

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y PERMEABILIDAD  
DE LA CUTÍCULA DE *Agave tequilana* WEBER**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
P R E S E N T A  
**BIOL. JUAN FERNANDO ARROYO ESTRADA**

ASESOR:  
DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

CIUDAD UNIVERSITARIA



2004

COORDINACIÓN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

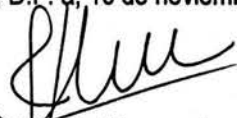
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de abril del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Juan Fernando Arroyo Estrada**, con número de cuenta 81318779 y número de expediente 89972000 con la tesis titulada: "Estudio de la estructura y permeabilidad de la cutícula de Agave tequilana Weber", bajo la dirección del(a) Dr. Antonio Peña Díaz.

Presidente:	Dr. Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros
Vocal:	Dra. Sonia Vázquez Santana
Secretario:	Dr. Omar Homero Pantoja
Suplente:	Dr. Luis Felipe García Jiménez
Suplente:	Dr. Heliodoro Celis Sandoval

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 10 de noviembre del 2004

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizo dentro del proyecto "Estudio de la permeabilidad de la cutícula de *Agave tequilana* Weber", financiado por la Compañía: Industrias Vinícolas Pedro Domecq, S.A. de C.V., mediante convenio con la UNAM, a través del Instituto de Fisiología Celular. Dentro del proyecto recibí un apoyo económico, por lo cual manifiesto mi agradecimiento a la empresa y a la UNAM.

## Resumen

Estudio de la estructura y permeabilidad de la cutícula de *Agave tequilana*  
Weber.

Arroyo Estrada Juan Fernando

En el estudio de la permeabilidad cuticular se han utilizado diferentes sistemas experimentales, para utilizar un sistemas es importante conocer las características de la epidermis. En el presente trabajo se analizó la epidermis de *Agave tequilana* para observarla mediante microscopía de fluorescencia, de barrido, de transmisión y confocal. Se observó que la epidermis presenta un solo estrato de células, con presencia de complejos estomáticos, cutícula gruesa y grandes cantidades de cera. Por medio de microscopía electrónica de transmisión encontramos que la cutícula presenta tres capas, estas capas son de tamaño variable y dependen de la edad de la planta. No existen estudios previos de uso de tensoactivos para aplicaciones foliares de compuesto de interés agronómico en *A. tequilana*, es por ello que se realizó un análisis de tensoactivos en las hojas. Se utilizaron diferentes tensoactivos que se encuentran en el mercado de naturaleza no iónica. El Inex y Full Extensor presentaron una mayor humectación de la hoja y una disminución por debajo de 30 Din/cm<sup>2</sup>. Al realizar las pruebas de permeabilidad de zeatina se encontró que la mayor cantidad de hormona se obtuvo en presencia de Full Extensor. En las pruebas de permeabilidad de diferentes colorantes, los únicos que se detectaron que atravesaron la cutícula son los colorantes fluorescentes. Las hojas del agave incorporan pequeñas cantidades de compuesto via foliar, que pueden ser utilizados en el metabolismo de la planta, surgiendo esto como una alternativa para el mejoramiento de los cultivos.

## INDICE

1.- Agaves y magueyes	2
• Inicios de la industria tequilera	4
• Descripción botánica de <i>Agave tequilana</i>	5
• <i>A. tequilana</i> y el Tequila	6
2.- Epidermis	9
▪ Pared de las células epidérmicas	11
4.- Cutícula	12
• Estructura y función de la cutícula.	13
5.- Estomas	16
• Complejo estomático	17
6.- Permeabilidad	18
• Transporte cuticular	20
7.- Surfactantes y penetración foliar	24
• Procesos en que actúan los adyuvantes	25
• Uso de tensoactivos en la aplicación foliar de compuestos.	27
• Efecto humectante.	27
8.- Objetivos Generales:	
• Objetivos particulares:	30
9.- Materiales y métodos	31
9.- Resultados y discusión	36
• Histoquímica	37
• Cutícula y complejo estomático	41
• Microscopía transmisión y barrido	63
• Tensoactivos y su importancia en la permeabilidad cuticular	70
• Permeabilidad a los colorantes y zeatina	79
10.- Conclusiones	88
11.- Bibliografía	90



## Agaves y magueyes

Los agaves o magueyes, como suele conocerse a estas plantas, pertenecen a la familia de Agavaceae, plantas suculentas típicas de las zonas semiáridas de México, de una gran importancia biológica, ecológica y económica para el país (García, 1998). Se tienen registros del uso de los agaves dentro de las culturas mesoamericanas desde hace 8,000 a 10,000 años a. C. Sin embargo, la domesticación de algunas especies como el maguey del pulque o maguey manso (*Agave salmiana*), parece haberse iniciado hace unos 3,500 años. La palabra maguey parece ser de origen antillano, derivada posiblemente de las palabras meguey, magheih, magney o mangueis, y fue traída por los españoles durante la conquista. Los nahuas conocen a los magueyes con el nombre genérico de metl; los otomíes como uadá o bormi ni, los zapotecas dua o doba, los mixtecas yabi y los purépechas tacamba. En 1753, Linneo asignó el nombre genérico de *Agave* a este tipo de plantas. La palabra proviene de una raíz griega que significa "admirable", y describe no sólo su rara apariencia, sino también su gran longevidad y la floración, que ocurre una sola una vez en la vida de la planta (García, 1998). El género *Agave* está formado por 166 especies, de las cuales México cuenta con 125 en sus ecosistemas (García, 1998). Algunas de las especies del género *Agave* han cobrado importancia económica, cultivadas para la obtención de fibras, alimentos, como plantas ornamentales, para la construcción, así como en la producción de destilados alcohólicos. Las distintas especies de agave, y los productos obtenidos de ellas, han tenido una enorme influencia económica, social y cultural en la historia de México.



A lo largo de la historia de México, el agave, a través de sus especies y ubicación regional, ha sido fuente generadora de bienes económicos, sociales, ecológicos, y principalmente culturales. En el campo de las fibras, destacan el henequén (*A. fourcroydes*), el sisal (*A. sisalana*) y la lechuguilla (*A. lechuguilla*), los cuales han tenido una importancia extraordinaria en el desarrollo de la agricultura. De las bebidas que se obtienen del agave se cuentan el aguamiel, el pulque (que resulta de la fermentación del aguamiel), la bacanora, el Sotol, el mezcal y el tequila; cada uno de un agave o grupos de magueyes específicos (Tabla 1), provenientes de cada región y con procesos de elaboración particulares de cada estado del país.

Un símbolo nacional el tequila por su participación en la vida cotidiana, desde hace cuatro siglos; en un principio, se obtuvo de las variedades de agave conocidas como azul rayado, sigüín, criollo, pata de mula, moraleño, chato, mano larga, bermejo, zahuayo y zopilote. Actualmente, para la elaboración de mezcal la norma (NOM-070-SCFI-1994) sólo permite la utilización las especies: *A. angustifolia* Haw., *A. esperrima jacobi*, *A. weberi cela*, *A. patatorum zucc*, *A. salmiana*, y otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado. Para el caso de la elaboración de tequila, según la norma (NOM 006 SCFI-1994) sólo se permite por norma el uso de *A. tequilana* Weber azul en el proceso de elaboración.





Tabla 1. Principales bebidas fermentadas y no fermentadas obtenidas a partir de magueyes en México (modificada de García Mendoza A. 1998)

Bebida	Estado	Principales especies utilizadas
Agua miel y Pulque	Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Queretaro, Michoacán, Morelos y Oaxaca	<i>A. salmiana</i> , <i>A. mepsiaga</i> , <i>A. americana</i> , <i>A. marmorata</i> , <i>A. hookeri</i> y <i>A. inaequidens</i> .
Tequila	Jalisco, Michoacan, Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas.	<i>A. tequilana</i> Weber
Mezcal	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. americana</i> .
	Guerrero	<i>A. cupreata</i>
	San Luis Potosi	<i>A. salmiana</i>
Mezcal	Sonora (Bocanora)	<i>A. pacifica</i>
Licor Henequen	Mérida	<i>A. fourcroydes</i>

### Inicio de la industria tequilera

Desde los inicios de su cultivo, los productores han preferido llevar a cabo la reproducción del agave a través de la extracción de hijuelos generados por las plantas adultas; sin embargo, recientemente se utilizan métodos modernos de propagación por cultivo de tejidos vegetales (Del Real, 2004 comunicación personal).

La primera plantación registrada fue la establecida por Pedro Sánchez de Tagle, Marqués de Altamira, cerca del año 1600 y no muchos años después, el gobernador de Nueva Galicia, como era conocido el estado de Jalisco, impuso los primeros impuestos sobre el vino mezcal, como era denominado. En 1758, José Cuervo recibió los derechos del rey de España para desarrollar plantaciones de agave y producir destilados en Jalisco; un año después se le concedieron los derechos de la



producción. La Casa Cuervo resultó muy rentable, y para mediados del siglo XIX, sus plantaciones familiares sumaban más de 3 millones de plantas de agave. Cuervo también fue el primero en envasar el tequila en botellas de vidrio. La industria tequilera, principal consumidora del agave azul, desde sus inicios se estableció en las haciendas o propiedades de las personas más poderosas e importantes económicamente de la región. Alrededor de sus residencias, donde también se encontraba su incipiente industria, establecieron las plantaciones de agave. En los albores de las plantaciones de agave y de la industria tequilera, este binomio generó buenos dividendos a los escasos terratenientes de la época. Pero a partir del aumento en el número de industrias se facilitó el intercambio mercantil del agave entre los productores agrícolas y los industriales. La expansión del cultivo fue tan veloz, que para 1880 el agave prácticamente era el único cultivo en la región central del estado de Jalisco (Barreiro, 2000).

### **Descripción botánica de *A. tequilana***

El agave tequilero pertenece a la familia Agavaceae, la cual tiene 273 especies, de las cuales México cuenta con 205 (75%) de las cuales 151 (55%) son endémicas. Esta familia se distribuye en el continente americano, desde Dakota del Norte, EUA, hasta Bolivia y Paraguay. Los estados más ricos en número de especies son Oaxaca, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Jalisco (García, 1995).

*Agave tequilana* Weber es una planta suculenta de dimensiones cercanas a 1.8 metros de altura. Sus necesidades de agua son moderadas una vez establecida en el campo, y requiere de exposición plena al sol. Su reproducción asexual es por rizomas a partir del cuarto año, y en su madurez emite un largo meristemo apical en



forma de espiga, que florea y produce semillas, y luego la planta muere. Las flores son de un color blanco amarillento, en forma de panícula piramidal, y aparecen en la extremidad del quiotte. El fruto es una cápsula triangular con numerosas semillas, (Valenzuela, 1994).

Las hojas son lanceoladas (de base más o menos amplia, atenuada hacia el ápice), acuminadas (ápice de hoja con márgenes rectos que terminan en un ángulo menor a los 45 grados) y de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas, de ascendentes a horizontales. Lo más ancho de las hojas se encuentra hacia la mitad de la misma y son angostas y gruesas hacia la base, generalmente de color verde azulado. El borde de las hojas es recto a ondulado o repando (tipo de margen con entradas escasas, graduales e irregulares); los dientes suelen ser de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja. Los ápices de los dientes son delgados, curvos o de orientación curveada, desde poca altura de la base piramidal. Los dientes son de color café claro a oscuro, de 1 a 2 cm. de separación, y rara vez largos. La espina suele ser corta, de 1 a 2 cm. de largo, pocas veces larga achatada o abiertamente surcada de arriba; su base es ancha, café oscura decurrente o no decurrente (Valenzuela, 1994).

### **A. *tequilana* y el Tequila**

*A. tequilana* Weber var. azul, es la única especie autorizada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SCFI-1994) como material exclusivo para la elaboración del tequila. Para mantener la denominación de origen, *A. tequilana* se cultiva en los estados de Jalisco y parte de los estados de Michoacán, Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas. Según el Consejo Regulador del Tequila (CRT) existen 724 marcas de

tequila de envasado nacional, (6 de octubre 2003) y 258 marcas de tequila envasada en el extranjero (6 de octubre 2003). A pesar del acuerdo entre México y la Unión Europea para la protección de denominaciones, en Europa el tequila no cuenta aún con una protección efectiva, y existen problemas por el uso incorrecto de su Denominación de Origen y la presencia de productos apócrifos. (CRT, 2003).

Para el CRT la problemática del agave se divide en tres vertientes: económica, social y tecnológica. En este último rubro, la falta de planeación, de investigación y de transferencia de tecnología son elementos principales de la crisis por la que atraviesa la industria del agave y por consecuencia la del tequila. En *A. tequilana* y tequila, se han realizado investigaciones referentes a: salud ocupacional (Salinas y cols., 2001); procesos de fermentación (Arrizon and Gschaedler, 2002); conductividad hidráulica de las hojas (Linton and Nobel, 2002); análisis de diversidad genética (Gil y cols., 2001), intercambio de CO<sub>2</sub> (Nobel y cols., 1998 y 2002), optimización y utilización de productos en la industria tequilera (Iñiguez y col., 2001; Vaca and Borredon, 1999; Navarro, 1987; Llanos, 1983; Murgía, 1960; Velásquez, 1955; Yepis, 1990; Curiel, 1994), efecto de reguladores de crecimiento en el enraizamiento (Blanco, 1987; Reynosa, 1987); estudios citogenéticos y fitogeográficos, (Rivera, 1983; Ruvalcaba y Rodríguez, 2002). Se han realizado investigaciones a través del CRT para apoyo a la cadena agave-tequila, con tres líneas de investigación específicas: ecofisiología, genética y fitopatología. En este programa se cuenta con la participación de nueve centros de investigación SEP-CONACYT, además de los principales centros de investigación del país (Barreiro, 2000).



Sin embargo, en los últimos 20 años se han realizado pocas investigaciones en torno al conocimiento de la producción del tequila y de la morfofisiología de *A. tequilana*. El tequila y otros aguardientes dejaron una derrama económica de 547 millones de dólares tan sólo en el 2003 (tabla 2) por concepto de exportaciones (Bancomext, 2003), pese a que sólo se han realizado 279 publicaciones en torno a estos (producción de tequila, aguardientes y conocimientos de los agaves), en comparación con el número de publicaciones realizadas en torno al maíz y la derrama económica que deja sus exportaciones.

Tabla 2. Algunos de los principales productos exportados de México durante el 2003 y el número de publicaciones de *A. tequilana* y Maíz

<sup>A.</sup> Bancomext, <http://www.bancomext.com>, Anexo Noviembre 2003.

<sup>B.</sup> <http://www.newcrops.uq.edu.au>, Biological Abstracts 1988-2000

	Tequila y otros aguardientes	Maíz
Monto (millones de dólares) <sup>A</sup>	<b>547</b>	<b>5</b>
Numero de publicaciones <sup>B</sup>	<b>279</b>	<b>11,548</b>

Por otro lado, la carencia de investigaciones en el ramo agrícola, se refleja en la ausencia en el mercado de productos químicos dirigidos a los cultivos de *A. tequilana* (Vademécum, 2002.); existen sólo unos pocos para el género *Agave*, lo cual refleja la nula investigación en este organismo en compuestos de aplicación foliar. En cuanto a la estructura de la epidermis de la hoja no existen trabajos publicados al respecto, estudios de permeabilidad a moléculas de interés agronómico, ni sobre el uso de los diferentes tensoactivos presentes en el mercado.



## **Epidermis**

La epidermis, en la mayoría de los órganos de la planta abarca una sola capa de células. La profundidad unicelular de la epidermis es mantenida por las divisiones puramente anticlinales dentro de la capa, que conducen la extensión de la hoja de células en solamente dos dimensiones. La función principal de las células en la hoja es protectora, con una cutícula cerosa en las paredes externas de la célula que reducen el riesgo de la deshidratación, de la depredación o de la invasión de los tejidos finos fotosintéticos. Sin embargo, dentro de esta piel protectora existen un número de diversas células especializadas, con funciones en el intercambio de gases, la protección y la atracción (Glover, 2001).

