas. El rango de variabilidad de un carácter dentro de un individuo, de un grupo de especies o de grupos taxonómicos relacionados, puede ser tanto cualitativo como cuantitativo. Los factores genéticos por su parte, también influyen de manera importante sobre la estructura vegetal y frecuentemente interactúan con otras variables, por ejemplo: los caracteres anatómicos pueden variar durante el desarrollo, o debido a factores ambientales o influencias del hábitat de la planta como la disponibilidad de agua, luz, nutrientes, adaptación altitudinal, o por estar sujetos a diversos tipos de estrés biótico o abiótico. (Trewavas y Malhó, 1997 ; Dickison, 1999; Itai, 1999).

Bajo circunstancias óptimas, una planta desarrolla una morfología anatómica estructural dentro de un estado fenotípico ideal (Benavides, 2003). La plasticidad fenotípica de una especie cultivada ante estímulos negativos del ambiente se refleja en una serie de características anatómicas foliares.

Destacan entre otras, el espesor de la cutícula y de las paredes de las células epidérmicas, del área de los haces vasculares y de las células del mesófilo (Trewavas y Malhó, 1997; Dickison, 1999). El entendimiento de las interacciones entre las respuestas iniciales de una planta y los eventos posteriores, son elementos constitutivos de la adaptación acertada a la alteración de su ambiente (Greene, 2001). Adicionalmente, la identificación de un rasgo morfo-fisiológico simple que esté relacionado con la respuesta a varios

estreses bióticos y abióticos, es altamente deseable en cualquier programa de mejora de cosecha (Maiti *et al*, 1994).

Como todas las características de un individuo vegetal no pueden ser detalladas, las variaciones fenotípicas probablemente sean las mas fácilmente observables (Cullis, 1999)

Presencia de Oxalato de Calcio

El oxalato es un compuesto orgánico muy importante en el metabolismo de las plantas. Es uno de los productos finales del ciclo de oxido reducción del ascorbato (frecuentemente referido como vía Halliwell – Asada).

El ascorbato tiene como rol indirecto el servir como antioxidante, regenerando antioxidantes de membrana como el tocoferol que a su vez atrapa radicales peroxilo y oxígeno altamente oxidantes (Levine, 1999; Grene, 2001). De esta forma la presencia de oxalato en hojas de *Agave tequilana* evidencia posiblemente la producción de antioxidantes en la planta.

En esta sección se tratará de relacionar la presencia de cuerpos y cristales de oxalato de calcio con actividad de respuesta a estreses bióticos y abióticos.

Cuerpos de Oxalato de Calcio

Se observó la presencia de abundantes cuerpos de oxalato de calcio en las células del parénquima esponjoso en la superficie foliar abaxial de plantas jóvenes de *Agave tequilana* y en menor cantidad en la superficie adaxial de las plantas adultas sanas. Es interesante recalcar que solo en estos dos grupos de plantas se encontró oxalato de calcio en forma de cuerpos. En plantas enfermas el oxalato de calcio se almacena en forma de cristales mas no como cuerpos de oxalato. Esta observación conduce a pensar en correlacionar la presencia de oxalato de calcio como un indicador de salud en las plantas.

Cristales de Oxalato de Calcio

Se presentan por vez primera, valores del área (largo y ancho) de la cara expuesta de los cristales tipo estiloides para *Agave tequilana*. Dada la dificultad de medir el volumen de estructuras tan complejas, estos valores representan la superficie de la cara expuesta de cada cristal. Por otra parte, la morfología de los cristales (estiloides y rafidios), concuerda con la clasificación de Esau (1972).

Los cristales de oxalato de calcio presentes en *Agave tequilana*, son de los más frecuentes y ampliamente distribuidos en las plantas superiores (Webb, 1999). El oxalato de calcio proporciona un depósito de capacidad alta para el calcio.

Algunas plantas parecen tener un mecanismo regulador para tratar con niveles altos de calcio en el ambiente de la planta, (Nakata *et al*, 2001). El exceso de calcio puede ser retenido en cristales y almacenado como oxalato de calcio, esta acción limita el efecto perjudicial debido a niveles altos de calcio en las células vegetales, (Volk *et al*, 2002). La formación de estos cristales ocurre dentro de la vacuola de células especializadas llamadas idioblastos (Franceschi *et al*, 1980; Dickison, 1999; Web,1999 y Kostman, 2001), el componente que almacena el calcio fue identificado como retículo endoplásmico del idioblasto. Al parecer posee áreas especiales en las cuales grandes cantidades de calcio son confinadas. Tres proteínas ligadas al calcio se han localizada en el retículo endoplásmico y no son detectables en las células del mesófilo, (Franceschi. *et al*, 1993; Nakata *et al*, 2001).

Estudios recientes han demostrado que los idioblastos requieren de grandes cantidades de oxalato de calcio para precipitar el exceso de calcio que se acumula en los tejidos y que este tipo de células es autosuficiente en la biosíntesis de oxalato de calcio y por lo tanto no requiere importar oxalato de calcio de células adyacentes del mesófilo. Adicionalmente se demostró que el ácido L- ascórbico es la mejor fuente de carbono para la formación de cristales de oxalato de calcio. Los idioblastos operan como una entidad fisiológicamente independiente con una estructura y metabolismo, provee una función de importancia a la fisiología de las células circundantes y a la planta como un todo, esto es, removiendo y almacenando el exceso de calcio (Kostman *et al*, 2001)

Es interesante mencionar que en ambas superficies foliares en *Agave tequilana*, solo se encontraron cristales tipo estiloides, rafidios y agregados de cristales, la forma drusa estuvo ausente. La variedad de formas de cristal encontradas en las especies de plantas es una indicación específica de que están genéticamente controlados y que son análogos a la biomineralización que ocurre en los animales (Webb, 1999).

La acumulación de cristales de oxalato de calcio está en relación a la función de refuerzo estructural de las paredes celulares, como elemento osmótico, en el equilibrio iónico (regulación de calcio), en desintoxicación (como un medio para desintoxicar el exceso de ácido oxálico), en reunión y reflexión de luz. Se han definido dos posibles funciones, la primera es que los cristales proveen un importante receptáculo para absorber el exceso de calcio y la segunda función es que ayudan en la defensa de las plantas contra los herbívoros, principalmente los cristales de forma acicular como los estiloides y rafidios (Webb, 1999, Arnott y Webb, 2000; Caliskan, 2000 y Jáuregui *et al*, 2003) encontrados en las superficies foliares de *Agave tequilana*.

¿Que influye en el tamaño de los cristales de los diferentes grupos de *Agave tequilana*?. Algunos autores han sugerido que la forma y tamaño de los cristales está definido por un número de factores. Estos factores incluyen el efecto mediador de macromoléculas como proteínas, polisacáridos y lípidos, también como macromoléculas de la estructura de la membrana (Webb, 1999; Nakata y McConn, 2000). Análisis genéticos en mutantes Cod (cod 1, cod 2,

cod 3, cod 6 y cod 7) de *Medicago trunculata* revelaron que una mutación puntual puede resultar en una variedad de diferentes formas y tamaños de cristales, los genes específicos que causan estas alteraciones aún no se conocen. Sin embargo, estos resultados muestran que el control de la morfología de los cristales es muy complejo y que está bajo un estricto control genético (Monje y Baran, 2002). Las mutaciones pueden afectar la función de proteínas, lípidos o polisacáridos, todo esto podría contribuir en la alteración del tamaño y forma de los cristales, (Nakata y McConn, 2000). Es evidente que la formación de cristales no es un proceso arbitrario o desordenado (Franceschi y Horner, 1980; Kostman *et al* 2001; Monje y Baran, 2002).

Para el caso específico de *Agave tequilana*, los cristales son más grandes en los individuos enfermos que en los sanos. Las hojas de plantas enfermas desarrollan cristales más grandes en la superficie abaxial, el área de los cristales tienen un incremento sustancial del 150 % (Apéndice H).

El reconocimiento del patógeno por parte de la planta desencadena una serie de cambios celulares. El incremento en la síntesis de oxalato de calcio en plantas enfermas puede atribuirse a dos razones específicas: a) el aumento del tránsito de los iones calcio a través de la membrana celular y el incremento global de calcio intracelular (recuérdese que los cristales de oxalato son una forma de almacenaje de calcio) ; b) el desencadenamiento de un choque oxidativo como resultado de la síntesis de especies reactivas de oxígeno y

nitrógeno (recuérdese que el oxalato es un producto de la activación del ciclo del ascorbato) (Nürnberg *et al.* 2001; Molina, 2003).

Aparentemente la forma de almacenamiento del calcio difiere en plantas sanas y enfermas. La forma de almacenamiento preferente en plantas sanas son cristales y cuerpos de oxalato de calcio mientras que en plantas enfermas la forma es en cristales, de acuerdo a lo observado en la Figura 4.3 y el Cuadro 5.1.

Cuadro 5.1. Análisis cualitativo de cristales, ceras, cuerpos de oxalato de calcio y papilas estomáticas en *Agave tequilana*

	Adulto Sano Abaxial	Adulto Sano Adaxial	Joven Sano Abaxial	Joven Sano Adaxial	Adulto Enfermo Abaxial	Adulto Enfermo Adaxial	Joven Enfermo Abaxial	Joven enfermo Adaxial
Ceras	*****	**	**	****	****	*****	****	****
Cristales	****			****	****		****	
Cuerpos de Oxalato de Calcio	0	*	*****	0	0	0	0	0
Papilas Estomáticas	0	0	****	**	0	0	0	****
	o No hay	* Poco	** Hay pero no relevante	**** Mucho		*****	Muchísimo	

En virtud de que algunos autores han reportado una correlación entre fitoalexinas y calcio extracelular, se recomienda, en investigaciones futuras, medir niveles de fitoalexinas y correlacionar estos con la presencia y tamaño de cristales de oxalato de calcio (Lusso y Kuc, 1999).

En los individuos sanos, los cristales se reducen a la mitad de su tamaño en la superficie abaxial. mientras que en la superficie adaxial de los adultos no se observó diferencia.

En individuos jóvenes sanos, tanto en superficie adaxial o superficie abaxial se observó la misma media de cristales, pero se presenta una pérdida de un 37% del área de los cristales en la superficie abaxial al pasar del estado joven al adulto.

De acuerdo con lo observado, el incremento en el tamaño de los cristales podría ser una respuesta de la planta al ataque de la enfermedad o algún tipo de estrés.

Presencia de Ceras

Las hojas son los principales órganos fotosintéticos, comprenden la biomasa primaria de la mayoría de las cosechas en las plantas cultivadas. Son consideradas frecuentemente como el órgano más anatómicamente variable de la planta, y las adaptaciones foliares han sido históricamente utilizadas como indicadores de condiciones ambientales (Dickson, 1999) y frecuentemente, las hojas son los primeros órganos en ser dañados por parásitos y por el estrés ambiental (Jenks *et al*, 1995; 2001).

Las ceras en las plantas son un elemento esencial en la estructura de la superficie foliar, muestran una considerable diversidad tanto en la ultraestructura como en su composición química. La importancia funcional y

ecológica de estas estructuras esta en relación fundamental para la interacción entre las plantas y su ambiente, (Barthlott, 1998).

Las ceras pueden presentarse en capas mostrando una estructura lamelar (Kolattukudy, 1980). Los componentes lamelares son muy conspicuos en algunas especies, pueden formar una delgada pero discreta capa exterior a la membrana cuticular, que contiene un sistema de delgadas láminas situadas paralelamente a la superficie de la membrana cuticular y pueden estar alternas opacas o translúcidas respectivamente. Las lamelas translúcidas están frecuentemente asociadas a las ceras epicuticulares que pueden tomar muchas formas desde amorfas hasta depósitos cristalinos (Gilly *et al.*, 1997).

En *Agave*, la cera epicuticular muestra láminas irregularmente distribuidas como cristales sobreimpuestos en un revestimiento amorfo que cubre completamente la superficie de la membrana cuticular (Wattendorff y Holloway 1980, 1982).

Aunque todas las superficies aéreas de las plantas están cubiertas por capas de ceras epicuticulares, la composición química y la apariencia de las ceras superficiales pueden variar entre tejidos de una sola planta, entre ecotipos de la misma especie y entre especies. Los tejidos pueden estar cubiertos con delgadas y transparentes capas de cera epicuticular o por una densa red de ceras cristalizadas. Adicionalmente la apariencia de las ceras

puede variar en respuesta a las condiciones del crecimiento y durante el desarrollo de la planta.

La diversidad en la composición química y las características de las ceras epicuticulares frecuentemente se han asociado con diferencias en la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Jenks y Ashworth, 1999).

Varias funciones se han atribuido a la superficie vegetal bajo diferentes condiciones ambientales. Todas las formas de agregados de ceras epicuticulares crean una superficie hidrofóbica a la intemperie que repele el agua. Algunos estudios han demostrado la relación entre la capacidad de humedecer la superficie foliar y el grado de susceptibilidad a contaminación por deposición de partículas como el polvo, esporas, etc. Las ceras epicuticulares crean una superficie rugosa que reduce la adhesión y repelencia del agua, en hojas con estas características, las partículas contaminantes son removidas por la adhesión a gotas de agua que ruedan hacia fuera de la superficie posteriormente a la lluvia, niebla o al rocío (Dickison, 1999).

Cutícula

La cutícula de la hoja no es una simple capa homogénea sobre la superficie externa de las células epidérmicas, la cutícula se modifica conforme la hoja madura (Bird, 2003). Así como la edad de la hoja influye en los cambios en la cutícula, las condiciones ambientales como fluctuaciones en la temperatura,

precipitación, la intensidad y calidad de la luz, la humedad relativa, también afectan la deposición de la cera y consecuentemente el grosor de la cutícula. La plasticidad en estas microestructuras foliares ha sido observada por Bleckmann *et al.*, (1980); Dickinson, (1999) y Semerdjieva *et al.*, (2003).

La cutícula puede variar de espesor, grado de desarrollo y composición química en las diversas especies vegetales, incluso en las superficies foliares abaxial y adaxial (Wattendorff *et al.*, 1980; Jetter *et al.*, 2000). En *Agave americana*, la cutícula es más bien gruesa, usualmente llega a medir entre 3 y 15 μm ; en *Agave cerulata* y *Agave desertii* la cutícula es densa y la superficie es elaborada, en cambio en otras especies como *Agave sobria frailensis*, *A. sobria roseana*, *A. subsimplex* y *A. vizcainoensis* la superficie es lisa (Gentry y Sauck, 1978).

En plantas adultas de *Agave tequilana*, la superficie cuticular muestra capas de ceras epicuticulares denominadas plaquetas, probablemente correspondan a lípidos solubles cuticulares en forma de agregados microscópicos de acuerdo a Barthlott *et al.*, (1998) y Jetter *et al.*, (2000). La superficie cuticular es la capa divisoria entre el ambiente y el cuerpo de la planta, no es sorprendente que esta región muestre mucha variabilidad estructural (Dickison, 1999).

Las diferencias en el grosor, formas y estructuras de la cutícula foliar pueden estar dirigidas por un patrón genético o afectadas por algún factor ambiental. El estrés hídrico y las altas temperaturas promueven cutículas más gruesas al modificarse la estructura de los cordones de cera de la epidermis (Jordan *et al.*, 1984). Las plantas de *Agave desertii* expuestas a alta concentración de CO₂, mostraron una disminución en la cera epicuticular foliar (Graham y Nobel, 1996). Por su parte, Maiti (1986) encontró que las características epidérmicas analizadas con el microscopio electrónico de barrido eran diferentes entre líneas de sorgo tolerantes y susceptibles al estrés.

En las líneas de sorgo tolerantes, las ceras epicuticulares se conforman por cubiertas de cera uniforme, esta característica proporciona una apariencia lustrosa a la superficies de las hojas, aumentando la reflectancia a la radiación incidente, por lo que la temperatura de la hoja y la pérdida de agua por transpiración se disminuyen (Maiti *et al.*, 1991, 1992). En arroz se encontró que la cantidad y la geometría de las estructuras cristalinas de las ceras epicuticulares mantienen diferencias importantes en la resistencia cuticular al flujo de vapor de agua para reducir la pérdida de agua en esta especie (O'Toole *et al.*, 1979)

Algunos autores sugieren que la formación de la cutícula no depende exclusivamente de las condiciones del estrés, la capa de lípidos que conforman las ceras epicuticulares normalmente muestra estructuras muy características y morfológicamente complejas. La forma individual y la distribución de los

cristales de ceras es independiente de las influencias del ambiente (Barthlott *et al.*, 1998). Las superficies foliares con diferente polaridad (abaxial y adaxial) presentan una respuesta diferente a estímulos ambientales como la exposición a fotoperíodos de día corto y largo, a cuya exposición repercute la formación de ciertas microestructuras epidérmicas, por ejemplo: tricomas exclusivamente en el lado adaxial (Chien y Sussex, 1996). Esto también podrían influir en el grosor de la cutícula en *Agave tequilana*.

En plantas *in vitro* transferidas a *ex vitro* en condiciones ambientalmente nuevas la formación de cutina se redujo, pero solo temporalmente. Así mismo, el aumento en la densidad de la cutícula de plantas jóvenes (0.22 μm) a hojas expandidas (0.70 μm) mostró que la biosíntesis de cutina permanece activa aún en condiciones ambientalmente nuevas, situación que adicionalmente depende de la edad de la hoja (Guilly *et al.*, 1997).

A este respecto, algunos autores señalan que la estructura y química de las ceras epicuticulares no es estática, sino que cambian durante el desarrollo de la planta, por ejemplo en hojas jóvenes de monocotiledóneas y dicotiledóneas, la cantidad de ceras es mucho menor por unidad de área foliar que en las hojas más viejas y además, la cantidad de ceras generalmente se reduce durante la senescencia de la hoja (Jenks y Ashworth, 1999).

La densidad de la cutícula y la cantidad de ceras sobre la superficie foliar de las plantas tiene una relación directa con mayor mayor resistencia a hongos patógenos; cutículas más gruesas mostraron una mayor resistencia a enfermedades causadas por hongos en *Coffea arabica*, *Fragaria x ananassa*, *Sorghum*, *Rosa hybrida* (Jenks y Ashworth, 1999). Una fuerte relación entre la cantidad o el relieve de la estructura fina de las ceras proveen de acuerdo a Schwab *et al.*, (1996) una barrera muy eficiente contra el ataque de hongos y evidentemente redujeron la intensidad de la infección por *Botrytis cinerea*.

Los valores del espesor de la cutícula en las plantas adultas sanas de *Agave tequilana* observados en esta investigación (abaxial 9 μm ; adaxial 9 μm) son similares (3 – 15 μm) a lo previamente reportado por Kolattukudy (1980) y Nobel (1988).

En condición de enfermedad en las plantas adultas de *Agave tequilana*, no ocurre un engrosamiento paralelo de la cutícula en ambas superficies foliares (abaxial 10 μm ; adaxial 5 μm) como sucede en el adulto sano. En los individuos adultos enfermos, la cutícula en la superficie foliar abaxial es entonces el doble de grueso, que en la superficie foliar adaxial.

La causa precisa de esta diferencia substancial en el espesor de la cutícula de la superficie foliar adaxial en plantas enfermas no es clara. Posiblemente se inhibió la acumulación de cera por el efecto de la enfermedad.

Alternativamente, puede haber ocurrido degradación de la cutina. Algunos patógenos y saprofitos como *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, *Fusarium roseum sambucinum*, *Ulocladium consortiale*, *Helminthosporum consortiale*, *Helminthosporum sativum* y *Streptomyces sabies*, pueden crecer sobre la cutina y utilizarla como la única fuente de carbono. Se ha sugerido que tales organismos excretan una enzima (cutinasa) que hidroliza la cutina, (Kolattukudy, 1980; Bell, 1981).

Papilas Cuticulares

La presencia de papilas cuticulares en ambas superficies foliares (abaxial y adaxial) en las plantas jóvenes, confiere una apariencia rugosa a la superficie foliar en *Agave tequilana*, que junto con la propiedad hidrofóbica de la cutícula da una ventaja adaptativa, la cual no permite que las partículas de polvo, esporas de hongos o contaminantes permanezcan en la superficie foliar debido a que las gotas de agua al rodar hacia fuera de la hoja arrastran estas partículas reduciendo considerablemente la adhesión de agua y de partículas, la naturaleza de las papilas cuticulares puede mostrar una tendencia del efecto Lottus (Barthlott, 1998).

La ventaja adaptativa en las plantas jóvenes de *Agave tequilana* por la presencia de las papilas cuticulares podría adicionalmente fungir como un

mecanismo de defensa contra herbivoría por insectos fitófagos (Lucas *et al.*, 2000).

Estado del Complejo Estomático

Mientras que la organización del complejo estomático de *Agave tequilana* concuerda con la descripción y ubicación morfológica registrada por Esau (1972), Gentry y Sauck (1978) y Salisbury y Ross (1992). En comparación con los valores registrados para otras especies de *Agave* por Gentry y Sauck (1978), el área promedio de los complejos estomáticos de *Agave tequilana* fue mucho menor tanto en la superficie abaxial como adaxial (Cuadro 5.2 a y 5.2 b).