La epidermis de las hojas, es el mayor tejido de las plantas y la zona limítrofe entre el medio externo y el tejido interno de la planta. Aunque en general consta de sólo una capa de células, en algunas plantas se divide periclinalmente y da origen a una epidermis múltiple (Flores-Vindas, 1999). La epidermis tiene como funciones:

- Protección contra agentes químicos, físicos y biológicos.
- Protección de la planta contra la desecación.
- Participación en intercambio de gases y en la secreción de compuestos metabólicos y en la absorción del agua.
- Sirve como barrera para el paso de la luz.

En la epidermis foliar pueden encontrarse células ordinarias, el complejo estomático (células guardianas y células subsidiarias), estructuras epidérmicas (tricomatos, papilas, etc.) y células especializadas (buliformes, células silíceas, y células de corcho). Las células epidérmicas ordinarias no presentan una especialización aparente, suelen carecer de plastos, presentan plasmodesmos, no

dejan espacio entre ellas; formando así una unión fuerte y continua (Flores-Vindas, 1999). Las células epidérmicas que se encuentran en una planta, proporcionan fuerza mecánica mientras que todavía permiten crecimiento y flexibilidad. Proporcionan una barrera que sea casi totalmente impermeable, pero pueden permitir que el agua salga (y el gas que entre) como con eficacia como si no hubiera epidermis (Glover, 2002). La integridad de la epidermis y de la cutícula que la recubre es interrumpida por los estomas. Los estomas resuelven el problema de la impermeabilidad abriéndose y cerrando en forma, controlando el intercambio de gasee en la planta con su hábitat (Azcon y Talon, 2000).

En las hojas, la duración de las células epidérmicas está definida por la vida de la hoja. Las células epidérmicas retienen su habilidad para dividirse; incluso las células guardianas pueden desdiferenciarse y reasumir funciones meristemáticas; esto permite el crecimiento de la planta y la reparación de lesiones (Flores-Vindas, 1999; Tucker 1974).

En las hojas, pétalos, ovarios y rudimentos seminales, las células epidérmicas pueden tener paredes anticlinales onduladas. Las células epidérmicas suelen tener un protoplasto vivo y pueden almacenar diversos productos del metabolismo. Con frecuencia contienen plastidios con pocos grana, o carecen de cloroplastos; sin embargo, las plantas que crecen en la sombra, como aquellas que caracterizan el sotobosque en los trópicos, suelen tener cloroplastos muy activos que captan la limitada luz que llega a ese estrato del bosque. Los plastidios epidérmicos pueden contener cristales proteicos o almidón; las vacuolas pueden almacenar antocianina; sobretodo en piezas florales y frutos (Flores-Vindas, 1999).



### ***Pared de las células epidérmicas***

El grosor de la pared de las células de la epidermis es muy variable. En general, la pared externa es la más gruesa, aunque en las hojas de muchas coníferas, todas las paredes son muy gruesas. Sin embargo, en algunas Bromeliaceae, Strelitziaceae y Flagellariaceae, las paredes internas de las células epidérmicas son más gruesas que las externas (Flores-Vindas, 1999).

La pared tiene una gran resistencia mecánica, y define el tamaño y la forma de la célula al controlar en gran parte el crecimiento celular. Tiene también un papel importante en la defensa de las plantas frente a organismos potencialmente patógenos, actuando como barrera física y como fuente de moléculas con actividad biológica, implicadas en el control de mecanismos de defensa. La capa externa de las células epidérmicas de hojas, tallos y frutos de muchas plantas está cubierta por una envoltura extracelular protectora, la cutícula. La cutícula vegetal es una capa lipídica extracelular que actúa como interfase entre la célula epidérmica vegetal y el medio externo. La cutícula juega un papel clave en procesos tan importantes como la absorción y pérdida del agua del interior celular, la absorción y difusión de compuestos exógenamente aplicados y en la defensa frente al ataque de patógenos (Casado and Heredia, 2001).





## **Cutícula**

Las hojas, tallos y muchas frutas de plantas están cubiertos en el exterior por una capa protectora, la cutícula. La cutícula consiste de una matriz insoluble de polímeros que se impregnan con una mezcla de una gran cantidad de compuestos. Estos compuestos son solubles en solventes orgánicos y se conocen generalmente como ceras. Una de las características importantes de las cutículas es la variabilidad en la composición química, la cantidad y la ultraestructura de sus componentes. Aunque la composición química de la cutícula es muy variada, son dos los componentes más importantes: la cutina y las ceras. El componente básico es la cutina, biopoliéster insoluble en compuestos orgánicos, de elevado grado de entrecruzamiento entre los ácidos grasos hidroxilados de cadena larga que lo componen, mientras las ceras aparecen embebidas en dicho polímero (intracuticulares) o depositadas en el exterior de la cutícula (Casado and Heredia 2001).

Las composición química de la cutícula varía entre las especies, los genotipos, los órganos y las etapas de desarrollo y se modifica según las condiciones ambientales durante el crecimiento. El significado de tales diferencias en la función cuticular se conoce muy poco (Kerstien ,2001)..

Dentro de las funciones de la cutícula esta la protección del organismo de la deshidratación atmosférica, interacción con otros organismo y en algunos casos refracta la luz solar (Kerstien 2001). Desde el punto de vista agrícola, la cutícula de la planta es una barrera para la toma foliar de nutrientes, reguladores de crecimiento, fungicidas, insecticidas y herbicidas, importantes para el manejo de los cultivos.



### Estructura de la cutícula.

La cutícula es la región de la epidermis que se tiñe con colorantes lipofílicos y/o aísla por la disolución de la pectina de las células epidérmicas. La nomenclatura usada para distinguir las partes de la cutícula varía de acuerdo con el autor y el organismo (Kerstiens 1996, Lack and Evans 2001). Sin embargo, actualmente es aceptada que la cutícula está compuesta de tres capas: capa cuticular, la cutícula propiamente dicha y la capa epicuticular (Figura 1).

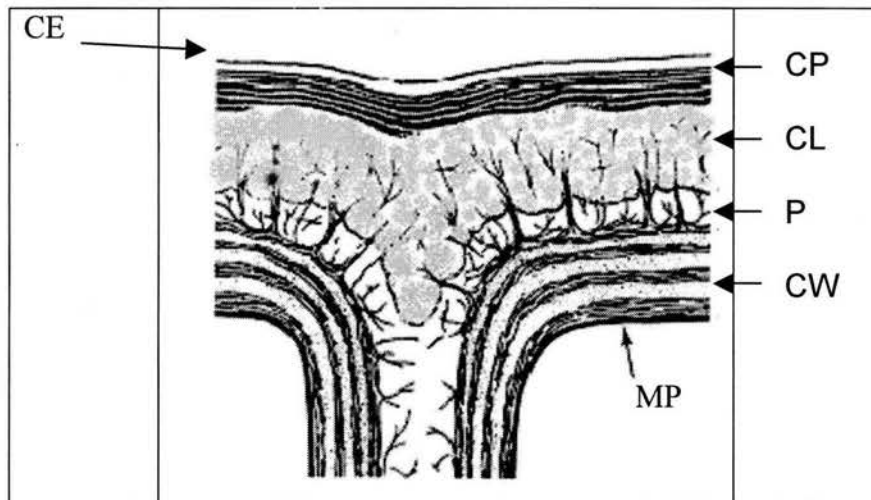


Figura 1. Representación esquemática de las capas de la cutícula y su relación con la pared celular. CP cutícula propiamente dicha, CL capa cuticular, P pectina, CW pared celular, CE capa epicuticular y MP membrana plasmática (Jetter y col. 2000).

La capa epicuticular está compuesta por ceras que no están embebidas en la cutícula y forman la primera interfase entre el medio externo y la planta. Las ceras epicuticulares existen como las películas, capas o estructuras específicas que muestran una gran diversidad ultraestructural (gránulos, plaquetas, rodetes, filamentos o tubos), con un tamaño entre 1 y 20 micras. Las ceras tienen importancia sistemática y ecológica, las condiciones ambientales no tienen virtualmente ninguna

influencia en la micromorfología de las ceras, excepto su cantidad (Barthlot y cols., 1998). La cutícula propiamente dicha está formada por la secreción de cutina a la zona externa de la capa que no presenta residuos de celulosa, a diferencia de la capa cuticular la cual se entremezcla con residuos de celulosa y pectina (Jeffree, 1996). La cutina se encuentra impregnada en las paredes externas y a veces en las anticlinales (cutinización); también forma una capa continua sobre las paredes externas (cuticularización) y en las cavidades subestomáticas (Flores-Vindas, 1999).

El grosor de la cutícula varía entre las diferentes especies, suele ser más gruesa en plantas de hábitat secos, y varía de algunos cientos nanómetros a más de 10 milímetros. Las cutículas más gruesas son comunes en las frutas y hojas de los árboles de hoja perenne. La superficie de la cutícula puede ser lisa, áspera, sinuosa o rugosa, siguiendo la superficie de la epidermis (Fahn, 1990).

### **Función de la Cutícula**

La cutícula y la cera epicuticular forman estructuras variables en los diferentes órganos y tejidos de las plantas; sus funciones más importantes son: reducción de la pérdida de agua y solutos apoplásticos, formación de una barrera mecánica que dificulta la penetración de hifas fungales, protección contra el daño mecánico, reflexión y atenuación de la radiación solar, reservorio de compuestos lipofílicos, e interacción con otros organismos (Kerstiens, 2001; Flores-Vindas 1999). La cutícula es también una barrera en la toma foliar de nutrientes, reguladores de crecimiento, contaminantes del aire, insecticidas y herbicidas, importantes desde el punto de vista agrícola (Schönherr y col., 2000; Kerstiens G, 1996b.)

La cutícula es muy efectiva para limitar la pérdida de agua de las partes aéreas de la planta, pero no bloquea completamente la transpiración de la misma, incluso cuando los estomas se encuentran completamente cerrados; su grosor varía de acuerdo con las condiciones ambientales; las plantas nativas de zonas áridas presentan típicamente una cutícula gruesa, comparada con las que crecen en otros hábitats (Larcher, 1999).

Algunos hongos patógenos penetran a la hoja a través de la cutícula, por la fuerza física, o facilitados por cutinasas. No está claro si el aumento de la densidad de cutina proporcione una mejor protección contra la infección; sin embargo, las primeras etapas en el proceso de la infección pueden variar según las ceras de la cutícula (Kolattukud y col., 1995). Muchas cutículas contienen una diversidad de microorganismos (hongos y bacterias), que puede afectar la capacidad de humectación de la hoja (Schreiber, 1996).

Las ceras de la superficie proporcionan señales múltiples que pueden afectar el comportamiento de herbívoros invertebrados. Los parásitos en las plantas pueden ser más móviles y más efectivos en superficies de la hoja que presentan poca cera epicuticular. La búsqueda de la resistencia a los parásitos y a los patógenos manipulando la biosíntesis de la cera parece prometedora; sin embargo, falta investigación al respecto para conocer todos en detalle el deterioro posible de las ceras epicuticulares (Kerstiens, 2001 Kolattukudy, 1996)

La naturaleza hidrofóbica de la cutícula y las ceras epicuticulares hace que en su mayoría, las superficies de la hoja sean a simple vista impermeables. En vez de formar películas delgadas de agua extendidas en la superficie de la hoja, el agua forma a menudo gotitas que cubren menos área de la hoja. Cuanto mayor es el

ángulo formado por la gota en la hoja, más hidrofóbica es la superficie. La presencia de una capa densa de cristales epicuticulares, de tricomas, de células epidérmicas en forma de papillas, de dobleces cuticulares, puede aumentar fuertemente el ángulo del contacto y por lo tanto la humectación de las hojas.

## **Estomas**

Las plantas en general fijan dióxido de carbono en presencia de luz solar; en estas condiciones, los estomas de las hojas se abren y permiten el intercambio de gases con el medio, incluyendo el vapor de agua. Este intercambio representa una pérdida importante de agua para las plantas. Los agaves evolucionaron en condiciones de poca humedad, modificaron su metabolismo para impedir que el agua almacenada se perdiera fácilmente; los estomas se abren durante la noche para tomar dióxido de carbono y disminuir la salida de agua. Una de las características más importantes de este tipo de metabolismo es que el dióxido de carbono es fijado en la oscuridad en forma de ácidos orgánicos, por lo que la acidez de los tejidos aumenta durante la noche, y por esto se le conoce como metabolismo del ácido crasuláceo o metabolismo MAC (Valenzuela, 1994).

## **El complejo estomático**

Los estomas realizan una función importante en la epidermis; la unidad funcional completa es el complejo estomático. Se compone de dos células guarda, oclusivas o estomáticas. Entre estas células existe un espacio llamado ostiolo o poro estomático (Figura 2). Las células subsidiarias o accesorias, cuando existen, se hallan junto a las células guarda y sirven como su reservorio iónico, aunque el

apoplasto tiene también una gran capacidad de almacenamiento de iones. Las células guarda no tienen plasmodesmos y los intercambios iónicos y la absorción de metabolitos se deben hacer a través de la membrana plasmática.

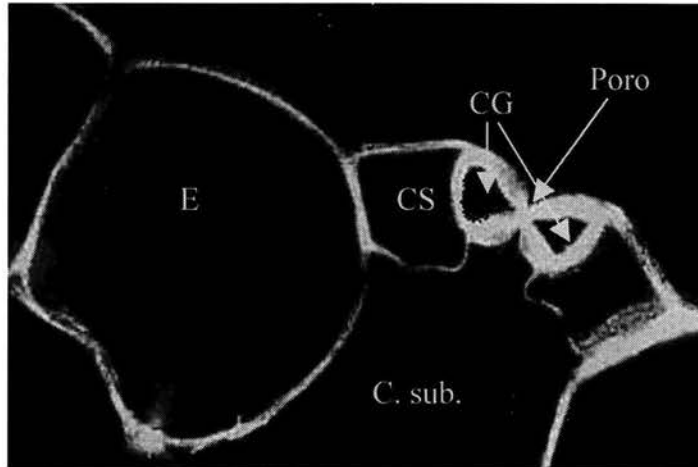


Figura 2. Corte transversal de *Rhoeo discolor*, que muestra los componentes del complejo estomático: CG, células guarda; CS, células subsidiarias; E, células de la epidermis; C. sub., cámara subestomática y P, poro que forman las células guarda. Tomada y modificada de <http://www.biologie.uni-hamburg.de>

El estoma se abre o cierra según las necesidades; así, las células guarda regulan la entrada de  $\text{CO}_2$  y agua a la planta. Los estomas son estructuras antiguas, se encuentran en fósiles cuya edad oscila entre los 400 millones de años (Edwards y cols., 1998). Están presentes en los musgos pero no en las hepáticas; en las plantas superiores se localizan en los pétalos, sépalos, estambres, en las vainas de las leguminosas y en la cáscara de plátano, aunque en sitios como los pétalos no son funcionales. En las herbáceas aparecen a ambos lados de la hoja (anfiestomática), en las plantas flotantes se encuentran en la parte superior (epiestomática); sin embargo, los estomas suelen presentarse en la cara abaxial de la hoja (hipoestomática). Su densidad varía según la especie, la etapa del desarrollo y las condiciones ambientales.

apoplasto tiene también una gran capacidad de almacenamiento de iones. Las células guarda no tienen plasmodesmos y los intercambios iónicos y la absorción de metabolitos se deben hacer a través de la membrana plasmática.