Cuadro 5.2 a. Comparación de microestructuras epidérmicas foliares en *Agave tequilana* y *Agave spp*

<i>Agave spp</i>	CE μ		CA μ^2		CS μ^2		CU μ	
	Ab	Ad	Ab	Ad	Ab	Ad	Ab	Ad
<i>Agave tequilana</i> *	44 x 42	17 x 39	48.39	20.01	12	7	8.67	8.75
<i>A. cerulata</i> **	***140 x 95							
<i>A. nelsonii</i> **	***132 x 96							
<i>A. deserti</i> **	***128 x 82							
<i>A. sobria ssp roseana</i> **	***197 x 78							
<i>A. aurea</i> **	***152 x 85							
<i>A. capensis</i> **	***125 x 80							
<i>A. promontorii</i> **	***126 x 84							

* Resultados de esta investigación
 ** Gentry y Sauck (1978)
 *** no especifican superficie foliar
 **** estomas / mm²

Ab = abaxial
 Ad = adaxial
 μ = micrometros
 μ^2 = micrometros cuadrados

CE= complejo estomático
 CA = células acompañantes
 CS= cámara supraestomática
 CU = cutícula

Cuadro 5.2 b. Comparación de microestructuras epidérmicas foliares en *Agave tequilana* y *Agave spp*

<i>Agave spp</i>	CR μ^2		DE****		IE		DIES μ	
	Ab	Ad	Ab	Ad	Ab	Ad	Ab	Ad
<i>Agave tequilana</i> *	17.86	34.73	95	100	7%	6%	50.48	50.43
<i>A. cerulata</i> **			33	52				
<i>A. nelsonii</i> **			31	37				
<i>A. deserti</i> **			34	52				
<i>A. sobria ssp roseana</i> **			30	34				
<i>A. aurea</i> **			12	18				
<i>A. capensis</i> **			19	31				
<i>A. promontorii</i> **			18	21				

* Resultados de esta investigación
 ** Gentry y Sauck (1978)
 *** no especifican superficie foliar
 **** estomas / mm²

Ab = abaxial
 Ad = adaxial
 μ = micrometros
 μ^2 = micrometros cuadrados

CR= cristales
 DE = densidad estomática
 IE = índice estomático
 DIES = distancia interestomática

Los estomas representan el sitio principal de penetración de contaminantes en algunas plantas, la estructura, la frecuencia y la distribución de los estomas se consideran importantes variables que afectan la sensibilidad de la planta a la exposición de contaminantes y sobre todo la resistencia foliar. Sin embargo, los intentos para demostrar un modelo general sobre la relación entre la resistencia estomática y la regulación de la absorción de algún contaminante se encuentran aún en desarrollo. A pesar del entendimiento general acerca de esta relación, hay muchas condiciones estructurales para las cuales ha sido difícil adjudicar una función fisiológica o el mecanismo de la función no ha sido esclarecido satisfactoriamente (Dickison, 1999).

En la superficie adaxial del grupo de plantas adultas de *Agave tequilana* en condición enferma el tamaño del complejo estomático aumentó considerablemente.

Células Anexas

En nuestro conocimiento no existen reportes previos de tamaños promedio de las células anexas en el género *Agave*, por lo que éste representa el primer registro de las dimensiones de éstas estructuras, lo que complementa el estudio descriptivo de las microestructuras foliares en *Agave tequilana*. Adicionalmente, la descripción morfológica de las células anexas concuerda con la información de Gentry y Sauck (1978).

La presencia constante de cuatro células anexas o subsidiarias (Gentry y Sauck, 1978) en el complejo estomático de *Agave tequilana*, representa un nivel más alto de desarrollo y avance evolutivo, puesto que la más importante función de estas células es el almacenamiento de grandes cantidades de agua y iones porque ningún plasmodesmata ocurre entre las células oclusivas maduras, células anexas y otras ordinarias células epidérmicas, estos materiales deben moverse por el apoplasto (Dickison, 1999). Las células oclusivas pierden sus conexiones plasmodesmáticas durante la diferenciación temprana, por lo visto debido a la turgencia alta que estas células deben de mantener para abrir el poro estomático u ostíolo (Bird *et al.*, 2003).

Papilas estomáticas

En esta investigación se introduce por primera vez el nombre de papilas estomáticas y su asociación con la presencia del estoma en *Agave tequilana*. Una microestructura denominada “bordes”, que deriva del engrosamiento de las paredes celulares de las células subsidiarias adyacentes polares y laterales al nivel de la abertura interna del complejo estomático para *Agave* spp fue descrita por Gentry y Sauck (1978) y coincide con la nominación de papilas estomáticas asignada particularmente para *Agave tequilana*.

Las papilas estomáticas son unas microestructuras epidérmicas foliares que se forman por la acumulación de cera sobre las proyecciones de las células anexas adjuntas al complejo estomático de esta especie. Posiblemente esta adaptación micromorfológica mitigue las temperaturas altas en la epidermis y de protección a las células oclusivas en *Agave tequilana*.

En las plantas adultas de *A. tequilana*, el área de las papilas estomáticas es mayor en la superficie foliar abaxial. Al cotejar con la respectiva superficie foliar en los individuos adultos enfermos se observó una reducción en el área de las papilas estomáticas de aproximadamente un 40% en comparación con los individuos sanos. Posiblemente el efecto de la enfermedad alteró sustancialmente la acumulación de cera en esta microestructura epidérmica foliar. Sin embargo, no se encontró alguna referencia previa.

Células Oclusivas

En *Agave tequilana* las células oclusivas se encuentran en depresiones; en *Agave cerulata* y *Agave desertii* los estomas están profundamente comprimidos, en cambio en otras especies como *A. sobria frailensis*, *A. sobria roseana*, *A. subsimplex* y *A. vizcainoensis* los estomas no están profundamente comprimidos (Gentry y Sauck ,1978)

En esta investigación, la única diferencia se da en la superficie abaxial de plantas adultas sanas de *Agave tequilana*. Es importante hacer hincapié en que los valores dados para el área de las células oclusivas son aproximados dado la sensibilidad de la respuesta de estas células al momento de obtener la muestra foliar en campo y a las limitaciones propias del manejo de los cortes histológicos, por lo que esta información se debe manejar con reserva.

Cámara Subestomática

En *Agave tequilana*, el área de la cámara subestomática (cavidad que se forma por la ausencia de células del mesófilo en las cercanías del estoma) mantiene una tendencia de crecimiento acorde a la edad en la hoja de esta especie, (Dickison, 1999).

Cámara Supraestomática

En todos los grupos estudiados en *Agave tequilana*, la cámara supraestomática mantiene una tendencia semejante, la superficie foliar abaxial presenta la mayor área libre, mientras que en la superficie foliar adaxial, es menor la dimensión de esta microestructura foliar tanto en los individuos sanos como enfermos.

Una mayor acumulación de cera en la superficie adaxial disminuye el área libre de la cámara supraestomática en las plantas adultas sanas y enfermas de *Agave tequilana*.

Abertura de la Cavidad Supraestomática

Este es el primer registro sobre dimensiones de la abertura de la cavidad supraestomática, que forman las células anexas en el complejo estomático de *Agave tequilana*. Con esto se demuestra que las células oclusivas se encuentran en una depresión por debajo del nivel de células anexas o subsidiarias. Las células oclusivas en la posición hundida favorece la minimización de la pérdida del vapor de agua, como parte de una adaptación al ambiente.

Dimensiones del Tapón de Cera

En *Agave tequilana* el tapón de cera que se deposita en la cámara supraestomática refuerza la protección de las células oclusivas reduciendo la pérdida de agua. En *Agave americana*, los depósitos de los cristales de cera, estaban particularmente densos alrededor de los poros estomáticos (Wattendorff y Holloway, 1982).

La condición de salud (enfermo), así como la superficie foliar adaxial, posiblemente fueron la causa de la reducción del tapón de cera en las plantas adultas de *Agave tequilana*.

Densidad Estomática

La densidad estomática en *Agave tequilana* es dos veces superior -en el rango máximo- a los valores que presentaron Gentry y Sauck (1978) y Nobel (1988) para otras especies de *Agave*. Por otra parte, los valores para *A. tequilana* se encuentran abajo del límite inferior de otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas cultivadas (Essau, 1972; Nobel, 1983; Merva, 1995; Özeke y Misirli, 1999; Verdugo *et al*, 1999; Laskowski, 2000; Panja y De D K. 2001 y Benavides *et al.*, 2003).

La densidad estomática en *Agave tequilana* (grupo Rigidiae) es uniforme en ambas superficies foliares, mientras que en los grupos Deserticolae,

Campaniflorae y Umbelliflorae del género *Agave*, el número de estomas es mayor en la superficie adaxial que en la correspondiente abaxial (Gentry y Sauck, 1978).

Estos datos muestran claramente que la densidad y distribución de estomas presentan variabilidad, que no están distribuidos al azar y que la densidad es controlada por factores endógenos y ambientales (O'Leary y Knech, 1981; Berger *et al*, 2001; Bird y Gray, 2003) en las diferentes especies del género *Agave* y de otros grupos de plantas. En ciertas especies como *Malpighigia emarginata* (Malpighiaceae) los estomas se encuentran confinados a la superficie foliar abaxial (Laskowski, 2000). Mientras que en *Desmodium concinnum*, *D. diffusum*, *D. gangeticum*, *D. laxiflorum*, *D. lycarpum*, *D. scalpe*, así como en *Ougeinia oojeinensis* (Fabaceae) los estomas se encuentran ausentes en la superficie adaxial (Kothari y Shah, 1975).

Tanto la densidad estomática como la distribución de los estomas representan un factor decisivo en la capacidad del intercambio gaseoso en *Agave*. Adicionalmente, se ha mencionado que la fracción del área de la superficie foliar ocupada por los poros estomáticos es de gran importancia en el intercambio gaseoso, cuando se abren y cierran el par de células oclusivas en respuesta a estímulos ambientales y fisiológicos (Nobel, 1988).

La frecuencia baja de estomas en *Agave tequilana*, en contraste con otras especies cultivadas, puede sugerir una menor capacidad para el intercambio gaseoso con el ambiente (Raschke, 1966).

Se sabe que la disminución en el índice y la densidad estomática es una respuesta de aclimatación para restringir la pérdida de agua (Schoettle y Rochelle, 2000), una baja frecuencia estomática se ha correlacionado con tolerancia a la sequía (Richardson *et al.*, 2000), por lo que la posición intermedia del número de estomas de *Agave tequilana* pudiera reflejar la adaptación de la planta a los sistemas de cultivo realizados durante muchas generaciones.

Algunas plantas cultivadas responden a ciertos factores ambientales negativos, disminuyendo el número de estomas en la superficie foliar adaxial de tomate expuesto a estrés salino (Salas *et al.*, 2001) o plántulas de chile serrano sometidas a estrés por temperaturas bajas (Benavides *et al.*, 2002).

La densidad e índice estomático, así como la densidad de células epidérmicas son características anatómicas que no están asociadas a cualidades de resistencia o susceptibilidad al ataque de roya en genotipos de café (Silva *et al.*, 1998).

Distribución de Estomas

En cuanto a la distribución de los estomas los datos concuerdan con lo reportado por Gentry y Sauck (1978) y Nobel (1988) respecto a la presencia de estomas en ambas superficies de la hoja en *Agave tequilana*. Asimismo se observó una tendencia a organizarse en líneas o hileras cortas de 3 a 7 estomas.

Las monocotiledóneas presentan una uniformidad en la distribución de estomas al alcanzar la madurez. En plantas cultivadas, la baja temperatura puede afectar la división celular y causar cambios en el modelo de la distribución de los estomas, Croxdale (1997).

Agave tequilana presenta estomas en ambas superficies foliares (abaxial - adaxial), de acuerdo a esto corresponden a hojas anfistomáticas (Essau, 1972; Fahn, 1990). En otras especies, esta característica se encuentra relacionada a exposiciones de intensidades altas de luz, la presencia de estomas en ambas superficies foliares proporciona a la planta un grado adicional de libertad en la regulación del intercambio gaseoso por la facultad de abrir y cerrar los estomas en ambas superficies foliares (Mott y Michaelson, 1991).

En *Agave tequilana*, la cantidad de cera que se deposita dentro de la cámara supraestomática, da la pauta a considerar que a pesar de tener hojas anfistomáticas, los estomas en la superficie foliar adaxial mantienen una dependencia de transpiración sobre la abertura estomática mucho menor que

en hojas hipostomáticas (Pachepsky *et al*, 2000). La cera sobre las células oclusivas en *Agave tequilana* puede disminuir la deshidratación durante las horas de mayor radiación solar (Thomas, 2000; Lüttge, 2004).

Índice Estomático

El índice estomático de 6 a 7 para ambas superficies foliares en *Agave tequilana* se reporta por primera vez. La literatura existente en monocotiledóneas ha sido dirigida principalmente hacia la densidad estomática, más que hacia el índice estomático. Sin embargo, en plantas de ajo (*Allium sativum*) Verdugo *et al.*, (1999) reportaron valores promedio de 39.64 en el lado adaxial y de 39.65 en el abaxial. Por otra parte, en plantas de chile (*Capsicum annum*) se reportaron rangos de 13 a 18 para la superficie adaxial y de 27 a 38 para la abaxial (Benavides *et al.*, 2002). En algodón, el índice estomático fue mayor en la superficie abaxial de la hoja y de la bráctea (18.4 y 9.4 respectivamente) que en la correspondiente superficie adaxial (14.4 y 4.7 respectivamente), Bondada y Oosterhuis (2000). Comparados con dichos promedios los valores aquí encontrados en *Agave tequilana* son bajos.

El índice estomático está en relación a la función del total de radiación recibida y de las variaciones que ésta experimenta durante los días precedentes a la diferenciación de los estomas en la hoja, se menciona que esta característica puede considerarse más bien representativa de la adaptación al medio ambiente de la planta que como un rasgo constante de valor taxonómico,

ya que el índice estomático puede disminuir cuando se expone la planta a la longitud de onda azul, mientras que la longitud de onda roja cause un efecto de aumento en el índice estomático (Schoch *et al.*, 1980).

Distancia Interestomática

Se presenta en primicia los valores que indican la distancia entre estomas en *Agave tequilana*. Dado que no hay registros previos, estos valores no pudieron ser comparados con otros.

En *Agave tequilana* el espacio entre dos estomas contiguos está ocupado por varias células epidérmicas típicas cuyo número fluctúa entre cuatro y diez células en una misma hilera, esta información concuerda con el valor de por lo menos una célula entre estoma y estoma (Larkin *et al.*, 1997; Bird y Gray, 2003).

¿Cuál es la importancia de esta separación entre estomas? La distancia entre estomas puede ocurrir o ser una estrategia para prevenir traslapes entre estomas, de tal forma que el intercambio máximo de gas sea ganado con el menor número de estomas (Bird y Gray, 2003).

En *Agave tequilana*, el espacio entre estomas de hileras contiguas suele ser menor y corresponde a dos o tres células epidérmicas. Dado que no hay registros previos, estos valores no pudieron ser comparados con otros.

Los estomas en *Agave tequilana* siguen un patrón de alineamiento como las monocotiledóneas y algunas coníferas, concordando además en que los estomas están separados en la superficie foliar por áreas carentes de estomas (Dickison, 1999).

Dimensiones y Densidad de Células Epidérmicas

Se presentan por primera vez los valores del área y densidad de las células epidérmicas para ambas superficies foliares en *Agave tequilana*. En la literatura consultada no se encontró antecedente alguno al tamaño y número de células epidérmicas en *Agave*, por tal motivo estos valores no pudieron ser comparados con otros. Sin embargo, se cree prudente señalar que las células varían de tamaño con la edad de la planta, por lo que no es recomendable utilizar células de tejidos inmaduros o jóvenes como una fuente de información cuantitativa y definitiva (Dickison, 1999)

CONCLUSIÓN

La organización de la epidermis foliar de *Agave tequilana* es en general similar a la de otras especies de monocotiledóneas. Sin embargo, ciertas peculiaridades anatómicas deben mencionarse: un complejo estomático de área muy pequeña comparada con la de otros agaves, y una densidad estomática relativamente alta, probablemente resultante de estrategias o adaptaciones específicas, que se han mantenido a lo largo del proceso de selección artificial al que ciertamente ha estado sometida la especie por muchas generaciones.

Este trabajo de investigación por primera vez documenta extensivamente las características anatómicas de las microestructuras epidérmicas foliares asociadas al complejo estomático estudiadas en las plantas cultivadas sanas y enfermas de *Agave tequilana* Weber.

La comparación entre plantas sanas y enfermas revela diferencias en varias microestructuras epidérmicas foliares en las plantas adultas enfermas de *Agave tequilana*. Son características distintivas el adelgazamiento de cutículas, el tapón de cera de menor tamaño y la mucha mayor distancia interestomática en la superficie foliar adaxial. Adicionalmente, los cristales de oxalato de calcio

de mayor tamaño se observan particularmente en la superficie abaxial de las plantas adultas enfermas. Destaca notablemente, la ausencia de los cuerpos de oxalato de calcio en las plantas enfermas de *Agave tequilana*.

LITERATURA CITADA

- Aceves R. J. de J. 2002. Aislamiento, identificación, incremento e inoculación de patógenos asociados a la marchitez del agave: 33 – 45, In: INIFAP-CIRPAC.Campo Experimental Altos de Jalisco, Flores L. H.E. et al 2002. Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC.C.E. Altos de Jalisco. Publicación especial Núm. 1. Tepatitlán, Jalisco, México.161 pp.
- Arnott H.J. and MA. Webb, 2000. Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): Implications for crystal stability and function.International Journal of Plant Sciences 161(1):133-142.
- Agrotamaulipas.agave azul
www.agrotamaulipas.gob.mx/lo
mejor/agricultura/agave.azul/lomejor.agave.htm
- Barthlott W. N., 1998. Classification and terminology of plants waxes. Botanical Journal of the Linnean Society, 126(3) 237- 260.
- Barthlott W.N., C.Neinhuis, I.Theisen, and F.Ditsch. 1998..Epicuticular wax micromorphology and angiosperm classification, abstracts Annual Meeting of the Botanical Society of America
<http://www.ou.edu/cas/botany-micro/bsa-abst/section13/abstracts/172.shtml>
- Bell, A.A., 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32:21-81.
- Benavides M.A., H. Ramírez R., V. Robledo T., J. Hernández D., G. Ramírez M., E. Bacopulos T., A. Sandoval R. y M.A. Bustamante G. 2002. Seed treatment with salicylates modifies stomatal distribution, stomatal density, and the tolerance to cold stress in pepper seedlings. Proceedings of the 16th International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas, México.

- Benavides M.A. 2003. Estrategias para el uso de los mecanismos naturales de tolerancia al estrés en plantas. 1 - 8 pp.
http://dradalbertobenavides.com/arti/confabm_uanl.htm
- Berger U., V. Bieberstein and T. Altmann, 2001. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution. New Phytologist, Stomata 2001 Conference.
<http://www.shef.ac.uk/uni/academic/A-C/aps/newphyt/absberger.html>
- Berlyn G. P. and J.P.Miksche 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press. Ames. Iowa. 326 pp.
- Bird S.M. and J. E.Gray. 2003. Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. New Phytol. 157:9-23 pp.
- Bleckmann C.A.,H.M. Hull and R.W.Hoshaw, 1980. Cuticular ultrastructure of *Prosopis velutina* and *Acacia Greggii* leaflets. Bot. Gaz. 141 (1):1 – 8.
- Bondada R.B. and D.M. Oosterhuis,2000. Comparative epidermal ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract and capsule wall. Annals of Botany 86: 1143 – 1152.
- Caliskan M., 2000. The metabolism of oxalic acid, Turk, J. Zool. 24: 103-106.
- Castañeda V., H. 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez de agave tequilero,: 33- 49. In : INIFAP-CIRPAC.Campo Experimental Altos de Jalisco, Flores L. H.E. et al 2002. Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var *azul* con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC.C.E. Altos de Jalisco. Publicación especial Núm. 1. Tepatlán, Jalisco, México.161 pp.
- Chien J.C. and I.M. Sussex. 1996 Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Physiol. 111(4): 1321 – 1328.
- Consejo regulador del tequila
<http://www.crt.org.mx>
- Croxdale J.L. (1997) Stomatal partening in monocotyledons: Tradescantia as a model , In: The Society for Experimental Biology Annual Meeting, P7.2 , University of Kent at Canterbury 7 –11 April,1997.
- Coupland G., C. Fankhauser y M.A. Blázquez, 2003. Plasticity in plant morphogenesis . Anales del Centro de Reuniones Internacionales sobre Biología., 150 (24- 26/ II)
<http://www.march.es/cultura/boletin-junio/biología.pdf>

<http://www.march.es/información/inglés/anales/pdf/2003/009.pdf>

- Cullis C.A. 1999. The environment as an active generator of adaptative genomic variation In: Plant response to environmental stresses Ed. Lerner H.L. 730 pp.
- D'Ambrogio de A. A. 1986. Manual de Técnicas de Histología Vegetal Ed. Hemisferio Sur, Argentina. 83 pp.
- Dickison C.W. 1999. Integrative Plant Anatomy, Academic Press. 730 pp.
- Essau, K. 1972. Anatomy of Seeds Plants. 2 nd edition. Jhon Wiley and Sons, New York. 550 pp.
- Fahn A. 1990. Plant Anatomy. 4th. ed. Pergamon Press, Oxford 587 pp
- Flores L. H.E., K.F. Byerly M., J. de J. Aceves R., J. A. Ruíz C. 2002. Diagnóstico del sistema de producción de agave con énfasis en problemas fitosanitarios, : 63 – 95. In: INIFAP-CIRPAC. Campo Experimental Altos de Jalisco, Flores L, H.E. *et al* 2002. Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var *azul* con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC.C.E. Altos de Jalisco. Publicación especial Núm. 1. Tepatitlán, Jalisco, México. 161 pp.
- Fowke C. L. and P.J. Rennie 1995. Botanical Microtechnique for Plant Cultures :217-228, In: Gamborg L.O. and G.C. Phillips. Plant Cell, Tissue and Organ Culture .
- Franceschi V. R. and H. T. Horner, 1980. Calcium oxalate crystals in plants. The Botanical Review 46, 361: 427.
- Franceschi V.R., X. Li, D.Zhang and T. W. Okita, 1993. Calsequestrinlike calcium-binding protein is expressed in calcium – accumulating cells of *Pistia stratoites*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Plant Biology, 90 : 6986 - 6990
- Fucikovsky Z. L. 1999 a. La Tristeza y Muerte del *Agave tequilana* Weber variedad *azul* (TMA). Programa General de Apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva Agave-Tequila. Tercer informe de avances CONACYT, Gobierno del Estado de Jalisco, Consejo Regulador del Tequila.
- Fucikovsky Z. L. 1999 b. La Tristeza y Muerte del agave (TMA), importante enfermedad del *Agave tequilana* Weber var. *azul* . Colegio de Postgraduados Instituto de Fitosanidad. Avances en investigación 1999. <http://www.colpos.mx/ifit/entacar/avances/017.html>