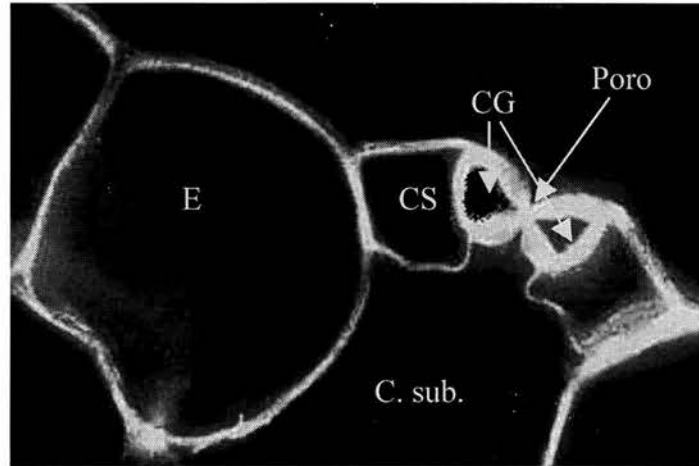


Figura 2. Corte transversal de *Rhoeo discolor*, que muestra los componentes del complejo estomático: CG, células guarda; CS, células subsidiarias; E, células de la epidermis; C. sub., cámara subestomática y P, poro que forman las células guarda. Tomada y modificada de <http://www.biologie.uni-hamburg.de>

El estoma se abre o cierra según las necesidades; así, las células guarda regulan la entrada de  $\text{CO}_2$  y agua a la planta. Los estomas son estructuras antiguas, se encuentran en fósiles cuya edad oscila entre los 400 millones de años (Edwards y cols., 1998). Están presentes en los musgos pero no en las hepáticas; en las plantas superiores se localizan en los pétalos, sépalos, estambres, en las vainas de las leguminosas y en la cáscara de plátano, aunque en sitios como los pétalos no son funcionales. En las herbáceas aparecen a ambos lados de la hoja (anfiestomática), en las plantas flotantes se encuentran en la parte superior (epiestomática); sin embargo, los estomas suelen presentarse en la cara abaxial de la hoja (hipoestomática). Su densidad varía según la especie, la etapa del desarrollo y las condiciones ambientales.

difusión en las plantas al mecanismo mediante el cual una molécula penetra la cutícula (Bukovac y Petracek, 1993). En condiciones de sequía la supervivencia de plantas depende de la pérdida de agua incontrolada de sus partes aéreas. La transpiración residual después del cierre de los estomas es determinada por la permeabilidad del agua en la cutícula. La permeabilidad cuticular para el agua es un parámetro que caracteriza las condiciones básicas de la cutícula. La permeabilidad para el agua varía en las diferentes cutículas aisladas, de especies de la planta de hábitats diversos. La permeabilidad cuticular para el agua varía entre estas especies por más de dos órdenes de la magnitud y tiende a correlacionar con la forma del habitat y de vida (Schreiber, y col 1996). La difusión del agua a través de la cutícula involucra que el agua se intercale en la capa lipofílica de la cutícula, pasando por la pared celular. Esta difusión se realiza en matrices de diferente composición molecular, y al final el compuesto pase al apoplasto de la célula (Kerstiens, 1996b).

Se han realizado estudios de permeabilidad al agua (Schreiber 1996 Kerstiens 1996b; Niederl y col., 1998; Burghardt and Riederer 2003) herbicidas (White y cols., 2002; Kirkwood 1999; Bukovac 1993), compuestos orgánicos (Baur y col. 1999; Schönherr and Baur, 1994), iones (Shu y col, 1994; Schönherr y col., 2000; Bautista y Reinaga 2004), en diferentes especies. En todos ellos se han utilizado principalmente tres sistemas experimentales: hojas intactas, cutículas aisladas o cutículas reconstruidas. Para trabajar con cutículas aisladas, pueden obtenerse por medios mecánicos, químicos o enzimáticos. La utilización de uno u otro método depende de la presencia o ausencia de estomas en ella, la composición de la cutícula y la facilidad para obtenerla. En el transporte cuticular usando hojas intactas,



los resultados obtenidos se acercan mucho a la realidad en la naturaleza; sin embargo, los experimentos son extremadamente laboriosos y es difícil realizar comparaciones entre diferentes especie (Kirsch, 1997).

Dada su importancia, en particular la económica, llama la atención que para *A. tequilana* no haya estudios sobre la estructura de la cutícula ni sobre sus implicaciones tecnológicas (Bautista y Reynaga 2004).

### **Transporte cuticular**

En el estudio de transporte cuticular existen factores que pueden influir en la permeabilidad de un compuesto aplicado por vía foliar, como el estado físico del compuesto y su naturaleza. Hay un modelo que describe los factores y pasos implicados en la penetración cutánea por las sustancias sobre una superficie permeable (Holloway, 1994):

- 1) El compuesto debe de estar en solución
- 2) En el caso de las plantas, debe aplicarse sobre la superficie.
- 3) Debe librar la barrea medioambiental (evaporación, remoción por lavado, fotodescomposición)
- 4) Debe moverse hasta su sitio de acción.

Las reglas empíricas que rigen la penetración son:

- 1) Los solutos no polares son absorbidos mejor que los polares
- 2) Los agentes lipofílicos penetran más fácilmente.
- 3) Los sólidos con bajo punto de fusión se absorben más fácil que los de valor más alto, y los líquidos se absorben más fácilmente.

Estas generalizaciones pueden aplicarse de igual forma a la penetración foliar (Holloway, 1994), y deben tomarse en cuenta como factores que influyen en la permeabilidad.

Para las hojas intactas, el modelo de penetración foliar de compuestos orgánicos diluidos en soluciones acuosas puede describirse en cuatro pasos (Kerstiens, 1996):

- 1) Adsorción a la superficie
- 2) Disolución en las ceras y/o en la cutina que forman una barrera al transporte
- 3) Difusión a través de la barrera de transporte de ceras y de la matriz polimérica adyacente
- 4) Transferencia o desorción del soluto de la membrana cuticular hacia el apoplasto de la pared celular.

Además de estos modelos, se han descrito las rutas de penetración de algunos solutos, Hamilton y cols. (1982) mencionan que las ceras epicuticulares son la principal barrera a la difusión de agua, gases y solutos que atraviesan la cutícula, en la que las zonas cristalinas no son permeables, pero las amorfas que las separan vertical y horizontalmente permiten la difusión de las moléculas. Aunque el paso de sustancias es difícil, estas zonas amorfas se denomina poros acuosos, y se cree que constituyen una de las vías para la difusión de sustancias a través de la cutícula, específica para sustancias polares, como el  $^{36}\text{Cl}^-$  (Schönherr, 2000). La otra vía se consiste en dominios lipofílicos para sustancias hidrofóbicas como los herbicidas (Kerstiens, 1996).

El conocimiento de la permeabilidad cuticular es la base para aplicaciones de interés agronómico, como la fertilización foliar, que consiste en la aplicación de una



solución nutritiva al follaje de las plantas, con el fin de complementar la fertilización realizada al suelo, o bien para corregir deficiencias específicas en el mismo período de desarrollo del cultivo. Esta técnica, ha tomado relevancia por las altas exigencias tecnológicas de los cultivos, lo cual implica un óptimo manejo y control de las variables nutricionales. Las ventajas de la fertilización foliar son las siguientes:

1. Permite una rápida utilización de los nutrientes, corrigiendo deficiencias en corto plazo, lo cual muchas veces no es posible mediante la fertilización al suelo.
2. Permite el aporte de nutrientes cuando existen problemas de fijación en el suelo.
3. Permite la aplicación simultánea de una solución nutritiva junto con pesticidas, economizando labores.
4. Es la mejor manera de aportar micronutrientes a los cultivos. Los macronutrientes, como se requieren en grandes cantidades, presentan la limitación que la dosis de aplicación no pueden ser tan elevadas, por el riesgo de fitotoxicidad, además de requerir un alto número de aplicaciones determinando un costo que lo haría impracticable para la mayoría de los cultivos. En cambio, la aplicación de micronutrientes que se requiere en pequeñas cantidades, se adecua perfectamente junto con la aplicación complementaria de macronutrientes.
5. Ayuda a mantener la actividad fotosintética de las hojas (Acosta 1991).

El aporte de nutrientes a través de las hojas es relativamente bajo, por ello la práctica de la nutrición foliar se usa como complemento y no como sustitutiva de la fertilización vía suelo. Sin embargo, esta práctica es efectiva en los casos siguientes (Bañul y col 2001):

1. Cuando la planta requiere elementos que pueden ser inmovilizados por el suelo.



2. Cuando las deficiencias se detectan en estados avanzados del crecimiento y es esencial una respuesta rápida.

3. Cuando la actividad de la raíz se ve afectada por factores adversos (baja temperatura del suelo, pobre aireación, encharcamiento, nemátodos, etc.), la planta no dispone de suficientes nutrientes en momentos críticos de su ciclo vegetativo.

El uso de fertilizantes, herbicidas e insecticidas aplicados vía foliar en las plantas es efectivo cuando el compuesto logra pasar la barrera cuticular de la planta y penetrar al interior, trasladándose al sitio en donde va a cumplir su función.

Existen formulaciones que tiene diferentes composición química, esta composición depende del compuesto que se interesa aplicar via foliar. Para facilitar el paso de compuesto de interés a través de la cutícula se utiliza diferentes compuestos que ayuden el a vencer la tensión superficial que provoca el agua al estar en contacto con la ceras epicutículas. En las formulaciones de aplicaciones foliares los adyuvantes son componente importante para que el ingrediente activo cumpla con la acción biológica para la cual ha sido desarrollado; actúan propiciando estabilidad en almacén y campo, mejorando la retención y extensión sobre el follaje, y facilitando la penetración foliar. Sin embargo, aún con formulaciones adecuadas, las condiciones de campo en que se aplican son muy variadas, y es difícil que en todas, la respuesta sea adecuada. Por lo anterior, cada vez con más frecuencia, al momento de realizar las aplicaciones de compuestos de interés agronómico, se adicionan diferentes adyuvantes a las mezclas de aspersión (Urzúa, 2002).

Existen numerosas formulaciones de compuestos que utilizan agentes tensoactivos que ayudan al proceso cumpliendo diferentes funciones, mediante la humectación, penetración, activación o emulsificación. Los efectos de los adyuvantes



químicos en las plantas son muy complejos, pues dependen de la composición de la cutícula y del compuesto que se quiera aplicar (Holloway, 1994).

### **Surfactantes y penetración foliar**

La palabra surfactante, proviene de los vocablos ingleses surface, active y agent, que significa, sustancia que actúa sobre las superficies moleculares de diferentes materiales. Se ha castellanizado el vocablo como tensoactivo. Estas sustancias son indispensables en la elaboración de una gran cantidad de productos (medicinales, industriales, cosméticos, alimenticios etc.).

En México, hasta hace poco, a una gran variedad de adyuvantes, se les conocía con el nombre de "adherentes", y en el mejor de los casos surfactantes, por parte de los usuarios en campo, vendedores de agroquímicos y técnicos agrícolas. Ahora se empieza a diferenciar y a reconocer dichos productos según la función o propiedades que ejercen en las mezclas de aspersión: ablandadores de agua, acidificantes, humectantes (extensores), adherentes y penetrantes (Urzúa, 2002). No obstante, en muchos de los casos se desconocen todavía la forma en que actúan, las formulaciones de interés agronómico a las que deben ser adicionados y las condiciones de empleo para cada producto.

La información del contenido y por lo tanto el modo de acción de los adyuvantes de uso comercial es escasa, en su mayoría proviene de lo expuesto en la etiqueta de los productos o en folletos elaborados por las empresas fabricantes. Sin embargo, se siguen vendiendo productos coadyuvantes que señalan en su etiqueta propiedades que en la práctica son difíciles de comprobar, o bien usan

terminología mal traducida o empleada, con lo cual crean confusión, o inclusive fracasos entre los usuarios. Se tienen productos que ofrecen solucionar todas las deficiencias y problemas ante la aplicación de una mezcla de aspersion (Urzua 2002). Las recomendaciones de los fabricantes suelen considerarse universales y semejantes para cualquier tipo de cultivo o planta; el caso es todavía más grave en el caso de plantas tan diferentes en su morfología y hábitat como los agaves. De ahí en particular la necesidad de realizar pruebas con los tensoactivos en las hojas de *A. tequilana* con algunos de los tensoactivos presentes en el mercado.

### **Procesos en que actúan los adyuvantes**

La acción biológica de todos los compuestos de interés agrícola depende de tres eventos principales: primero, que se mantengan en cantidad suficiente y con un buen cubrimiento sobre la superficie; segundo, que penetren al interior de la planta en cantidades suficientes; y tercero, que el principio activo llegue a su sitio de acción. En el caso de las aplicaciones al follaje, con frecuencia el compuesto no se deposita adecuadamente sobre las hojas, ya sea por que las gotas no se mantengan sobre la superficie, o que impacten y luego reboten, o bien que no se extiendan sobre la superficie y que por el contrario, resbalen. En todos los casos, la eficacia de la aplicación se reduce si no se logra depositar una película uniforme de plaguicida sobre la superficie tratada.

En las plantas, la cera cuticular es repelente al agua que se utiliza como vehículo, haciendo que las gotas conserven su forma esférica, evitando su extensión y favoreciendo el escurrimiento. El tipo y cantidad de pelos existentes en la superficie de las hojas dificulta también el mojado. Los surfactantes o tensoactivos con



propiedades humectantes puede hacer que los líquidos asperjados reduzcan su tensión superficial, y con ello las gotas disminuyan su ángulo de contacto y se extiendan formando una película sobre las superficies.

En algunos casos es necesario evitar o disminuir el efecto del lavado por la lluvia de los plaguicidas; para ello es necesario agregar surfactantes con propiedades adherentes a las mezclas de aspersion en el momento que se hacen las aplicaciones ante la posibilidad de precipitación.

Todos los compuestos agroquímicos que actúan dentro de las plantas (herbicidas de contacto y sistémicos, insecticidas traslaminares y sistémicos, funguicidas sistémicos, fertilizantes foliares, etc) deben atravesar la cutícula, la pared celular y la membrana plasmática de las células para llevar a cabo su actividad. Sin embargo, cuando las condiciones del medio no son propicias para el crecimiento de las plantas (baja humedad relativa, estrés hídrico, alta temperatura, etc.) la absorción foliar y penetración de las sustancias puede no ser adecuada, por las capas de cera y los estomas cerrados para proteger a la planta de la deshidratación. Esto ocasiona dificultad para que los principios activos de los agroquímicos penetren, reduciendo su actividad; lo contrario ocurre cuando las plantas están turgentes.

Los surfactantes con acción detergente, capaces de solubilizar la cera de la cutícula propician mayor penetración de los agroquímicos. Para algunos plaguicidas es obligado adicionarles penetrante, de lo contrario su actividad es escasa o nula. No obstante, debe cuidarse que la adición en exceso de los “penetrantes” no ocasione daños a los cultivos, al hacer que aumente la cantidad de agua transpirada, por la



reducción de las cubiertas protectoras de las hojas o por perderse la selectividad al no lograr la planta destoxificar el exceso de plaguicida que penetra a su interior.

### **Uso de tensoactivos en la aplicación de compuestos por vía foliar.**

Los tensoactivos, llamados también surfactantes o agentes de superficie activa, son especies químicas con una parte apolar y otra polar (anfifílicos), con tendencia a localizarse "convenientemente", formando una capa monomolecular adsorbida en la interfase (Young, 1951).

Los tensoactivos resultan activos al colocarse en forma de capa monomolecular adsorbida en la superficie entre las fases hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta ubicación "impide" el tráfico de moléculas que se mantienen en el interior del líquido, en busca de un estado de menor energía, disminuyendo la tensión superficial. Otra propiedad de los tensoactivos consiste en que en solución diluida se comportan como electrolitos normales, pero a una cierta concentración bien definida, ocurren cambios fisicoquímicos, como el de tensión superficial, conductividad, o de presión osmótica (Unda, 2003).

Los surfactantes agrícolas se clasifican de acuerdo con su acción en:

- Humectantes, que aumentan la capacidad de un líquido para humedecer, logrando con ello mayor cubrimiento de la mezcla aplicada.
- Emulsificantes: estabilizan las dispersiones coloidales de mezclas de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles.