- Fucikovsky Z. L. y J. Velásquez. 2002. Complex bacterial, fungal and insect invasion of *Agave tequilana* Weber, var. *azul*, In: México, 3rd International Bacterial Wilt Symposium .
http://ibws.nexenservices.com/RSA%20Programm/Monday_poster.htm
- Galván V. R. 1988. Las familias Amaryllidaceae, Juncaceae y Liliaceae en el Valle de México. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 348 pp.
- Galván, V. R. 2001. Agavaceae. Flora del Valle de México. Rzedowski & Rzedowski (Eds.). 2a. ed., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Uso y la Conservación de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Mich., México. 1242-1250 pp.
- Gentry, H.S. and J.R. Sauck. 1978. The stomatal complex in *Agave*: groups Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. Proceedings of the California Academy of Sciences. 41: 371-387.
- Gentry H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. 670 pp.
- Gilly C., R. Rohr, A. Chamel. 1997. Ultraestructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) Plants *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. Ann. Bot. 80: 139-145.
- Glover B.J. 2000. Differentiation in plant epidermal cells. J. Exp.Bot.51(344): 497-505.
- Goldstein J. et al 1981. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum Press, New York. 615 pp.
- Graham E.A. & P.S.Nobel 1996. Long-term effects of a doubled atmospheric CO₂ concentration on the CAM species *Agave desertii*. Journal of Experimental Botany, 47(294):61
- Grene R., Oxidative stress and acclimation mechanism in plants (March 27, 2001), The *Arabidopsis* Book, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0009, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Hennig-Gizewski S. and W. Wirth, 2000. Changes in the biosynthesis of epicuticular waxes in maize and their influence on wetting properties. Pflanzenschutz- Nachrichten, Bayer 1 /00, 1 pp: 105 -125
[http://www.bayercropscience.com/bayer/cropscience/cscms.nsf/ID/4tharticle012000_EN/\\$file/4_hennig2000.pdf](http://www.bayercropscience.com/bayer/cropscience/cscms.nsf/ID/4tharticle012000_EN/$file/4_hennig2000.pdf)

- Henrickson, J. and M.C. Johnston. 1997. (prepublication). A Flora of the Chihuahuan desert region, Published by J. Henrickson, Los Angeles, California. 1687 pp.
- INIFAP-CIRPAC. Campo Experimental Altos de Jalisco, Flores L. H.E. et al 2002. Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var *azul* con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC.C.E. Altos de Jalisco. Publicación especial Núm. 1. Tepatitlán, Jalisco, México. 161 pp.
- Inzé D., 2003. Why should we study the plant cell cycle. *Journal of Experimental Botany*, 54 (385): 1125 – 1126.
- Itai Ch., 1999. Role of phytohormones in plant responses to stresses. In: *Plant response to environmental stresses* Ed. Lerner H.L. 730 pp.
- Jauregui Z. D, J.P.Reyes G., J.D. Sepúlveda S., J.R. Whitaker and A. Moreno, 2003. Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol.*, 160(3):239-45.
- Jenks M.A., H.A. Tuttle, S.D. Eigenbrode and K.A. Feldmann, 1995. Leaf epicuticular waxes of the *Eceriferum* mutants, In: *Arabidopsis.*, *Plant Physiol.*, 108: 369 – 377.
- Jenks M.A. and E.N. Ashworth, 1999. Plant epicuticular waxes: function, production and genetics. *Horticultural reviews*, Vol. 23 : 1 – 68
- Jenks M. A., S.D. Eigenbrode and B. Lemieux, *Cuticular waxes of Arabidopsis* (march 27, 2001). *The Arabidopsis Book*, eds.C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0009.
<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Jetter R., M. Schäffer and M. Riederer, 2000. Leaf cuticular waxes and arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell and Environmental*. 23: 619 – 628.
- Jordan R.W., P.J. Shouse, A. Blum, F. R. Miller and R. L. Monk 1984. Environmental physiology of *Sorghum*. II. Epicuticular wax load and cuticular transpiration. *Crop Science* 24: 1168-1173.
- Kolattukudy P.E. 1980. Biopolyester membranes of plants: Cutin and Suberin. *Science*, 208:990-1000

- Klomprens L.K.,S.L. Fleger and G.R. Hooper 1986. Procedures for transmission and scanning electron microscopy for biological and medical science. Center for Electron Optics: Michigan State University. 177 pp.
- Kostman,T.A., N.M. Tarlyn, F.A., Loewus and V.R Franceschi. 2001. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol*, 125(2):634-640.
- Kothari J.M. and G.L. Shah 1975. Epidermal structures and ontogeny of stomata in the Papilionaceae (tribe Hedysareae). *Bot. Gaz.* 136(4): 372 – 379.
- Larkin J.C., M.D.Marks, J. Nadeau and F. Sack, 1997. Epidermal cell fate and patterning in leaves. *The Plant Cell* 9 : 1109 – 1120.
- Laskowski E. L., 2000. Características anatómicas de la hoja y el tallo del semeruco (*Malpighia emarginata* DC) cultivado en dos localidades del estado de Lara. *Bioagro* 12 (2): 33 – 40.
- Lawson T., W. James and J. Weyers. 1997 A Surrogate measure of stomatal aperture, en: *The Society for Experimental Biology Annual Meeting*, P 7.2 , University of Kent at Canterbury 7 –11 April,1997.
- Lawson T. and J. Weyers. 1997 The nature of heterogeneity in the stomatal behaviour of *Phaseolus vulgaris* L. Primary leaves, *In: The Society for Experimental Biology Annual Meeting*, P7.2 , University of Kent at Canterbury 7 –11 April, 1997.
- Lerner H. R., 1999. *Plant responses to environmental stresses*, 730 pp.
- Levine A., 1999. Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants. *In: Plant responses to environmental stresses*. Ed. Lerner H. R., 730 pp.
- Lucas P.W., I.M.Turner, N.J. Dominy and N.Yamashita 2000. Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany* 86 : 913 – 920.
- Lusso M. and J. Kuc. 1999. Plant responses to pathogens. *In: Plant response to environmental stresses* Ed. Lerner H.L. 730 pp.
- Lüttge U., 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629 – 652.
- Maiti, R.K. 1986. *Morfología, crecimiento y desarrollo del sorgo*. Facultad de Agronomía, UANL. Marín, N.L. 419 pp.

- Maiti K.R., J. Verde S., S. Martínez L. and J.A. Rodríguez A., 1991. Evaluation of some glossy sorghum strains for epicuticular wax, chlorophyll and hydrocyanic acid content at the seedling stage. *Publicaciones Biologicas-F.C.B./ U.A.N.L.*, México, 5(2) 27-30.
- Maiti K.R., J.L. Hernández P. and S. Martínez L. 1992. Variability in leaf epicuticular wax and surface characteristics in glossy *Sorghum* genotypes (*Sorghum bicolor* L, Moench.) and its possible relation to shoot fly (*Atherigona soccata* Rond.) and drought resistance at the seedling stage. *Publicaciones Biologicas- F.C.B./ U.A.N.L.*, México, 6 (2) 159-168.
- Maiti, R.K., M. De la Rosa I., N.D. Sandoval, 1994: Genotypic variability in glossy *Sorghum* lines for resistance to drought, salinity and temperature stress at the seedling stage. *J. Plant Physiol.* 143: 241- 244.
- Martínez M.J. L., M. Vázquez G., E. Pimienta B., F. Flores M., R. Ibarra D., P. Torres M., H. Cuevas C., R. Rodríguez R. y G. Virgen C. 1999. Avances del proyecto: Epidemiología y Manejo Integrado de Problemas Fitosanitarios en *Agave* (*Agave tequilana* Weber var. *azul*). Tercer informe de avances CONACYT, Gobierno del Estado de Jalisco, Consejo Regulador del Tequila.
- Mauseth J. D. 1988. *Plant Anatomy*, Benjamin-Cummings Publishing Company: 600 pp.
- Merva E. G., 1995. *Physical Principles of the Plant Biosystem*. American Society of Agricultural Engineers, 272 pp.
- Meyerowitz E. Scanning Electron Microscope. Tissue fixation and dissection. <http://iprotocol.mit.edu/protocol/115.htm>
- Molina A., 2003. Péptidos antimicrobianos e inmunidad innata en plantas. *Biopress.net*, 7: 1-9. <http://www.biopress.net/articulos/articulo0705.htm>
- Monje P.V. and E. J. Baran, 2002. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiol.* 128: 707 -713.
- Moreno I. J., P. Rodríguez Gzz., H.E. Flores L. y J. Flores M., 2002. Epidemiología de la "marchitez" del agave azul *Agave tequilana* Weber, variedad *azul*. :51-62, . In: INIFAP-CIRPAC. Campo Experimental Altos de Jalisco, Flores L, H.E. et al 2002. Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var *azul* con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC.C.E. Altos de Jalisco. Publicación especial Núm. 1. Tepatitlán, Jalisco, México. 161 pp.