- Dispersantes: reducen la adhesión entre las partículas y mantienen la estabilidad de las suspensiones, minimizando la formación de grumos y sedimentos.

### **Efectos de la humectación.**

Cuando una pequeña cantidad de un líquido se coloca sobre una superficie plana, como la superficie de una hoja, la forma de la gota depende de su naturaleza (química y física) y de las interacciones de las dos fases (la del líquido y la de la hoja). Si hay repulsión, el líquido tiende a formar un glóbulo, con un ángulo de contacto elevado entre su superficie y la gota, y el sólido no se humecta. Por el contrario, si la adhesión entre la gota de líquido y el sólido es favorable, el ángulo de contacto disminuye, la gota se extiende, y el sólido es mojado por el líquido (Unda, 2003).

El ángulo de contacto tiende a cero cuando las fuerzas de atracción entre el líquido y el sólido (fuerzas de adhesión) son iguales o mayores que entre las que hay dentro del líquido (fuerzas de cohesión). Para el caso de la penetración foliar este principio es importante porque influye en el contacto entre la solución y la hoja para después penetrar al interior (Unda, 2003).

Mientras que la química de las superficies y su morfología determinan las propiedades del mojado y el grado de retención de la sustancia asperjada, la estructura química de la membrana cuticular influye en la penetración transcuticular. Algunos surfactantes específicos también pueden aumentar la penetración, no sólo por un aumento de la interacción del penetrante con la cutícula, sino también por la plastificación de las ceras y el polímero de cutina (Bukovac y Petracek, 1993).



Hasta la fecha, no existen investigaciones sobre la permeabilidad de la cutícula de la especie de *A. tequilana*, sino sólo un reporte acerca de sus características estructurales (Hernández y cols., 2002), que son factores clave en dicha permeabilidad.



## OBJETIVOS GENERALES:

- Identificar las diferentes estructuras en la cutícula de *Agave tequilana* Weber por microscopía de luz y electrónica.
- Definir las propiedades de permeabilidad de la cutícula de *A. tequilana* Weber

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar las estructuras de la cutícula de *A. tequilana* mediante cortes de la hoja en microscopía de luz con la ayuda de diferentes colorantes.
- Conocer las estructuras presentes en la superficie de la cutícula de *A. tequilana* Weber por microscopía electrónica de barrido.
- Conocer la ultraestructura de la cutícula de *A. tequilana* Weber por microscopía de transmisión.
- Analizar la distribución de los estomas presentes en las hojas a diferentes edades y localización.
- Definir propiedades físicas más útiles de diferentes tensoactivos en las hojas de *A. tequilana*.
- Definir las propiedades de permeabilidad de la cutícula a moléculas hidrofóbicas con carga:  
Cianinas, azul de bromo fenol, rojo neutro, azul de metileno, azul brillante de cresol, cristal violeta, verde de malaquita, rodamina y safranina.
- Definir la eficiencia de los tensoactivos para la aplicación de zeatina en las hojas de *A. tequilana*.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plantas

Las plantas de *A. tequilana* se obtuvieron de las plantaciones de la compañía Sauza, se utilizaron tres grupos de edades, plantas de 1, 2 y 4 años (Figura 3), por ser estos grupos de edad, en donde ocurren los mayores crecimientos del agave (Valenzuela 1994). Las plantas de un año se colocaron en un invernadero con regimenes de temperatura de 12° a 25°C (valores mínimos y máximos), con regimenes de insolación promedio diario anual de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las hojas de las plantas de 2 y 4 años se obtuvieron de las plantaciones de Sauza, en tequila Jalisco.



Figura 3. Fotografías de las plantas usadas en el estudio, edades 1, 2 y 4 años, de izquierda a derecha, proporcionadas en el proyecto Allind Domecq. El rollo blanco en todas las imágenes corresponde a 28 cm.

## Microscopía Óptica.

Con la finalidad de conocer las estructuras presentes en la epidermis desprendida de las hojas de *A. tequilana* se realizaron tinciones con 4-aminoacridina. Las observaciones se utilizaron, o bien la epidermis desprendida de la hoja (Figura 4), tanto por su cara externa, como por la interna, o bien cortes transversales de las hojas, de un grosor de 100  $\mu\text{m}$ , mediante un micrótopo de mano.

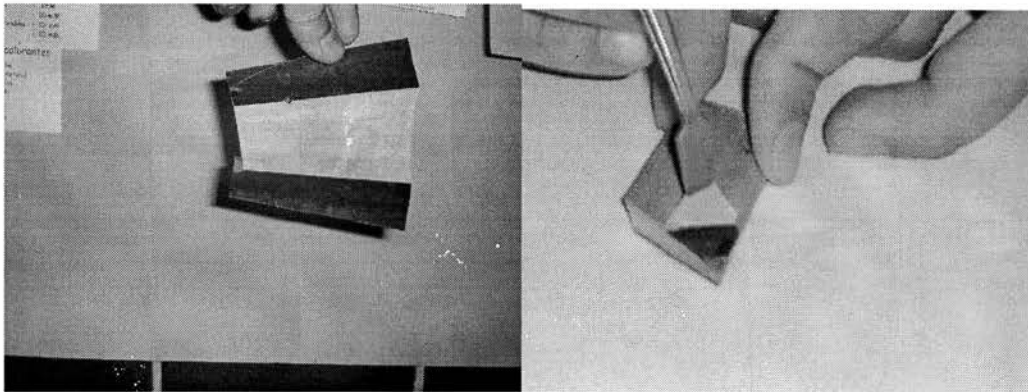


Figura 4. Obtención mecánica de las cutículas aisladas de hojas de *A. tequilana*.

Los cortes se tiñeron con 4-aminoacridina por 2 a 5 minutos, se enjuagaron con solución de Murashige y Skoog (mezcla de sales del medio M.S., de Sigma).

Para conocer la Histoquímica de la cutícula se realizaron diferentes tipos de tinciones con azul de toluidina, naranja de acridina, sudán IV, azul negro de naftol, lugol y rojo de aceite O, calcofluor, para evidenciar distintos tipos de materiales y estructuras en cortes transversales de hojas de *A. tequilana*. En todos los casos se utilizaron cortes transversales de las hojas, de un grosor de 100  $\mu\text{m}$ , obtenidos mediante un microtomo de mano y se tiñeron por 10 minutos.

Las pruebas fueron las siguientes:

- Azul negro de naftol. Tiñe de azul intenso las proteínas y de magenta los polisacáridos insolubles (Lopez Curto y col., 1998).
- Rojo "O" oleoso. Tiñe de rojo las lípidos insolubles (Pearse, 1960).
- Sudan IV. Tiñe de rojo la suberina y lípidos (Pearse, 1960).
- Calcoflúor. Fluoresce de azul intenso en las paredes de celulosa.
- Naraja de acridina. Tiñe de amarillo intenso la cutícula y los núcleos.
- Azul de toluidina. Tiñe de azul las paredes de pectina en las células vegetales (Pearse, 1960).

Para las tinciones con azul de toluidina, se tomaron fragmentos de hojas de 2 mm<sup>2</sup> y se fijaron con glutaraldehído al 3%, en un amortiguador de fosfatos (100 mM) a pH 7.2. Los fragmentos se post-fijaron con tetróxido de osmio y se deshidrataron con alcohol de concentración creciente para incluirlos en resina eponn. Se obtuvieron cortes semifinos de la muestras y se tiñeron con azul de toluidina para observarlos en microscopía de campo claro (microscopio Dialux 20 Leitz), esta metodología sirvió para analizar y seleccionar el área de interés para microscopía electrónica de transmisión.

En el caso de realizar observaciones con colorantes que requerían verse en fluorescencia, se utilizó un microscopio Nikon EFD-3. Las imágenes se capturaron en formato bmp con el programa VidCap. Los fragmentos de la cutícula aislada se tomaron a un centímetro del borde de la hoja y se tiñeron con 4-aminoacridina con el mismo procedimiento.



### ***Microscopía electrónica de barrido***

Para la microscopía de barrido, los fragmentos de las hojas se fijaron con glutaraldehído al 3% en un amortiguador de fosfatos (100 mM) a pH 7.2. Se deshidrataron en alcoholes graduales y se secaron a punto crítico con el equipo Tousimis Sampri-700. Posteriormente, las muestras se montaron y se cubrieron con oro en la Ionizadora JEOL JFC 1100. Las observaciones se realizaron en un microscopio JEOL JSM 5410-LV de bajo vacío. Para las observaciones de las ceras epicuticulares se observaron en bajo vacío, sin fijar ni deshidratar las muestras.

### ***Microscopía confocal***

Los fragmentos de epidermis aislada, se tiñeron con una solución 2.5 mM de 4-aminoacridina por 2 a 5 min; se enjuagaron con solución de Murashige y Skoog (mezcla de sales del medio M.S., de Sigma). Una vez montada la preparación en el portaobjetos se sellaron los bordes del cubreobjetos con barniz de uñas, y las muestras se observaron en un microscopio Microscopio confocal Carl ZeissLSM 510, con un láser de Kr-Ar con líneas en 488, 543 y 633 nm. Se tomaron 38 registros de 0.6  $\mu\text{m}$  cada uno y se integraron en una imagen (Fernández y cols., 1999).

### ***Microscopía electrónica de transmisión***

Las muestras se fijaron *in situ* en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.2, se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% (2 Horas) y se incluyeron en resina Epon. Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un microscopio JEOL 1200 CXII



y se tomaron microfotografías en placas de 8.3 x 10.2cm. (Kodak Electrón microscope Film 4489) se pasaron a papel KodaBrome IIRC F3.

### ***Pruebas con tensoactivos***

*Tensión Superficial.* Se prepararon soluciones de los agentes tensoactivos comerciales en agua a diferentes concentraciones y se midió su tensión superficial mediante el método del desprendimiento del anillo con una balanza de Du Noüy. El método del anillo consiste en medir la fuerza que se requiere para desprender un anillo horizontal de alambre de platino (de radio R) de la superficie de un líquido. En la teoría elemental la fuerza P ha de ser dos veces el producto de la longitud del anillo por la tensión superficial, esto es  $P = 4\pi R\gamma$ . Para mayor precisión, la fuerza de retención se debe multiplicar por un factor de corrección F que varía desde 0.75 a 1.1 y depende de las dimensiones del anillo. En este caso el factor de corrección F fue de 0.98, por lo que los valores obtenidos de  $\gamma$  para cada solución se multiplicaron por este factor de corrección.

*Área de humectación.* La medida del área de expansión de cada solución con tensoactivo, se obtuvo al colocar una gota de dicha solución sobre la superficie de una hoja de *A. tequilana* de la parte del cogollo, tomando fotografías con una cámara digital, que se midió el área en  $\text{mm}^2$ , mediante el programa ImageQuant,.

*pH.* Para medir el pH de las soluciones con el tensoactivo, se utilizó un potenciómetro marca HANNA.





### **Pruebas de permeabilidad de la cutícula**

Se diseñó un dispositivo para contener la solución marcada que se ponía en contacto con la hoja, utilizando un tubo Eppendorf de 1.5 ml cortado por la mitad y adherido a los fragmentos de hoja con un polímero de silicón de nombre comercial Oranwash<sup>®</sup> (Figura 5). Los tubos Eppendorf de plástico cortados, se pegaron a fragmentos circulares de la hoja (1.5 cm diámetro), cortados con un taladracorchos. Se encontró que el polímetro empleado para pegar los fragmentos circulares de Hoja (FCH) no difunde sobre la cutícula, y tiene una buena adhesión para las medidas de larga duración (Bautista y Reynaga, 2004).

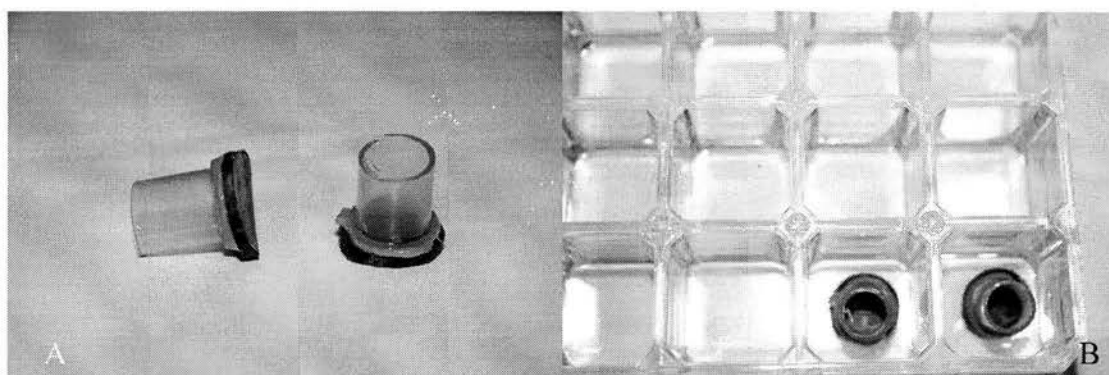


Figura 5. Dispositivo para realizar los estudios de permeabilidad en fragmentos circulares de hojas de *A. tequilana* (A). La verificación de fugas previa y durante cada experimento se realizó en cámaras aisladas de cada dispositivo (B).

Una vez acoplado el tubo se verificó la ausencia de fugas del tubo con el FCH, para lo cual se le agregaron 200  $\mu$ l de agua destilada por una hora. Una vez verificada la ausencia de fugas se retiró el agua destilada y se colocaron 200  $\mu$ l de la solución de estudio. Luego de análisis preliminares para definir las velocidades

aproximadas del paso de las sustancias estudiadas, se diseñaron los experimentos, utilizando intervalos de tiempos de 1 a 24 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución de estudio y se despegó el FCH del tubo y del silicón. Se secó con papel absorbente la superficie del FCH, se enjuago con agua destilada. Para el caso de la permeabilidad de los colorantes transcurrido el tiempo de exposición se congelaba el FCH y se trituraba con nitrógeno líquido, el polvo de cada tres fragmentos se resuspendió en 10 ml de un amortiguador de MES pH 7.0. Se centrifugo por 10 minutos a 3500 rpm, se tomo tres muestras de 1 ml y para las lecturas de concentración en el fluorómetro. Se realizaron curvas de concentración para determinar los máximos de excitación para cada compuesto, y con la graficas se obtuvieron los valores de concentración de la solución problema. En todos los casos se realizaron tres experimentos con 5 replicas cada uno y los datos muestran el promedio y su desviación estándar.

Para el caso de la zeatina se utilizo a una concentración de  $2.5 \times 10^{-4}$  M, marcada con  $^{14}\text{C}$  (Sigma numero catalogo Z-1626). Transcurrido el tiempo de exposición se retiro el FCH del tubo se secó con papel absorbente la superficie del FCH que estuvo en contacto con la solución, se enjuagaron los discos con agua destilada y los discos (cortados en cuatro secciones) se colocaron en frascos que contenían 10 ml de líquido de centelleo. Se dejo en reposo durante 24 horas y se tomaba una alícuota de 1 ml del medio de centelleo que tenia el FCH y se le agregó a otros 9 ml del líquido centelleo y se contó en contador de centelleo. Los cálculos de la concentración del compuesto se realizaron según la metodología de Bautista y Reynaga (2004).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se realizaron los estudios para definir los componentes estructurales de la cutícula. Se realizaron cortes transversales de la hoja de tres grupos de edades: hojas de plantas de 1, 2 y de 4 años. En los tres grupos se observó que la epidermis presenta un estrato de células (Figura 6-B, D y F) sin cloroplastos, y cubiertas por una cutícula muy gruesa característica de las xerófitas. La epidermis presenta dos tipos de células: las ordinarias, y conjuntos que forman el complejo estomático (Figura 6-E). Las primeras son células epidérmicas ordinarias de forma poligonal, cubiertas por una pared celular y sin espacios intercelulares, fuertemente unidas entre ellas. Son de diferentes tamaños y siempre sobre ellas se presenta una gruesa capa de cutícula incolora. Esta cutícula presenta una autofluorescencia muy intensa que se pudo observar mediante un filtro B-3A (Excitación 420-490 nm, emisión 505 nm). El grosor de la cutícula varía con la edad de la planta (de 3.57 a 17.42  $\mu\text{m}$  para las plantas de 1 y 4 años, respectivamente) y cuando es muy gruesa, forma papilas dérmicas, sólo visibles al quitar el exceso de cera sobre la superficie de las hojas (Figura 6-C y D). Algunos autores mencionan que las papilas dérmicas en las plantas xerófitas y plantas que crecen a pleno sol las papilas pueden participar en la reflexión de la luz y en la regulación de la temperatura (Flores-Vindas 1999), sin embargo otros autores mencionan que estas son solo engrosamientos de la cutícula.

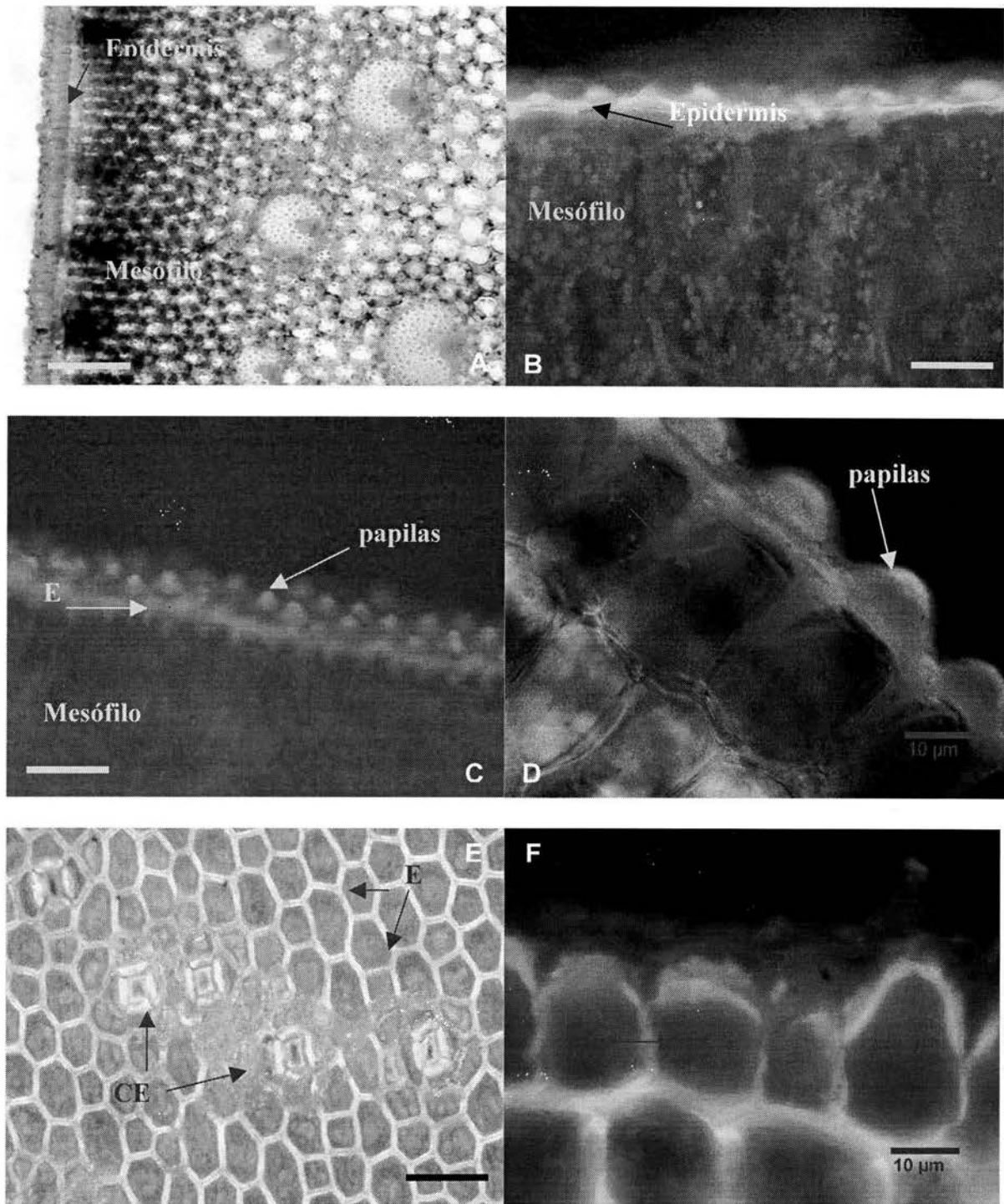


Figura 6. Microfotografías de la hoja de *A. tequilana*, de 1 año. A, corte transversal campo claro; B, corte transversal de epidermis auto-fluorescencia; C, papilas dérmicas, corte tangencial; D, corte transversal en fluorescencia; E, epidermis aislada, vista paradormal teñidos con naranja de acridina; F, corte transversal de la hoja teñidas con calcoflúor. En todos los casos E para células ordinarias de la epidermis, CE para complejo estomático y la barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

## **Histoquímica**

Se tomaron fragmentos de la epidermis de la hoja por ambos lados en los tres grupos de edades de las plantas y se realizaron cortes transversales frescos de un grosor de 100  $\mu\text{m}$  con un microtomo de mano, para realizar pruebas histoquímicas y explorar la naturaleza química de la cutícula. La cutícula mostró reacción negativa al azul negro de naftol, lo que demuestra que no presenta estructuras proteicas.

El calcoflúor tiñó de manera intensa las paredes de la epidermis, incluyendo las paredes del mesófilo. En la fotografías de la figura 7-D, no se observan cambios importantes del grosor de la pared de las células epidérmicas en contacto con la cutícula y las células del mesófilo, lo cual muestra que no existen cambios importantes de celulosa en las paredes de las células epidérmicas que están en contacto con la cutícula y las células del mesófilo.

En la tinción con naranja de acridina y azul de toluidina, se observó una tinción policromática en la cutícula (7 A y F). Con el naranja de acridina, la coloración más intensa se observó en la parte basal de la cutícula, en la región que corresponde a la cutícula propiamente dicha. Con azul de toluidina la cutícula se tiñó ligeramente de azul, más intensamente en la región en contacto con la pectina de las células de la epidermis. En la constitución de las paredes celulares interviene fundamentalmente la celulosa producida por la célula, pero las paredes adyacentes se encuentran cementadas con pectina, lo cual explica esta gradación policromática .

La cutícula mostró reacción positiva al Rojo O, Sudan IV, que se tiñeron de rojo intenso (Figura 7 C y E). La cutícula cubre la epidermis, incluso dentro de las cámaras supraestomáticas (Figura 7C).

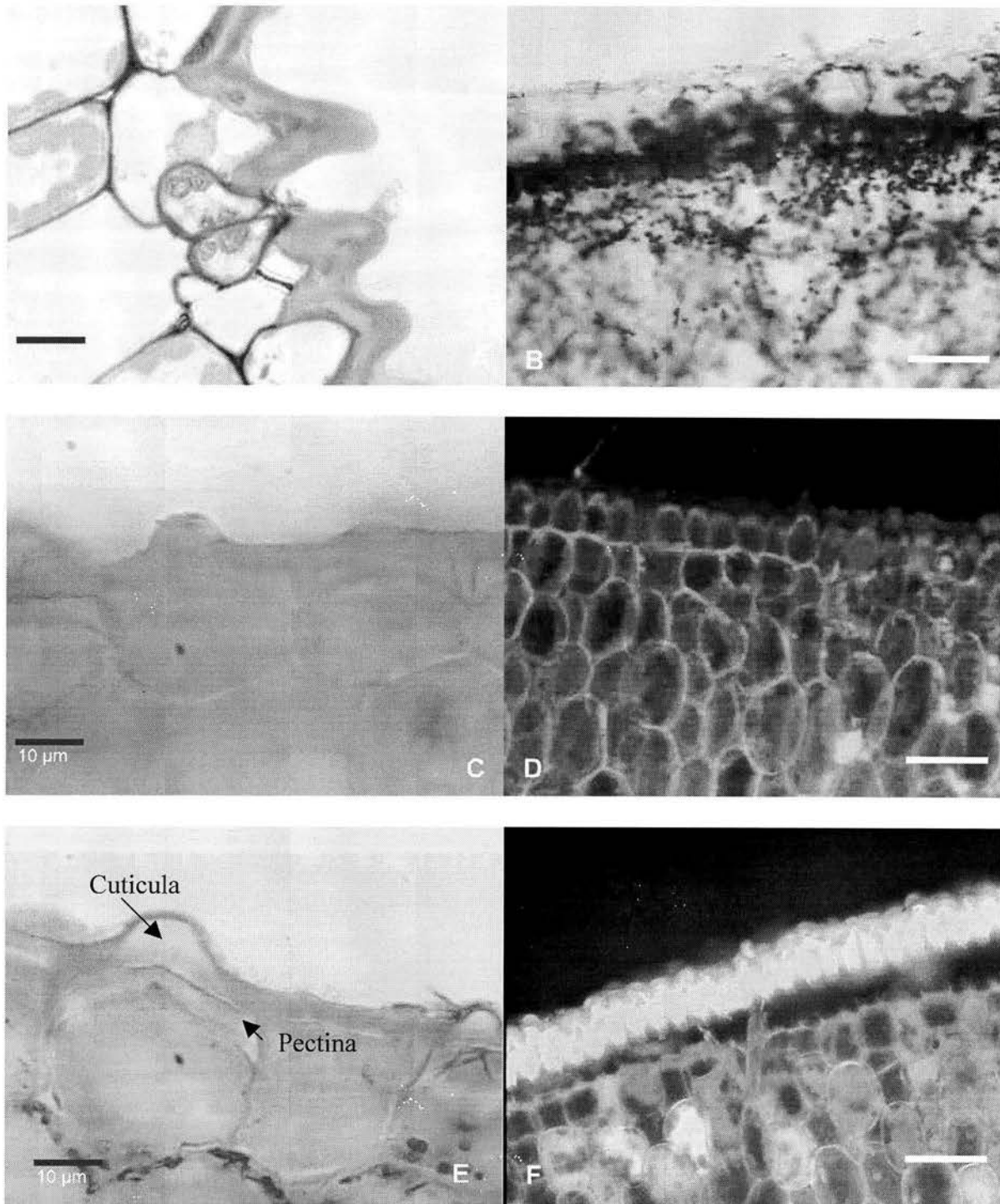


Figura 7. Pruebas histoquímicas de la cutícula de *A. tequilana*. A, azul de toluidina; B, azul negro de naftol; C, rojo oleoso "O"; D, calcoflúor; E, Sudán IV.; F, Naranja de acridina. En todos los casos son cortes transversales. En todos los casos E para células ordinarias de la epidermis, CE para complejo estomático y la barra corresponde a 50 µm.

Esta tinción muestra que la cutícula esta compuesta principalmente de cutina (poliester de ácidos grasos), la cual da una reacción positiva muy intensa en esta zona (Kolattukudy 1996), en comparación con a la zona inferior a esta que se tiñe muy tenue la cual se entremezcla la cutina con residuos de pectina y celulosa (Jeffree, 1996).

Esta cutícula se observa que rodea incluso la cavidad de la cámara supraestomatica (Figura 8 y Figura 12-D ) e incluso se observa presente en una capa muy delgada de cutícula en la cámara subestomática (Figura 8 figura 12-B). Esta cutícula externa que cubre las hojas de las plantas ha sido extensamente estudiada en diferentes organismo (Kerstiens, 1996 ), sin embargo se ha dado poca atención a la presencia de cutícula en la cámara supraestomatica y subestomática, aunque existen reportes de la presencia de esta en dicha cámara (Norris 1968 tomado de Pasacreta, 1999). La presencia de una cutícula interna en estas zonas nos habla de la presencia de una barrera para evitar la evaporación de agua, función similar a la cutícula externa que cubre la superficie de las células epidémicas ordinarias, sin embargo es necesario profundizar en este parte para conocer el grosor de esta en los diferentes grupos de edades y posiciones de la planta y el posible papel en el flujo de agua de la planta.

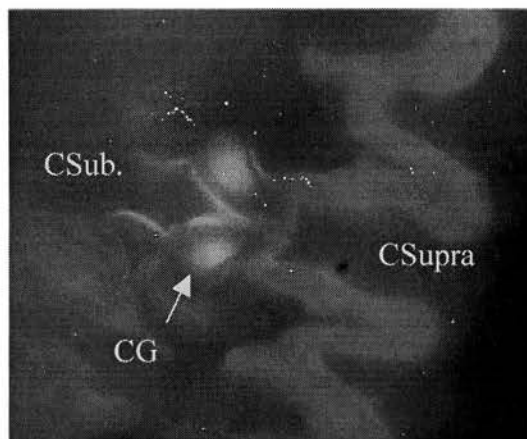


Figura 8. Tinción con Sudán IV de corte transversal de hojas de *A. tequilana*. Se muestra que la cutícula cubre la cámara supraestomatica e incluso muestra una delgada capa de fluorescencia en la cámara subestomatica. La fotografía fue tomada en fluorescencia. CG, células guarda; CSupra, cámara supraestomatica; CSub. Cámara subestomatica. La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .



### **Cutícula y Complejo estomático**

Se tomaron fragmentos de la epidermis, que se desprendió mecánicamente de las hojas con facilidad (figura 4, material y métodos) y se analizaron con el fin de utilizarlos como membrana de diálisis para los experimentos de permeabilidad y la descripción del complejo estomático, así como conocer las estructuras presentes en la epidermis. Se obtuvieron fragmentos de 1-2 cm<sup>2</sup> de tres grupos de edades: plantas de 1, 2 años y 4 años; por ambos lados de la hoja (Adaxial y Abaxial), en diferentes partes (basal, media y parte apical de las hojas).

En los tres grupos se observaron dos estructuras celulares en la superficie de la epidermis. La estructura de la superficie corresponde a células epidérmicas ordinarias y una estructura en que destacan cuatro células alargadas, formando un poro rectangular que corresponde al complejo estomático (Figura 9-A). Las células ordinarias presentan diferentes tamaños de forma poligonal, con un eje mayor orientado paralelo al borde de la hoja, y no isodiamétrico como se ha mencionado por otros autores (Hernández y cols., 2002). Al comparar la forma y tamaño de las células ordinarias en los diferentes grupos de edad se observa que las células ordinarias de plantas de un año son más grandes que las de las plantas de 4 años, es necesario sin embargo realizar mediciones para establecer la diferencia entre estas y conocer así mas la forma de expansión de la hoja. Sin embargo se puede mencionar que las hojas de las plantas de un año tienen una mayor velocidad de crecimiento al observar un mayor volumen celular que las plantas de 4 años.

El segundo grupo de células que forman el complejo estomático mostró una fluorescencia intensa, en forma de rectángulo, que no permitió definir con claridad su estructura cerca y dentro del poro. Esta fluorescencia fue de mayor intensidad que

las de la células ordinarias, incluso al observar las epidermis en la parte interna de estas (9-B y F). En el complejo estomático en plantas de 2 y 4 años se observa alrededor de este una fluorescencia difusa que no permitía definir con claridad la morfología de este complejo y el número de células que forman (figura 9-A y E). Solo en plantas de un año se observa que la fluorescencia muy intensa esta dada por 4 células que forman un poro (figura 9-C). Para eliminar el ruido alrededor de el complejo estomático se limpio previamente la epidermis de las hojas con un elastómero de silicón con la finalidad de eliminar las ceras presentes (datos no mostrados) y se pudo observar que en todos los grupos de edades tienen la misma conformación de cuatro células, con una fluorescencia muy intensa y paralelos al borde de las hojas, característico del grupo (Gentry y Sauck, 1978). Esto es de gran importancia para compara la relación entre el complejo estomático con los diferentes grupos de agaves estudiados por Gentry, sin embargo el complejo estomático se describirá mas adelante con otras técnicas la morfología.