- Mott, K.A. and Michaelson, O. 1991. Amphistomy as an adaptation to high light intensity in *Ambrosia cordifolia* (Compositae). *American Journal of Botany* 78: 76-79 pp.
- Nakata P.A. and M.M. McConn, 2000. Isolation of *Medicago trunculata* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiol.* 124:1097-1104.
- Nakata P.A., T.O. Kostman and V. R. Franceschi, 2001. A role for endoplasmic reticulum subdomains in high-capacity calcium sequestration in plants. Tekran, Agricultural Research Service USDA. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000011/88/0000118813.html>
- Nobel P.S. 1983. *Biophysical Plant Physiology and Ecology*. W.H. Freeman, San Francisco /New York. 608 pp
- Nobel P. S. 1988. *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge University Press. 270 pp.
- Nürnberg T., F. Brunner, B. Kemmerling and L. Piater.2001. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266.
<http://www.blackwellsynergy.com/links/doi/10.1111/j.01052896.2004.0119.x/enhancedabs/>
- Nusse R., J.F. de Celis y J. C. Izpisúa B. 2003 Wnt Genes and Wnt signalling. . *Anales del Centro de Reuniones Internacionales sobre Biología.*, Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, 151 (24- 26/ III)
<http://www.march.es/cultura/boletin-junio/biología.pdf>
<http://www.march.es/información/inglés/anales/pdf/2003/009.pdf>
- Ochoa M. C., S. Mendoza Ch. y J.P. Martínez S.1999. Detección molecular y análisis genético del agente acusal de la pudrición de la raíz de *Agave tequilana* Weber var. *azul*. Tercer informe de avances CONACYT, Gobierno del Estado de Jalisco, Consejo Regulador del Tequila.
- O'Leary J. W. and G. N. Knech,1981. Elevated CO₂ concentration increases stomata numbers in *Phaseolus vulgaris* leaves. *Bot. Gaz.* 142(4):438 – 441.
- O'Toole J.C., R.T. Cruz and J.N. Seiber, 1979. Epicuticular wax and cuticular resistance in rice. *Physiol. Plant.* 47: 239-244.
- Ozeker E.; Misirli A. 1999. Research on leaf properties and stomata distribution on some *Pistacia* spp, In: Ak B.E. (ed.) 11 GREMPA Seminar on pistachios and almonds = 11ème Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 2001. 416 p. (Cahiers Options

Méditerranéennes ; v. 56). 11. GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds, Sanliurfa (Turkey).

- Panja B., De D K. 2001. Stomatal frequency study of turmeric (*Curcuma longa* L) genotypes from different nodal leaves at three different locations of its surfaces and their relationship with leaf dry biomass and rhizome yield. *Journal of Spices and Aromatic Crops (JOSAC)* 10(2):1
<http://www.spicesociety.org/jrnCont4.html>
- Pachepsky L.B.; R.A. Ferreyra; D.Collino and B. Acock. 1999. Transpiration rates and leaf boundary layer parameters for peanut analyzed with the two- dimensional model 2D leaf. Preprinted version *Biotronics* 28: 1-12.
<http://www.agen.ufl.edu/~ferreyra/webfiles/Pachepsky%20et%20al%201999%20Biotronics%20Preprint.pdf>
- Pachepsky L.B ; M. Lu Zhen and V. Reddy. 2000. Analysis of abaxial and adaxial stomatal regulation in leaves of pima cotton using the 2d leaf, two dimensional model of leaf gas exchange. Preprinted version *Biotronics*.
http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=118827
- Raschke, K.1975. Stomatal action.*Ann. Rev. Plant Physiol.* 26,309-340
- Richardson A.D., G.P. Berlyn, P.M.S. Ashton, R. Thadani and I.R. Cameron. 2000 Plasticity of Hibrid Spruce in relation to crown position and stage age. *Can. J. Bot.* 78: 305 – 317.
- Robinson D.G., U. Ehlers, R. Herken, B. Herrmann, F. Mayer and F.W. Schürmann, 1987. *Methods of Preparation for Electron Microscopy*. Ed. Springer-Verlag. 187 pp.
- Rodríguez .A. F., A. Benavides, J.J. Galván, H. Ramírez. 2002. Cambios en la absorción de minerales y anatomía epidérmica de manzano al aplicar ácidos orgánicos. XIX Congreso Nacional de Fitogenética. Saltillo, Coah. 74 pp.
- Rodríguez G.B., F. Santacruz R., A. Gutiérrez M., M.M. Loera Q., E. Obledo V., J. Cervantes M., M. Ríos B., M. Torres M., J.J. López A., M.J. Sánchez P. 1999. Efecto de inhibidores de las síntesis de poliaminas bacteriales y fungicas para el control de microorganismos patógenos en *Agave tequilana* Weber . Programa General de Apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva Agave-Tequila. Tercer informe de avances. CONACYT, Gobierno del Estado de Jalisco, Consejo Regulador del Tequila.

- Salas J.A., M.E. Sanabria y R. Pire 2001. Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos. *Bioagro* 13(3):99-104.
- Salisbury F.B. y C.W., Ross. 1992. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F. 759 pp.
- Schoettle, A. W. and S. G. Rochelle. 2000. Morphological variation of *Pinus flexilis* (Pinaceae), a bird-dispersed pine, across a range of elevations. *Am. J. Bot.* 87:1797-1806.
- Schwab M., G. Noga and W. Barthlott, 1996. The significance of epicuticular waxes for defence of pathogens as show for *Botrytis cinerea* infections in kohlrabi and pea plants.
http://bssv01.lancs.ac.uk/gk/Ps_text.htm
- Schoch, P., C. Zinsou and M. Sibi. 1980. Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. *Jour. Exp. Bot.* 31 (124): 1211 - 1216.
- Secretaria de Economía. Inteligencia Comercial,
<http://www.economia-snci.gob.mx>
- Semerdjieva S.I., G.K. Phoenix, D. Hares, D. Gwynn-Jones, T.V. Callaghan and E. Sheffield, 2003. Surface morphology, leaf and cuticle thickness of four dwarf shrubs from a sub-Arctic health following long- term exposure to enhanced levels of UV-B, *Physiologia Plantarum* 117 : 289 – 294.
- Sepúlveda S.J. y G. Arredondo de A. 1994. *Técnicas de Microscopía Electrónica e Inmunohistoquímica..* Departamento de Histología, Departamento de Embriología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, 42 pp.
- Sepúlveda S.J. 2001. *Instructivo de laboratorio.* Departamento de Histología, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, 16 pp.
- Selección para realizar una plantación de *Agave tequilana* Weber variedad azul
www.amatitan.com/cultivoagaveintegral/cultivoagaveintegral.htm
- SIACON, 2002
<http://www.siea.sagarpa.gob.mx>
- Silva A. R., A. Silva A. y L. Zambolim 1998. Índice estomático en materiales genéticos de café resistente o susceptibles a la roya. *Bioagro* 10 (2): 57 – 61.

- Solís A. J.F., H. González H., F. J. Flores M., M. Santos C., E. Hernández C., A. R. Valle de la Paz, A.N. Borbolla, S. Osada K. y E. Hernández G. 1999. Determinación de las principales plagas del agave en Jalisco y algunas medidas para su control. Programa General de Apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva Agave-Tequila. Tercer informe de avances. CONACYT, Gobierno del Estado de Jalisco, Consejo Regulador del Tequila. Jalisco, México.
- Solís A. J.F., H. González Hdz., J.L. Leyva V., A. Equihua M., F.J. Flores M. y A. Martínez G. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, plaga del agave tequilero en Jalisco, México. *Agrociencia* 35 :663 – 670.
- Standley P.C. 1920. Trees and shrubs of México. Contributions from the United States National Herbarium. Smithsonian Press. 23 (1): 170 .
- Steel R. and J.H. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. Ed. McGraw-Hill , 622 pp.
- Thomas P. 2000. Plant morphogenic adaptations to variations in light: quantity and quality.
<http://www.shef.ac.uk/aps/apsrtp/thomas/4-0.htm>
- Trewavas A.J. and R. Malhó. 1997. Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. *The Plant Cell*, 9: 1181 – 1195
- United Status Internacional Trade Commission.
<http://dataweb.usitc.gov>
- Verdugo V., A. Rojas, A. De León, B. Zambrano, S. Barrios, E. León, B. Ríos y A. Benavides 1999. Estimación del índice estomático y la frecuencia estomática en cuatro variedades de ajo (*Allium sativa* L).
<http://www.geocities.com/CapCanaveral/Runway/8787/estomajo.htm>
- Volk, G.M., Lynch-Holm, V.J., Kostman, T.A., Goss, L.J., and Franceschi, V.R. 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biology* 4: 34-45
- Wattendorff, J. and P.J. Holloway. 1980. Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles: The cuticular membrane of *Agave americana* L. *in situ*. *Annales of Botany* ,46:13-28.
- Wattendorff, J. and P.J. Holloway 1982. Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles : isolated cuticular membrane preparations of *Agave americana* L. and the effects of various extraction procedures. *Annales of Botany*, 49:769-804.

- Webb, M.A 1999. Cell mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *The Plant Cell.*, 11 : 751 -761.
- Willmer, C. M. 1983. *Stomata*. Longmann Group Limited. 166 pp.
- Yeung C. E. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems some practical comments. *In vitro, Cell, Dev-Plant* 35:137-143.
- Yoldi, M. 2000. *El agave tequilero; pencas que abrazan al mundo*. Claridades Agropecuarias , SAGAR, México. 48pp.

APÉNDICE

A. Relación de Exportaciones de Tequila (por países en miles de dólares)

Pais	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	ene-mar 2002
Total	23	70	1,665	1,614	725	83	144,735	173,203	179,183	240,360	421,910	392,500	96,774
Estados Unidos de América	0	0	133	15	402	22	109,180	129,151	135,023	189,185	348,211	305,249	79,084
Alemania	0	0	0	0	0	0	924	1,852	2,345	2,829	15,005	16,068	3,215
Países Bajos	0	0	0	0	0	0	4,615	4,833	5,569	8,662	9,302	15,671	3,355
España	0	0	0	0	0	0	516	5,938	1,020	1,448	2,924	5,723	763
Francia	0	0	0	0	2	0	2,328	2,257	2,550	2,440	4,489	5,043	1,317
Reino Unido	0	68	0	0	0	0	4,261	5,956	5,850	6,537	6,081	4,745	376
Japón	0	0	0	0	2	0	1,881	2,119	2,234	2,171	3,964	4,198	517
Suiza	0	0	0	0	0	0	1,363	2,284	1,625	1,662	2,530	3,667	912
Canadá	0	0	1,532	1,598	299	49	184	655	1,706	2,007	2,269	3,343	700
Belgica	0	0	0	0	0	0	3,438	935	1,043	1,046	2,731	2,430	218
Australia	0	0	0	0	0	0	533	252	421	546	476	1,895	489
Italia	0	0	0	0	0	0	1,533	895	1,103	1,035	1,663	1,713	653
Panamá	0	0	0	0	0	0	711	731	830	1,464	1,222	1,580	448
Puerto Rico	0	0	0	0	0	0	33	0	165	359	590	1,379	359
Costa Rica	3	0	0	0	20	0	451	420	608	567	1,144	1,291	175
Sudafrica	0	0	0	0	0	0	1,252	657	1,360	777	1,363	1,260	367
Filipinas	0	0	0	0	0	0	941	1,586	857	1,141	1,434	1,225	0
Brasil	0	0	0	0	0	0	1,862	1,581	955	884	989	1,057	248
Venezuela	0	0	0	0	0	2	471	435	687	655	815	994	0
Aruba	0	0	0	0	0	0	353	322	465	439	1,401	954	220

22089001: Tequila.
 Valor en miles de dólares
 El 1 de abril de 2002, entró en vigor la Tarifa del Impuesto General de Importación y Exportación (TIGIE). Anterior a esta fecha, el contenido actual de la fracción 2208.90.03 de exportación correspondía a la fracción 2208.90.01
 Fuente: Secretaría de Economía
 Subsecretaría de Negociaciones Comerciales Internacionales
 Inteligencia Comercial
http://www.economia-snci.gob.mx/sic_php/ls23al.php?s=24&p=1&l=1#

B. Protocolos Experimentales

Se describen los protocolos para la preparación de las muestras foliares de *Agave tequilana* Weber (Agavaceae).