Otro elemento importante que se resulta del análisis de estas imágenes, es que al desprender la epidermis de las hojas, sólo en las plantas de un año se obtienen la epidermis completa, como puede observarse en la Fig. 9 D, en la que aprecia los núcleos de las células epidérmicas ordinarias. En los otros grupos de edades la epidermis se desprendió por la mitad, liberándose el contenido celular, y no se detectaron los núcleos en las epidermis aisladas (Fig. A, B, E y F). Esto es vital importancia como se vera mas adelante ya que se intentaba obtener esta epidermis intacta con la finalidad de utilizarla como una membrana de diálisis en los experimentos de permeabilidad.

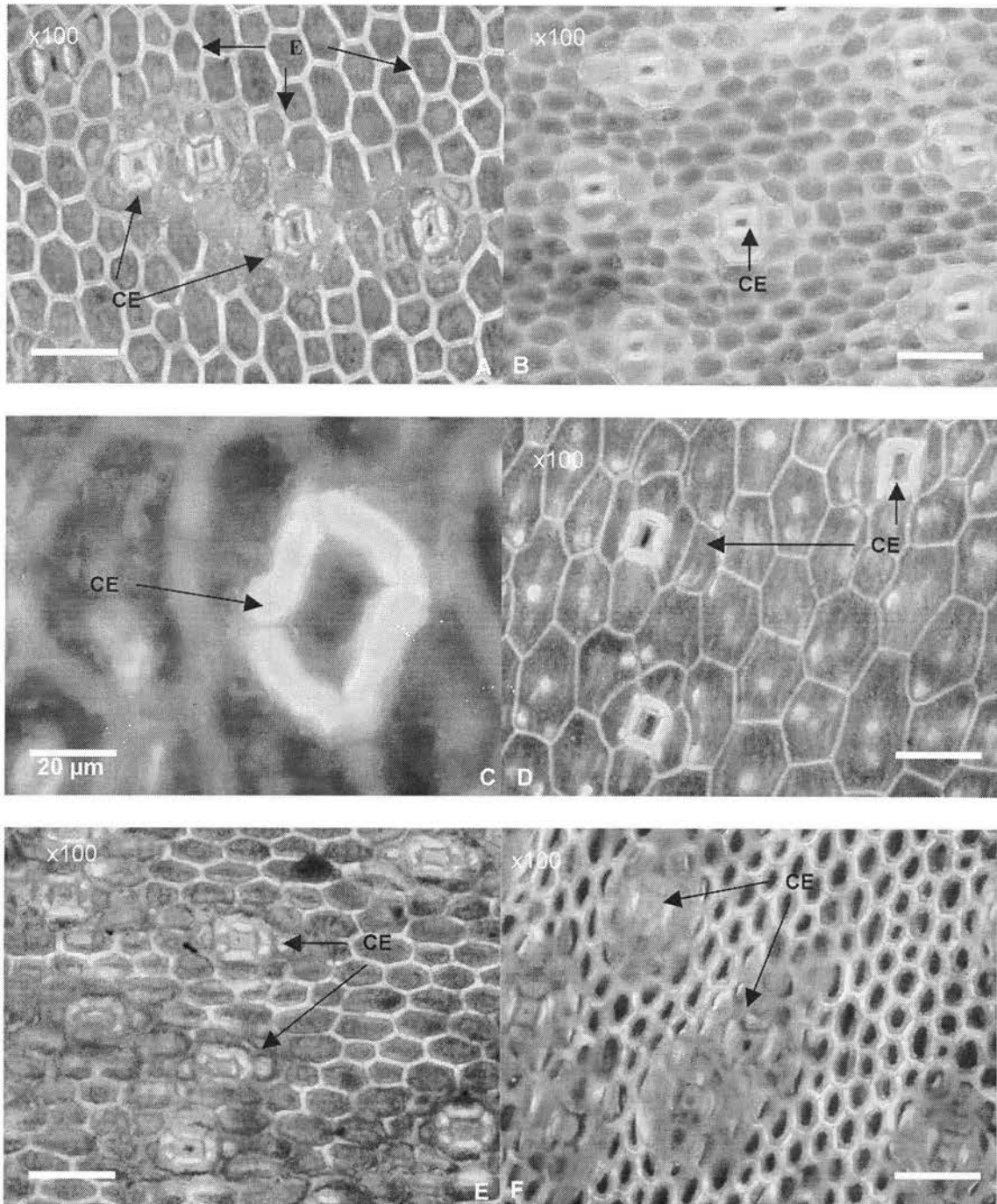


Figura 9. Microfotografías de fluorescencia de un fragmento de cutícula aislada de hojas de *A. tequilana*, y teñida con naranja de acridina. A, vista paradermal (VP) de la cara exterior, de hojas de plantas de 2 años; B, VP de la cara interior, de hojas de plantas de 2 años; C, Detalle del complejo estomático, de plantas de 2 años; D, vista paradermal de la cara exterior, de hojas de plantas de 1 años; E, vista paradermal de la cara exterior, de hojas de plantas de 2 años, naranja de acridina; F, vista paradermal de la cara exterior, de hojas de plantas de 4 años. En todos los casos es la epidermis desprendida, E para células ordinarias de la epidermis, CE para complejo estomático y la barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

Para completar el análisis de las imágenes de fluorescencia, se utilizó la microscopia electrónica de barrido. Mediante este procedimiento se observó que la superficie de la hoja está cubierta por una gran cantidad de cera, depositada en la mayoría de los casos en capas gruesas de forma y tamaño irregular (figura 10-A y B). La cera se encontró incluso en el interior del complejo estomático cristales (figura 10-C y D). Para observar la estructura del poro visto desde la parte frontal de la cutícula hubo que eliminar la cera con un elastómero de silicón, Oranwash, de la marca Zhermarch, que no altera las células de la epidermis pero elimina las ceras de la superficie. En la Figura 10-F, se observa la estructura de las cuatro células abultadas que forman el poro de la cámara supraestomática; dos células laterales y dos polares forman los lados de un rectángulo. Las células polares presentan una protuberancia con forma mamiforme en la base de estas (Fig.10-E, marcada con  $\alpha$ ), que en todos los complejo esta paralelo al eje de la hoja. Existen dos trabajos previos (Hernández-Valencia 2002 y 2003) en donde estudian la micromorfología de las células de la epidermis en *A. tequilana*, sin embargo en ninguno de estos trabajos limpiaron la superficie de las hojas de cera, lo que dificulta conocer con detalle la morfología del complejo estomático. En promedio las células laterales y polares del complejo estomático miden  $41.6 \pm 3.8 \mu\text{m}$  de largo  $29.1 \pm 2.5 \mu\text{m}$  ancho, para plantas de un año. Estos datos concuerdan con los reportados por Hernández-Valencia en el 2003, sin embargó, estos datos son obtenidos de 30 mediciones del complejo. Es conocido en otros organismo que existen diferencia de tamaño y densidad del complejo estomático, en función de cambios ambientales y de posición de desarrollo dentro de la planta (Santamaría y col., 1993; Lake y col., 2001; Chen y col., 2001), es

necesario realizar un análisis mas detallado de la dimensiones del complejo en los diferentes grupos de edades y partes de la planta.

Al observar microscopia de barrido la cara interna de la epidermis desprendida, se distinguen alrededor del poro restos de lo que parecen ser las células guarda del complejo estomático (Fig. 11-A, B y C). Estos restos presentan diferentes tamaños y formas, y las diferencias dependen del grado de daño de la epidermis al ser desprendida. Con estas imágenes sobre el daño de los estomas se descartó la posibilidad de utilizar la epidermis desprendida mecánicamente de las hojas de *A. tequilana* como una membrana de diálisis, ya que presenta agujeros de diferente tamaño, y pierde la integridad del complejo estomático, probablemente la principal vía de paso de las sustancias cuya permeabilidad se pretendía estudiar.

Se intentó obtener una epidermis aislada mediante digestión enzimática; se utilizó una mezcla de enzimas para degradar las paredes celulares. Los fragmentos obtenidos de epidermis se analizaron por microscopía electrónica de barrido, y la Fig. 11-D muestra que se daña el complejo estomático obteniéndose en el fragmento de epidermis sólo el espacio del complejo estomático. Se intentó obtener cutículas aisladas mediante una degradación con NaOH. Los fragmentos obtenidos de cutícula se analizaron por microscopia electrónica de barrido y la Fig, 11-F se observa que se daña el complejo estomático, obteniendo en el fragmento de cutícula el espacio del complejo estomático y restos de tejido paraenquimatoso, lo cual muestra que no se obtuvieron fragmentos enteros de epidermis. Con estos procedimientos se descartó también la utilización de la cutícula aislada por medios enzimáticos y degradación con sosa. Sin embargo nos permitió conocer la estrecha relación que guarda la cutícula y el complejo estomático en las hojas de *A. tequilana*.

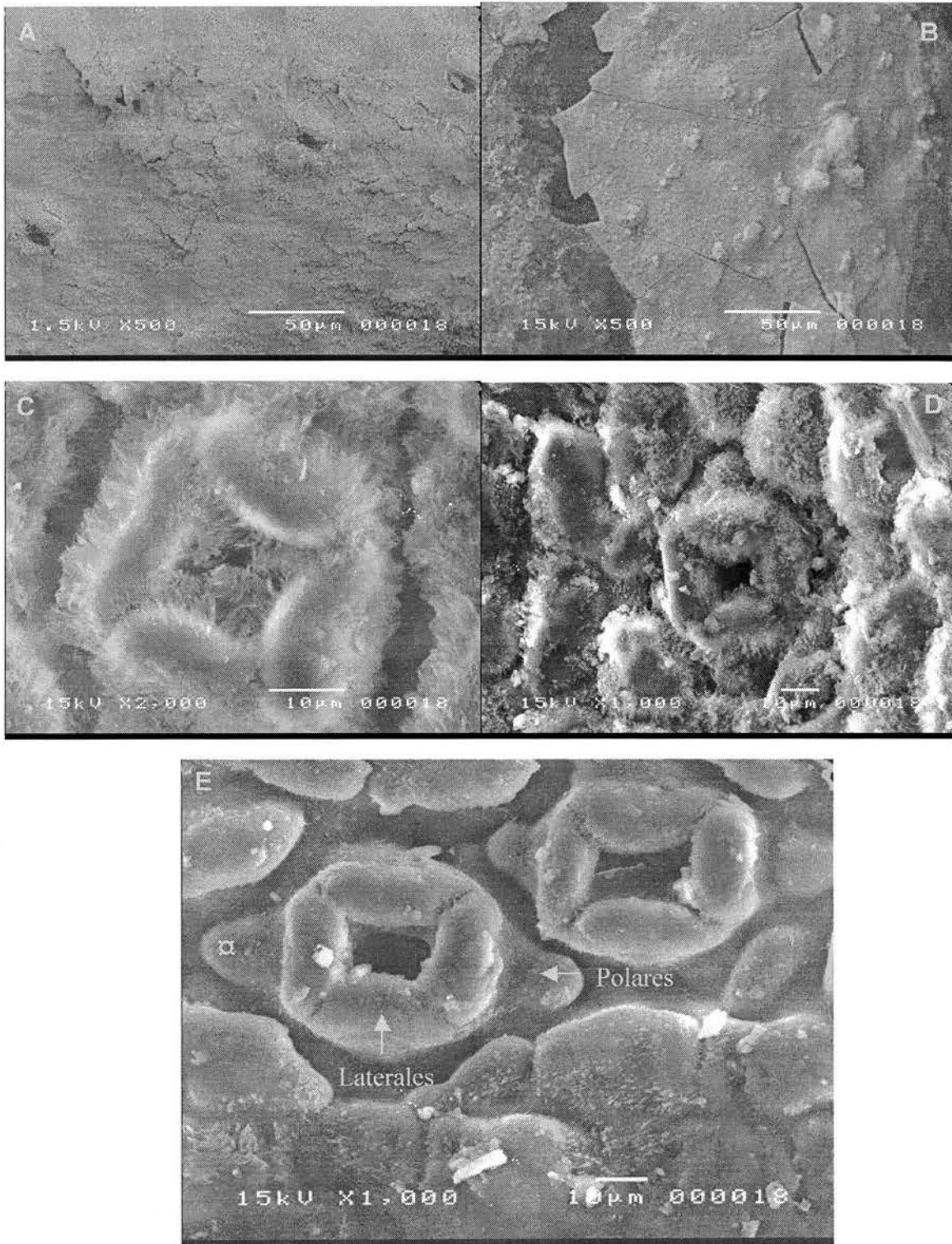


Figura 10. Microfotografías electrónicas de barrido de la epidermis obtenida de hojas de *A. tequilana*. A, y B, epidermis de hojas de la periferia de plantas de 4 años de edad. C y D, epidermis de hojas de plantas de 1 año de edad. E, complejo estomático sin las ceras epicuticulares.

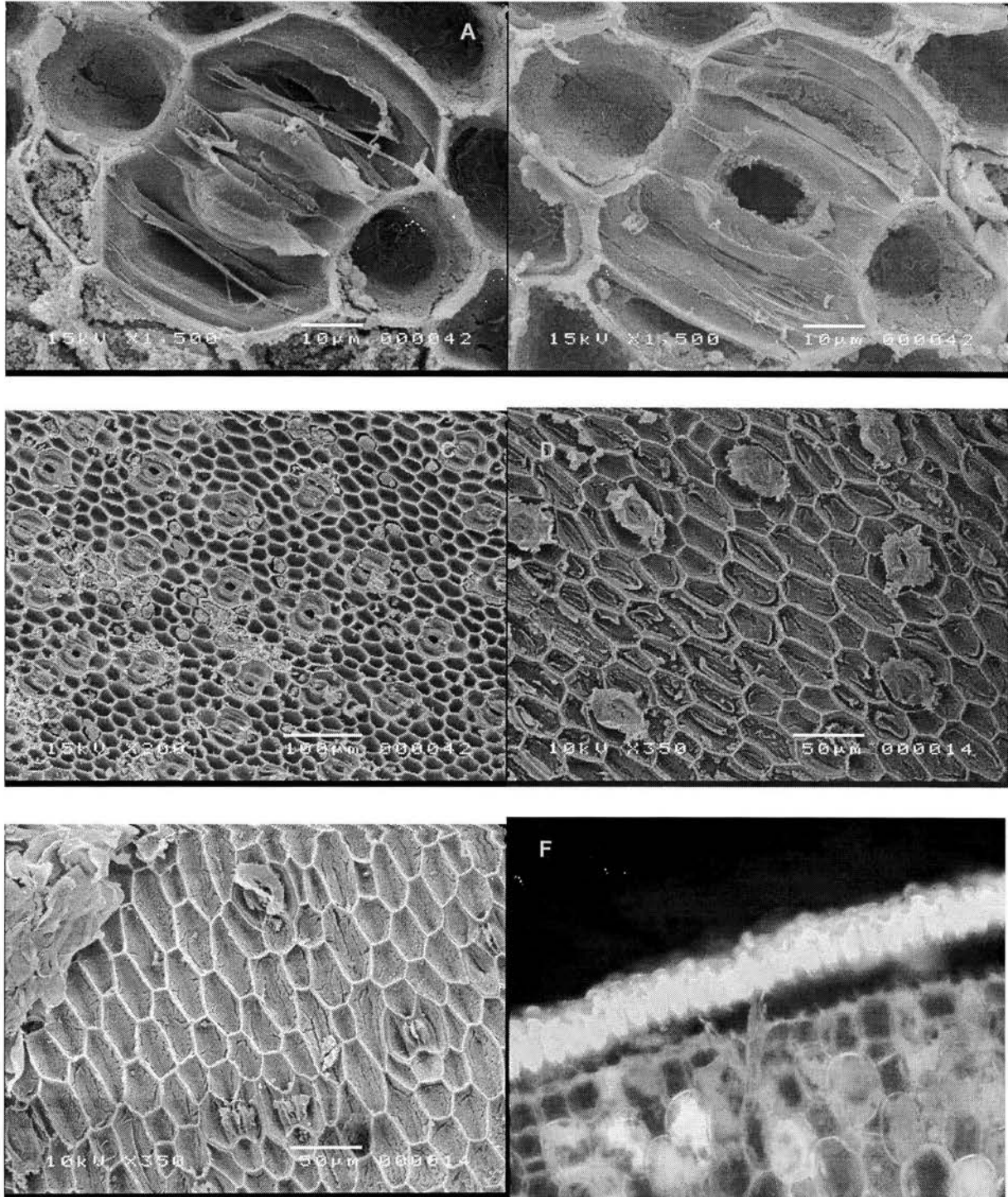


Figura 11. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de la epidermis obtenida de hojas de *A. Tequilana*. A, B y C, parte interna de la epidermis de hojas de la periferia obtenidas por desprendimiento mecánico. D y E, epidermis obtenidas por enzimas de hojas de plantas de 1 año de edad, parte intermedia. F, Corte transversal de la hoja en donde se muestra el desprendimiento de la epidermis.

De los cortes realizados para la caracterización de la cutícula (tinciones con azul de toluidina, naranja de acridina y sudán IV) se analizó la sección del complejo estomático para conocer la estructura del complejo y la relación de las células accesorias y las células guarda. En los cortes transversales de la hoja (Fig. 12-A) se muestran dos estructuras completas del complejo estomático. Presentan una cámara subestomática y cámara supraestomática, formada por la confluencia de las 4 células accesorias vistas en imágenes de microscopía de barrido (Fig. 12-F). Las células que rodean a la cámara supraestomática son de forma peculiar, con una base ancha y una parte superior curvada hacia el centro del poro. Estas células accesorias están en contacto por su parte inferior con las células guarda (Figura 12-C). Al observar el complejo estomático en las tinciones con naranja de acridina, sudan IV y azul de toluidina se observa que las células guardas se encuentran rodeadas por las células acompañantes (Fig. 12A-D). En las micrografías se observa que estas células subsidiarias continúan hasta la superficie de la cutícula, formando el poro que se observaba por microscopía óptica de la superficie de la epidermis (Fig.12-B, C). Es importante hacer notar que es la cámara supraestomática es la estructura que se había observado en la epidermis desprendida (Fig. 9).

Al analizar las hojas de *A. tequilana* se encontró que los estomas se encuentran en ambas superficies de la hoja (Adaxial y abaxial), como el género *Agave* (Gentry y Sauck, 1978), condición que se conoce con el término de anfiestomática de acuerdo a Fahn (1990) y Willmer (1996), sin embargo la abundancia de estos varía de acuerdo a la posición de la hoja dentro de la planta y la edad, como se verá más adelante en este trabajo.



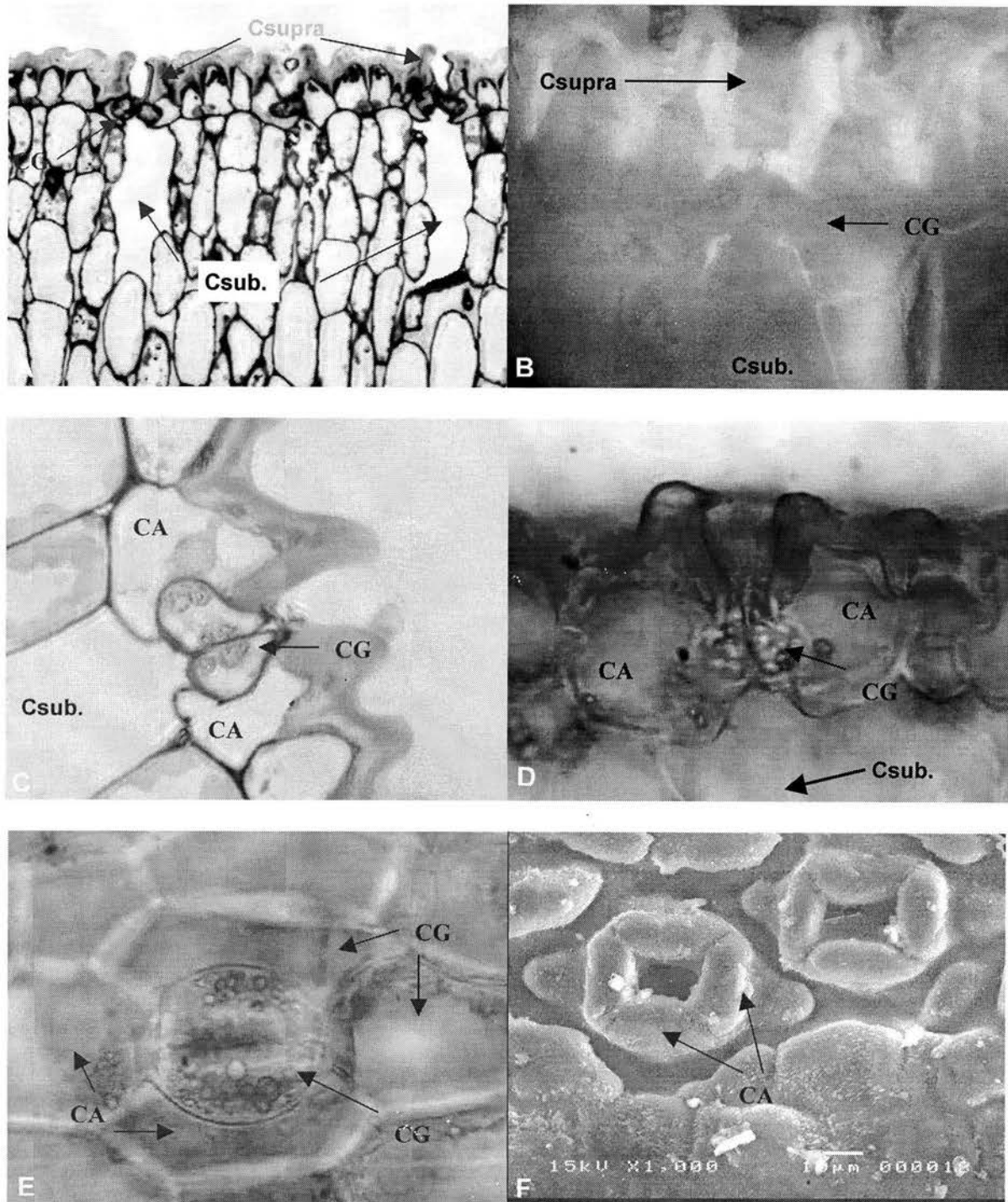


Figura 12. Complejo estomáticos de *A. tequilana*. A, azul de toluodina; B, azul negro de naftol; C, rojo oleoso "O"; D, calcoflúor; E, Sudán IV; F, Naranja de acridina. Cortes transversales, A, B, C y D. Corte paradormal vista interna E.

Para el género *Agave*, Gentry y Sauck (1978) clasifican y describen morfológicamente como tipo tetracístico al complejo estomático, por la presencia constante de un grupo de cuatro células epidérmicas subsidiarias asociadas a las células oclusivas del estoma y mencionan que esta característica se presenta en especies del género *Agave*. Gentry menciona que este complejo está formado por cuatro células epidérmicas (2 células polares y 2 células laterales) asociadas a las células oclusivas, las cuales están orientadas paralelamente a eje de la hoja, característico de monocotiledóneas. Sin embargo en el trabajo realizado por Gentry existen variaciones importantes en la morfología de la células accesoria, en algunos caso forman proyecciones de estas que cubren la cámara supraestomática y con cera en su interior. Una limitante del trabajo realizado por Gentry es que solo utiliza observaciones realizadas por microscopia óptica, lo cual limita la descripción morfológica. Por otra parte en su estudio no se incluyo la especie estudiada en este trabajo.

Otro elemento importante en la morfología del complejo estomático en las plantas es el ostiolo, que esta definido como la apertura de dos células guarda (Willmer, 1996). Al observar por la parte interna de la cámara supraestomática en imágenes de microscopia de barrido se pudo observar el tamaño de la apertura del ostiolo, este varia de 1  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ , al analizar solo 30 células en plantas de un año (Fig 13). Esto es de gran importancia ya que se han realizado estudio de la fisiología en agaves (Miester and Bolhar, 2001), en la cual se han medido la apertura del complejo estomático mediante la impresiones con barniz, o la observación directa en microscopio invertidos (Santamaría y col., 1995), sin conocer la apertura real de las células guarda, limitándose a conocer la apertura de la cámara supraestomática.

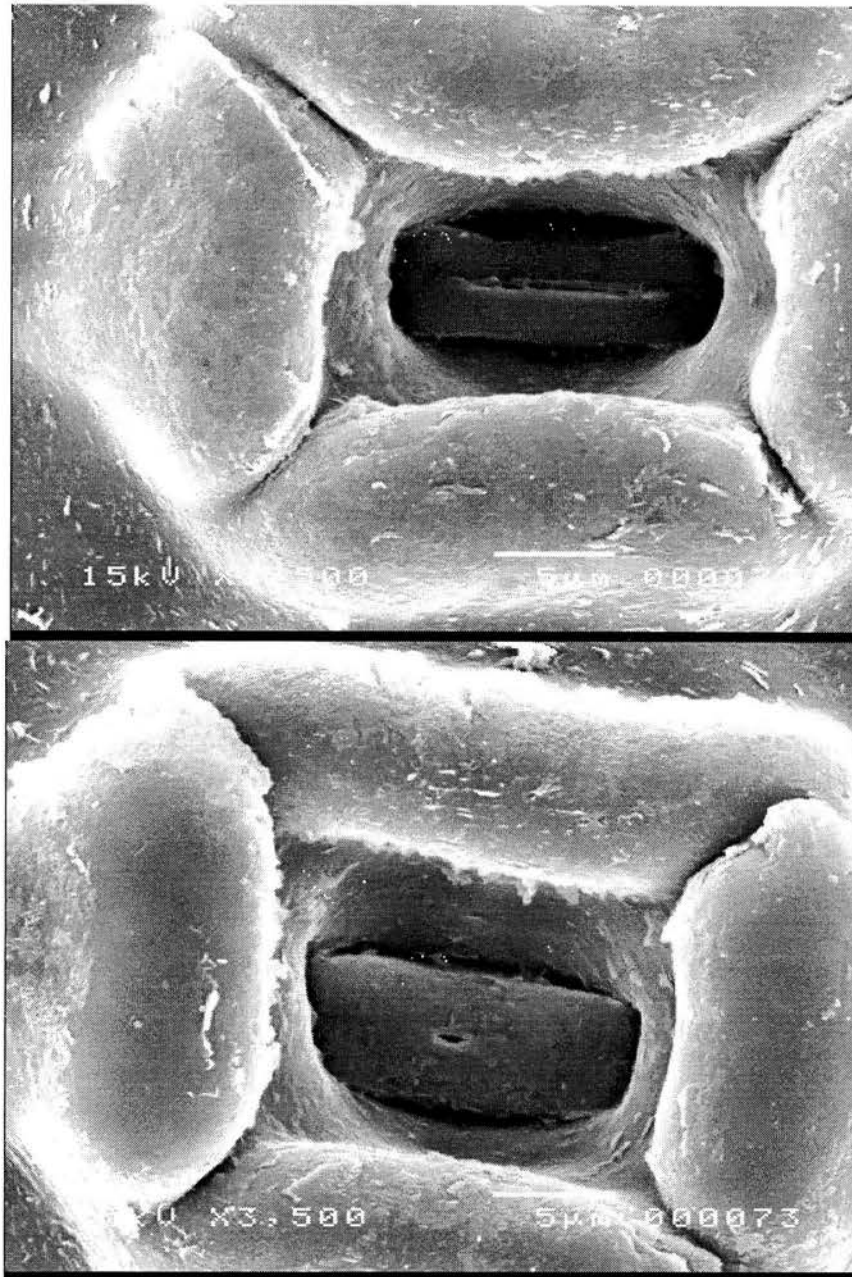


Figura 13. Vista interna de la cámara suraestomática del complejo estomático en hojas de *A. tequilana*.

Se realizaron preparaciones de ambos lados de la epidermis aislada para observarlas con el microscopio confocal, con la finalidad de obtener una reconstrucción de todo el complejo estomático. En la Fig. 14 se muestra la

reconstrucción tridimensional de la cámara supraestomática en una imagen de 38 barridos de 0.6  $\mu\text{m}$  de grosor (Fig. 14 A).. Esta imagen se obtuvo de limpiar previamente la superficie de la epidermis con un elastómero de silicón, para eliminar la alta señal producida por la cera epicuticular (Figura 14-B). En la figura 14-A, se observa una alta fluorescencia en las células accesorias que forman la cámara supraestomática. Para verificar que no es efecto de un artefacto, se decidió observar un corte paradermal de un fragmento de hoja que tuviera incluso células del mesófilo. En la microfotografía del fragmento (Fig. 14-B) de hoja se observa una alta fluorescencia en las células accesorias que forman la cámara supraestomática. Señal que sin duda esta dada por el contenido de las células accesorias.

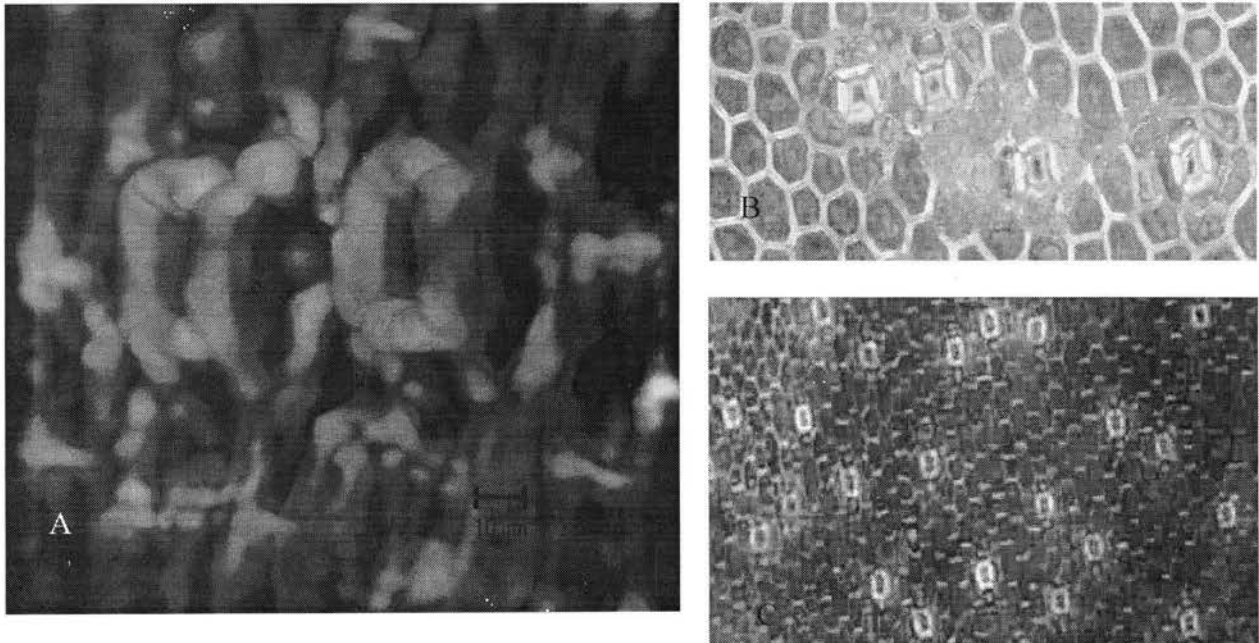


Figura 14. Microfotografías de fluorescencia epidermis aislada mecánicamente de las hojas de *A. tequilana* Weber. A, reconstrucción tridimensional de la cámara supraestomática obtenida por microscopía confocal, vista frontal, integrada y con un giro de 10°. B y C, microfotografías de microscopía de fluorescencia.