C. Impresiones o Improntas Foliares

La técnica de impresión foliar con silicón o con goma elástica ha sido de gran utilidad a través de los años para medir aperturas estomáticas individuales, se ha encontrado que la exactitud y precisión de tales medidas están limitadas por la resolución del microscopio óptico estándar (0.2 a 0.5 μm), dicha limitación restringe la aplicación de esta técnica a aquellas especies con estomas relativamente grandes (Lawson *et al.*, 1997; Lawson y Weyers, 1997).

Para las impresiones foliares se utilizó la técnica mediante el uso del esmalte transparente de uñas (D'Ambrogio, 1986), cada impronta foliar posteriormente se colocó en un portaobjetos conteniendo glicerina al 50% y se protegió con un cubreobjetos.

D. Microscopía Óptica

Las técnicas histológicas son ampliamente utilizadas en muchas áreas de la investigación, Yeung (1999) señala que los análisis estructurales permiten un gran avance en los estudios de la organización y cambios del cuerpo vegetal y que además son de un gran aprovechamiento en el estudio de la morfogénesis de la planta.

Protocolo :

Obtención de muestras vegetales

I. Fijación

Se colocan las muestras foliares en el fijador biológico alcohol – acetona – formol (AFA).

II. Cambios decrecientes en alcohol

Las muestras foliares se someten a una serie de cambios decrecientes en alcohol:

Alcohol	Tiempo	Frecuencia
90°	30'	dos
80°	30'	dos
70°	30'	dos

Después del último cambio, las muestras foliares se mantienen en alcohol al 70°

III. Deshidratación

Retirar alcohol al 70° de las muestras vegetales
Inmersión en cloro al 40% en agitación suave toda la tarde y noche (tiempo variable). Objetivo: aclaración de tejidos (blanqueamiento)

Retirar cloro / enjuagar con agua destilada 3 veces por 30' también en agitación suave.

Proceder a la deshidratación mediante cambios secuenciales en alcohol.

Alcohol	Tiempo
50%	30'
70%	1 hora
70%	2 horas
80%	2 horas
90%	4 horas
95%	4 horas
100%	3 o 4 horas

IV. Infiltración

Mezclas de alcohol -xilol

Retirar alcohol

Colocar muestras en mezclas de alcohol – xilol

Alcohol - Xilol	Tiempo
3: 1	4 horas
1: 1	4 horas
1: 3	4 horas

V. Preinclusión Parafina

Retirar de las muestras la mezcla de alcohol – xilol

Colocar xilol puro (concentrado) durante 4 horas

Posterior a este paso, se agrega la parafina para que se disuelva a temperatura ambiente (se debe alcanzar el doble del volumen ya con la parafina*).

*Parafina: Paraplast Tissue Embedding Médium, catalog n° 8889 – 501006 (bag 1 kg (2.2 pounds)

Al iniciar el proceso de la inclusión de parafina se debe conservar el xilol y poco a poco ir agregando parafina dentro de los frascos, se colocan en agitación suave, al disolverse la parafina se agrega otro poco y se repite el proceso.

Los frascos con xilol más la parafina se dejan toda la noche y durante el día siguiente. Si después de este tiempo, quedan grageas de parafina sin disolver, se agrega xilol puro, una cantidad el doble del volumen del contenido del frasco y se regresa a agitación, hasta que las grageas se disuelvan.

Tiempo de inclusión: 24 a 36 horas.

Después de 24 horas de preinclusión de parafina en xilol puro en agitación suave se procede a filtrar el xilol. La parafina que no se disolvió se regresa a los frascos.

VI. Inclusión

Agregar parafina a los frascos

Colocar en horno a 60° C por 24 horas, ir agregando parafina poco a poco.

Disolver la parafina (si aún después de este tiempo queda parafina sin disolver) en una parrilla a 60° C (precaución: no pasar de esta temperatura).

Disuelta la parafina regresar al horno.

Colocar en recipientes con una capa inicial y poner a enfriar, utilizar un aparato Tissue Tek II Tissue embedding center, para este procedimiento de inclusión en parafina.

Al enfriar la primera capa se toma la muestra de hoja con una pinza (el frasco con la parafina se debe tener calentando en una parrilla termoagitador a no más de más de 60°C (para mantener fundida la parafina) posteriormente se inserta la muestra foliar en esta primera etapa y se cubre con parafina líquida, se pone a enfriar y luego se pasa al congelador.

Se sacan los bloques del congelador y se colocan en el Tissue embedding Center para que se mantengan congelados.

Se coloca el bloque de parafina en el portamuestras del microtomo.

Con la cuchilla se va emparejando la cara del bloque para sacar tiras de cortes.

Se separan del microtomo, las tiras de cortes con un pincel y una aguja de disección.

Se colocan las tiras de cortes en el baño maría con agua caliente (40° C) para desparafinar, se agrega gelatina (una cuarta parte del portaobjetos es la medida de la gelatina que se debe agregar) cuyo objetivo es para que el corte se adhiera al portaobjetos.

Cuando a la tira de parafina de los cortes se le quitan las arrugas y el corte se encuentra bien extendido se pasa a un portaobjetos por debajo del corte para que se fije al portaobjetos.

Se observan los cortes al microscopio compuesto, se secan en una estufa a 70° por unos minutos para que se desparafine la muestra y se posteriormente se sumergen en xilol por 3 minutos para desparafinar, seguido por inmersión en etanol-xilol para aclaración por 3 minutos.

Para esta investigación, solo se desparafinó y aclaró los cortes , no se procedió a la tinción para su observación en el microscopio Olympus

E. Microscopía Electrónica de Transmisión

Fijación de muestras en glutaraldehido y mantenidas en refrigeración.

Retiro de glutaraldehido

Cambios graduales y secuenciales de acetona

Acetona	Tiempo
30%	30'
50%	30'
70%	30'

Conservación de muestras en acetona al 70 % mientras se procede a los demás pasos del proceso.

Deshidratación, eliminación de acetona al 70% de cada muestra.

Cambios graduales de acetona y en agitación suave

Acetona	Tiempo
90%	30'
100%	30'
100%	30'

Al término del último cambio de acetona, se desecha y se agrega a las muestras una mezcla de acetona – resina.

En histología se emplean colorantes con el objeto de facilitar la visualización de distintas estructuras y para demostrar diferencias físicas y químicas entre los componentes celulares y de tejidos.

Un primer grupo que constituye la mayoría de los colorantes biológicos son compuestos orgánicos derivados del alquitrán de carbón. Un segundo grupo de colorantes se obtienen de otras fuentes naturales tales como la hematoxilina que se extrae de la corteza de un árbol o el Carmín que se obtiene de un grupo de un insecto. Un tercer grupo lo constituyen varios metales como la plata y el tetraóxido de osmio que tienen afinidad por ciertos compuestos de la célula.

El tetraóxido de osmio es útil para demostrar ciertos lípidos, porque los ácidos grasos no saturados lo reducen, dando lugar a la formación de un producto oscuro (negro). El tetraóxido de osmio es útil para demostrar el aparato de Golgi (Sepúlveda S, 2001).

Las muestras vegetales de *Agave tequilana* tanto para microscopía óptica como microscopía electrónica de transmisión se postfijaron en tetraóxido de osmio para contrastar la cutícula en los cortes semifinos.

Previamente se procede a la preparación de la resina de Suprr@.

ERL 4206 vinyl cyclohexene dioxide

DER 736 epoxy resin

NSA nonenyl succinic anhydride

DMAE dimethylamide ethanol (acelerador *)

* el acelerador ayuda a que se mezclen los monómeros y se unan en un polímero.

Al reunir los 4 reactivos (monómeros + acelerador) la mezcla se agita durante una hora, para incorporar las resinas.

Con esta resina pura se prepara una mezcla de Acetona – Resina

Acetona	Resina	Tiempo
3	1	1 hora
2	1	1 hora
1	3	1 hora

Al término de la serie de cambios de acetona- resina, se elimina la mezcla y se agrega resina pura (resina Suprr@.) y se deja toda la noche en agitación suave (2 noches y un día).

Se prepara nueva resina Suprr@, la cantidad necesaria (21 mg) para colocar en los moldes especializados .

Se marcaron etiquetas con lápiz (números muy pequeños), de tal manera que se ajusten las etiquetas al espacio en los moldes para identificar las muestras.

Se colocó resina a la mitad del nivel del molde.

La muestra se cortó en 3 fragmentos de acuerdo al espacio del molde y se posicionó en los moldes de acuerdo al objetivo de cortes paradermales o transversales, junto con la clave en la etiqueta.

Posteriormente se rellena con resina el molde.

Se lleva a estufa a 70° C por 72 horas.

Materiales

Cajas de Petri
 Resina Spurr®
 Palillos de madera
 Pipeta Pasteur
 Probeta
 Pinzas de disección
 Moldes

Trimming (ajuste)

Formación de pirámides

Fabricación de cuchillas

Cortar semifino

Tinción de cortes y localización de áreas de interés en los cortes semifinos

Materiales

Microscopio estereoscópico modelo 569 American Optical
 Lámpara American Optical
 Transformer American Optical
 Base tipo prensa
 Navajas
 Azul de toluidina
 Fucsina básica
 Gasa
 Aparato 7800 Knife Maker LKB BROMMA
 Etanol
 Cinta Plateada Scotch # 850 Silver tape 3/8" (W) x 72 yds (L)
 Película Fotográfica
 Fotomicroscopio 6.4 mm Pelco / Electron Microscopy Sciences
 Ultramicrotome Glass
 Barra de vidrio 6.4 mm Pelco / Electron Microscopy Sciences 6 mm

Interpretación de estructuras

Selección de tejidos más representativos

Nuevo Trimming (nuevo ajuste)

Se realiza los cortes semifinos

Se procede a realizar los Cortes Finos

Se contrasta con acetato de uranilo y citrato de plomo

Observación y fotografía al microscopio electrónico de transmisión.

F. Microscopía Electrónica de Barrido

El microscopio electrónico de barrido proporciona información morfológica muy precisa (Goldstein *et al* 1984). A continuación se presentan detalles del proceso para la observación de las muestras vegetales.

Fragmentos de hoja de *Agave tequilana* se obtuvieron directamente del campo para fijarse inmediatamente en solución de glutaraldehído al 5 %, diluído en amortiguador de fosfatos 0.2M., pH 7.2 por 6 horas a 4 °C.

En laboratorio:

Lavar en amortiguador de fosfatos, tres veces por cinco minutos, cada uno.

Deshidratación en acetona:

1.- 30% 15 minutos

2.- 50% 30 minutos

3.- 70% 30 minutos

4.- 90% 30 minutos

5.- 100% 30 minutos

6.- 100% 30 minutos

Deshidratación final

Secador de punto crítico marca Pelco, modelo CPD 020, Balzers Union. Montaje en base de bronce empleando cinta de cobre de doble lado adhesivo como sustrato. Recubrir con una capa fina de oro de 15 nanómetros con un tiempo de 240 segundos (tiempo que se requiere para cubrir la muestra después de que la máquina alcanzó el vacío mediante el uso de gas argón) en el recubridor (modelo SCD 040, Balzers Union) de capa fina Pelco, modelo. SC-4.

El recubrimiento de capa fina de oro sirve para cubrir el material vegetal porque es muy poroso).

Al finalizar el recubrimiento con la capa de oro se puso en un contenedor dónde las muestras vegetales se encuentran al vacío, estado en que las muestras deben permanecer.

Observar a voltajes menores de 10 Kv en el microscopio LEO 502. Para la fotografía se empleo película de 35 mm, PLUS X PAN de Kodak y se imprimió en papel Kodak bromide F-3 de Kodak.

G. Determinación Química de Cristales

Determinación de la composición química de cristales se realizó a través de una prueba con ácido acético y ácido nítrico (comunicación personal Ph D. Mary Ann Webb)

Materiales:

Ácido Nítrico

Ácido Clorhídrico

Ácido. Acético

Ácido. acético

[] = 98% 0.98

$M = P.M. / \text{Valencia} =$

(gravedad específica para ac. Acético 1.05) ([]) = resultado

El resultado para llevar a 1000 ml

57 ml de Ac. Acético / 1000ml

se hace una regla de tres simple

Ácido nítrico

(tiene una Valencia= el número de hidrógenos hace la valencia)

63.01g/l (1.41 gr / ml a 20°= Densidad)

$D = M/V$

Se despeja volumen

$V = M/D$

$V = 63.01 \text{ gr/l} / 1.41 \text{ g. l}$

$V = 44.68 \text{ ml} = 44.7 \text{ ml de HNO}_3 / \text{aforar a un litro}$

Cuando se trabaja con HNO₃ primero se coloca un poco de agua y luego el ácido y se afora un litro. Cuando se hace este procedimiento se tiene la solución 1M = 1N

47 ml – 1000 ml = 1M

X-----20 ml

$47 \times 20 / 1000 = 0.94$ ml de HNO₃ en 20 ml de agua

Se observan los cristales en el microscopio óptico, preferentemente bajo luz polarizada. El oxalato de calcio no se debe disolver en agua o en ácido acético, aunque algunas veces si se disuelve, quizás se deba a las proteínas presentes en los cristales. Sin embargo, el oxalato de calcio sí se disuelve rápidamente en ácidos más fuertes como el ácido nítrico y el ácido clorhídrico a una concentración de 1 M, si la efervescencia libera burbujas cuando este se disuelve, la naturaleza química no será de oxalato de calcio, pero probablemente de carbonato de calcio.

H. Concentración de Valores de Estructuras Epidérmicas por Condición de Salud, Edad y Superficie Epidérmica Foliar en Plantas de *Agave tequilana*.

	PLANTAS SANAS				PLANTAS ENFERMAS				SE
	ADULTO		JOVEN		ADULTO		JOVEN		
ESTRUCTURAS EPIDÉRMICAS	ab	ad	ab	ad	ab	ad	ab	ad	
Papilas Estomáticas (área, μm^2)	120	78	27	34	83	61	48	38	**
Grosor de cutícula (μm)	9	9	5	4	10	5**	6	5	**
Células Epidérmicas (área, μm^2)	66	38	70	44	56	62	117	39	**
Densidad Células Epidérmicas (células epidérmicas / mm^2)	1345	1656	1417	1341	1424	1245	1461	1669	ns
Cristales (estiloides, área, μm^2)	18	35	30	31	48	33	52	37	*
Complejo Estomático (área, μm^2)	1924	1581	1070	1261	1873	2152	1175	1235	**
Células Anexas (área, μm^2)	48	20	32	38	27	40	56	41	ns
Cámara Supraestomática (área, μm^2)	81	39	13	20	87	42	23	11	**
Tapón de cera (área, μm^2)	36	34	6	8	32	13	9	5	**
Células Oclusivas (área, μm^2)	36	22	25	19	20	23	28	21	*
Cámara Subestomática (área, μm^2)	526	499	151	53	576	551	260	126	**
Distancia Interestomática (μm)	50	50	18	65	27	69	31	30	**
Densidad Estomática (estomas / mm^2)	95	100	80	78	91	99	91	82	**
Índice Estomático (%)	7	6	5	6	6	7	6	5	**
ab= Superficie Abaxial ad= Superficie Adaxial μm = micrómetro μm^2 = micrómetro cuadrado									
SE = significancia estadística ns = no significativo * = significativo al 0.5 ** = altamente significativo al 0.01 cifras en negritas = grupos donde hay diferencia									

I. Clave de Siglas y Abreviaturas

ab – abaxial

ad – adaxial

ca – células acompañantes

cc - cera cuticular

ce - complejo estomático

ci – cristal individual

co - células oclusivas

cr – cristal en roseta

cs - cámara subestomática

cu – cutícula

de – densidad estomática

dies – distancia interestomática

ep – células epidérmicas

ie – índice estomático

ns _ no significativo

ox – cuerpos de oxalato de calcio

pe – papilas estomáticas

se – significancia estadística

su – cámara supraestomática

tc – tapón de cera

μm – micrometros

μm^2 – micrometros cuadrados

ASAb - Adulto sano superficie abaxial

ASAd - Adulto sano superficie adaxial

JSAb - Joven sano superficie abaxial

JSAd - Joven sano superficie adaxial

AEAb - Adulto enfermo superficie abaxial

AEAd - Adulto enfermo superficie adaxial

JEAb - Joven enfermo superficie ataxial

JEAd - Joven enfermo superficie adaxial

J. Glosario

Abaxial. (o ventral) referente a la superficie o lado más alejado del eje principal u orientado hacia la base; el envés.

Adaxial. (o dorsal) referente a la superficie o lado más cercano a eje principal u orientado hacia el ápice; el haz.

Bulbífero.- que tiene o produce bulbos.

Cámara subestomática: Es un espacio intercelular subepidérmico más o menos amplio bajo las células oclusivas del estoma que favorece el almacenamiento e intercambio de gases de las células del parénquima con el exterior.

Cavidad supraestomática: Invaginación de la epidermis inferior de las hojas de algunas plantas xerofitas en la que se acumulan los estomas, junto a algunos tricomas. Tienen la función de hacer más lenta la difusión del vapor de agua desde los estomas hacia la atmósfera.

Células anexas de las células oclusivas: Son células que forman parte del aparato estomático. Su número y orientación respecto de las células oclusivas constituyen criterios de clasificación de los estomas. Colaboran en la apertura y cierre de los estomas exportando o importando iones K^+ a las células oclusivas cuando éstas se cargan de K^+ , su potencial osmótico se hace más negativo, con lo que absorben agua, se hinchan y se abre el ostíolo.

Célula epidérmica: que pertenece a la epidermis.

Células oclusivas: Células estomáticas que definen un orificio llamado ostíolo. Tienen la capacidad de hincharse y deshincharse intercambiando agua con otras células epidérmicas anexas.

Cera epicuticular: Depósitos de cera sobre la cutícula de hojas de plantas adaptadas al medio árido (xerófitas).

Cristal de oxalato de calcio: Acúmulo cristalizado de esta molécula que puede formar drusas, prismas o rafidios (Conjuntos de varillas) en el interior de los idioblastos, células especializadas como acúmulos de residuos metabólicos que aparecen sobre todo en parénquima y floema.

Cutícula: Secreción orgánica de las células epidérmicas vegetales que tiene la función de disminuir las pérdidas no controladas de agua en los tejidos frescos. Esta compuesta a base de sustancias hidrofóbicas como la cutina y las ceras. A veces esta reforzada por el exterior con acumulaciones de cera pura a la que se denomina cera epicuticular.

Ensiforme: en forma de espada, de márgenes paralelos, con el ápice agudo.

Epidermis: Tejido protector de las partes jóvenes de la planta. Sus células suelen ser aplanadas y no dejan espacios intercelulares. La epidermis de las zonas aéreas de la planta segregan una capa orgánica exterior llamada cutícula. En las hojas suele presentarse una epidermis superior frecuentemente cutinizada y con escasos estomas y una epidermis inferior a menudo menos impermeable y con mayor densidad de estomas.

Espacio intercelular: Espacio que queda entre las células de cualquier organismo pluricelular. Puede ser escaso o nulo si las uniones entre las células son estrechas, o amplios si se requiere que circulen los gases con facilidad, como ocurre en el parénquima esponjoso de las hojas.

Estomas: Estructuras epidérmicas encargadas de controlar la transpiración en los tejidos frescos de la planta. Consta de dos células oclusivas que delimitan un orificio llamado ostíolo que se hace mayor cuando las células oclusivas están turgentes. Consta además de unas células anexas que rodean a las anteriores y que participan en la fisiología de la apertura y cierre del ostiolo.

Idioblasto: Célula especializada en el almacenamiento de sustancias de desecho a menudo cristalizadas como las drusas de oxalato de calcio.

Monocárpico: Se refiere a plantas de duración variable, que mueren después de producir frutos.

Ostiolo: Orificio definido por las dos células oclusivas de un estoma.

Oxalato cálcico: Resto metabólico de las células vegetales que frecuentemente cristaliza.

Piña” o “cabeza”: estructura anatómica que sostiene al conjunto de hojas maduras, adquiere esa forma después de la eliminación de las hojas en el género *Agave*.

Protándricas, Flores con desarrollo y madurez de estambres antes que los carpelos.

Xenobiótico: Término empleado para las sustancias hechas por el hombre, que no ocurren naturalmente y que se encuentran en el medio ambiente, por ejemplo; solventes de material sintético, plásticos, etc.

K. Anexo

Artículos publicados de esta investigación:

Hernández-Valencia, R.E.M., López-Franco, R., Ruíz-Ordoñez, J., Ramirez-Rodriguez, H. and Benavides-Mendoza, A. 2003. The stomatal complex and epicuticular characteristics of crown rot disease of *Agave tequilana* Weber (Agavaceae). Acta Hort. (ISHS) 618: 427 – 433.

http://www.actahort.org/books/618/618_51.htm

Hernández Valencia R.E.M., R. López Franco, Benavides Mendoza A. 2003. Micromorfología de la epidermis foliar de *Agave tequilana* (Weber). Micromorphology of the foliar epidermis of *Agave tequilana* Weber. AgroFaz , 3(2) 387 – 396, ISBN: 968 -6404-65-1. Universidad Juárez del Estado de Durango, SEP – CONACYT. Venecia, Dgo., México.