Al quitar la cera epicuticular que impedía observar con detalle la morfología del complejo estomático, la fluorescencia provenía de las células accesorias, lugar que sin duda esta produciendo una gran cantidad de ceras epicuticulares, con las características químicas similares, en cuanto a fluorescencia a las encontradas en la superficie de las células epidérmicas. Las reacciones de la producción de la cera se localizan en las células epidérmicas (Kunst 2003), sin embargo no existen reportes de una alta producción de ceras epicuticulares por parte de las células accesorias. Tenemos la hipótesis que las células accesorias, en el caso de *A. tequilana*, son un sitio de una gran producción de ceras epicuticulares que le sirven para evitar la pérdida de agua.

Aunque existen reportes sobre la caracterización del complejo estomático del género *Agave* (Gentry y Sauck, 1978, Hernández y col 2003), nuestros resultados muestran la primera reconstrucción de la cámara supraestomática para esta especie. Cabe mencionar que aunque existen reconstrucciones del complejo estomático en otras especies (Zelling y col. 2002), la nuestra es una imagen en tercera dimensión de la cámara supraestomática, utilizando microscopía confocal. El empleo de esta técnica nos permitirá obtener una reconstrucción tridimensional de todo el complejo.

En la superficie de la hoja, las cámaras supraestomáticas forman poros de un área de alrededor de  $100 \mu\text{m}^2$  cada uno. El poro de la cámara supraestomática puede tener un volumen de  $2,000 \mu\text{m}^3$ , y si se considera que las hojas de *A. tequilana* tienen de 13 a 100 estomas por  $\text{mm}^2$  (dependiendo de la hoja y la posición), se obtiene un volumen importante para nuestro estudio. La estructura y función de la cutícula externa ha sido estudiada en muchos organismos y modelos experimentales (Kerstiens 1996 y 2001; Gentry y Sauck 1978; Pesacrea and

Hasenstein, 1999). Sin embargo, se ha prestado poca atención a la porción interna de la cámara supraestomática, tanto en su composición como en su papel dentro de la fisiología de la hoja.

A continuación se hicieron las determinaciones cuantitativas, tanto del grosor de la cutícula, como del número de estomas por  $\text{mm}^2$ . Para ello se tomaron hojas del cogollo, de la parte intermedia y de la periferia de la planta (Fig 15). Estos grupos de hojas son importantes, ya que se afirma que la orientación y el ángulo de inclinación de la hoja están relacionados con diferencias en la actividad fisiológica de las hojas (Woodhouse y cols., 1980).

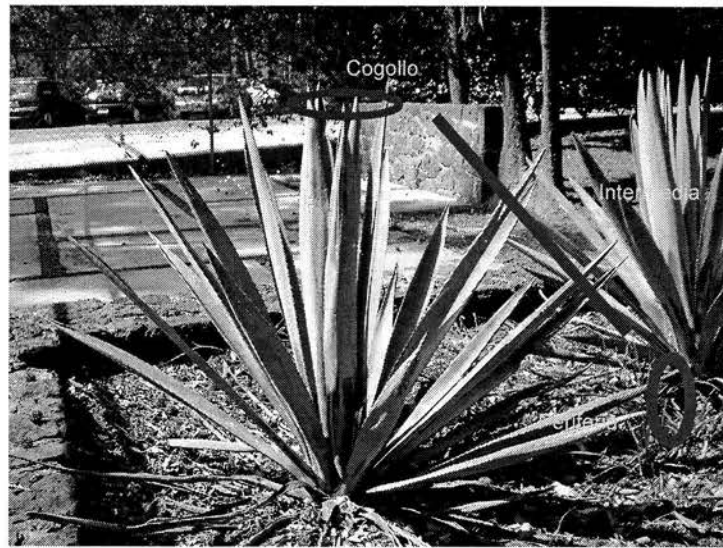


Figura 15. Hojas de *A. tequilana* estudiadas dependiendo de su posición en la planta.

De los tres grupos de hojas seleccionados para cada edad de la planta se analizaron 6 partes de la hoja: la parte basal, media y apical, cada una por ambos lados de la hoja (haz y envés). La Fig. 16 muestra el número de estomas por  $\text{mm}^2$  de las plantas de un año. Las hojas del cogollo son las que tienen un mayor número de estomas. El número de estomas de las hojas del cogollo fue casi el doble respecto a las hojas de la periferia, no así con respecto a las hojas intermedias de la planta, salvo en las regiones basales de estas, tanto en el haz como el envés, en las cuales

también el número de estomas fue reducido. Es necesario señalar también que el número máximo de estomas por  $\text{mm}^2$  osciló entre 50 y 60.

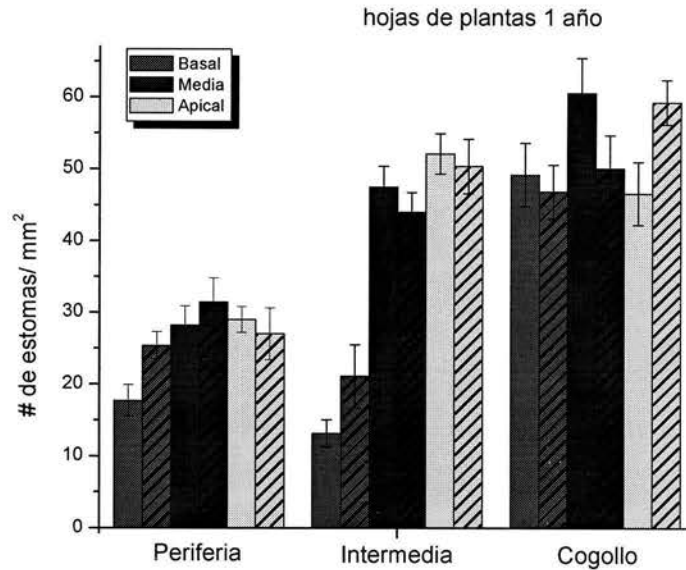


Figura 16. Número de estomas por  $\text{mm}^2$  de las hojas de plantas de un año. Las barras con líneas diagonales representan el haz de la hoja, y las lisas el envés. Las cifras se dan como el promedio en cada caso  $\pm$  la desviación estándar.

Las hojas de la planta de 2 años mostraron también en el cogollo un mayor número de estomas que las hojas intermedias y periféricas de la planta (Figura 17). Comparando el número de estomas del haz y el envés de los grupos de hojas estudiados, se encontraron diferencias pequeñas y sin significación estadística en la parte basal de las hojas de la periferia, en la parte basal de las hojas intermedias, así como en la parte apical de las hojas del cogollo. Se encontró una clara tendencia en el sentido de aumento del número de estomas de las hojas periféricas hacia las del cogollo. Finalmente, es importante señalar que, tal vez en contra de lo esperado, el número de estomas en las plantas de dos años es mayor en cada tipo de hoja y



región de ella, de modo que como puede verse en la Fig. 17, la cifra máxima alcanza cerca de 100 estomas por  $\text{mm}^2$ .

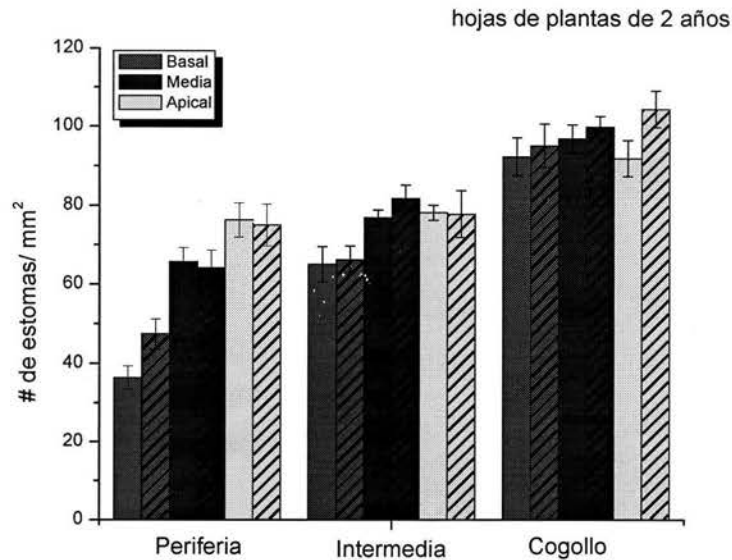


Figura 17. Número de estomas por  $\text{mm}^2$  de las hojas de plantas de 2 años. Las barras con líneas diagonales representan el haz de la hoja, y las lisas el envés. Las cifras se dan como el promedio en cada caso  $\pm$  la desviación estándar.

Para las hojas de 4 años también se observó un mayor número de estomas en las hojas del cogollo, comparado con los presentes en la parte intermedia de la planta; sin embargo, la tendencia al aumento de la periferia hacia el cogollo no es tan marcada, así como una tendencia general de las cifras hacia la disminución, que no fue significativa (Figura 18).

La distribución de los estomas concuerdan con lo reportado por Gentry y Sauck (1978), Nobel (1988) y Hernández-Valencia (2003) respecto a la presencia de estomas en ambas superficies de la hoja en *A. tequilana*.

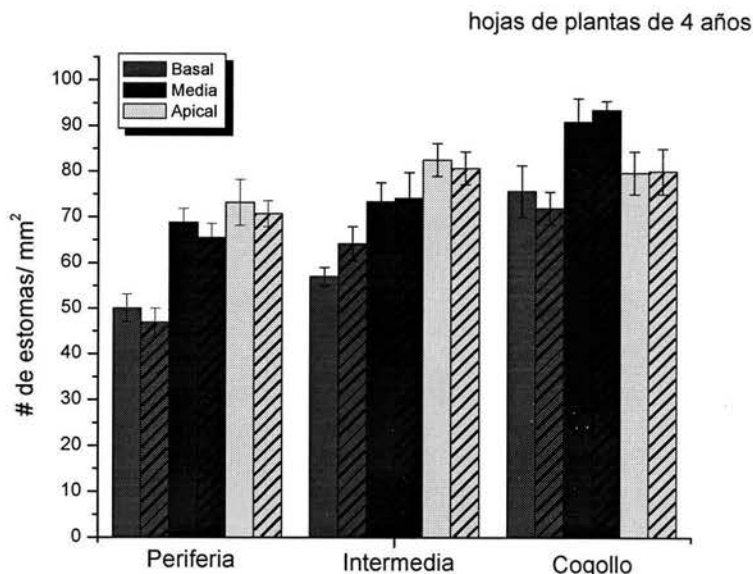


Figura 18. Número de estomas por  $\text{mm}^2$  de las hojas de plantas de 4 años. Las barras con líneas diagonales representan el haz de la hoja, y las lisas el envés. Las cifras se dan como el promedio en cada caso  $\pm$  la desviación estándar.

La densidad o frecuencia estomática, Gentry (1978) reportó de 30 a 50 estomas  $\text{mm}^{-2}$  en por lo menos 80 especies de *Agaves*. Este reporte se realizó en algunas especies del género *Agave* cuyas muestras se obtuvieron de ejemplares de herbario y jardines botánicos. Nobel (1983) informó que la densidad estomática de la superficie adaxial supera en 25% a la densidad de la superficie abaxial.

Si comparamos, la densidad estomática de las especies del género *Agave* con la densidad presente en otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas es inferior. En estos grupos, los valores comunes alcanzan de 100 a 300 estomas  $\text{mm}^{-2}$ , en avena, trigo, maíz, alfalfa y tomate la densidad estomática adaxial oscila entre 25 y 169, mientras que en la superficie abaxial los valores van de 23 a 203 estomas  $\text{mm}^{-2}$ .

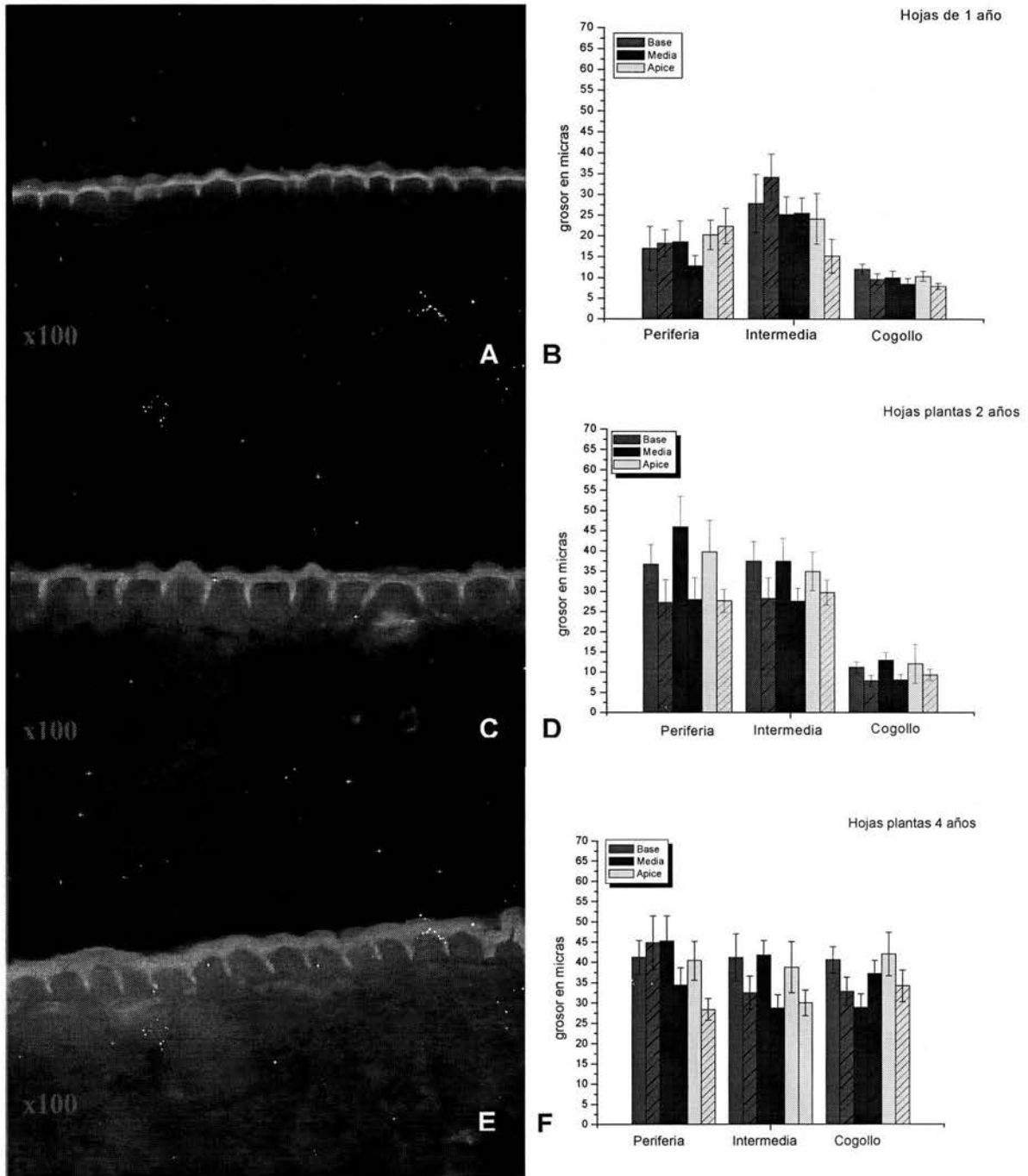


Figura 19. A, C y E muestra cortes transversales de las hojas de *A. tequilana* Weber en donde se observa el grosor de la cutícula en los tres grupos de edades. Las figuras B, D y F muestran el análisis de cada grupo de edad. Las barras con líneas diagonales representan el haz de la hoja, y las lisas el envés. Las cifras se dan como el promedio en cada caso  $\pm$  la desviación estándar.

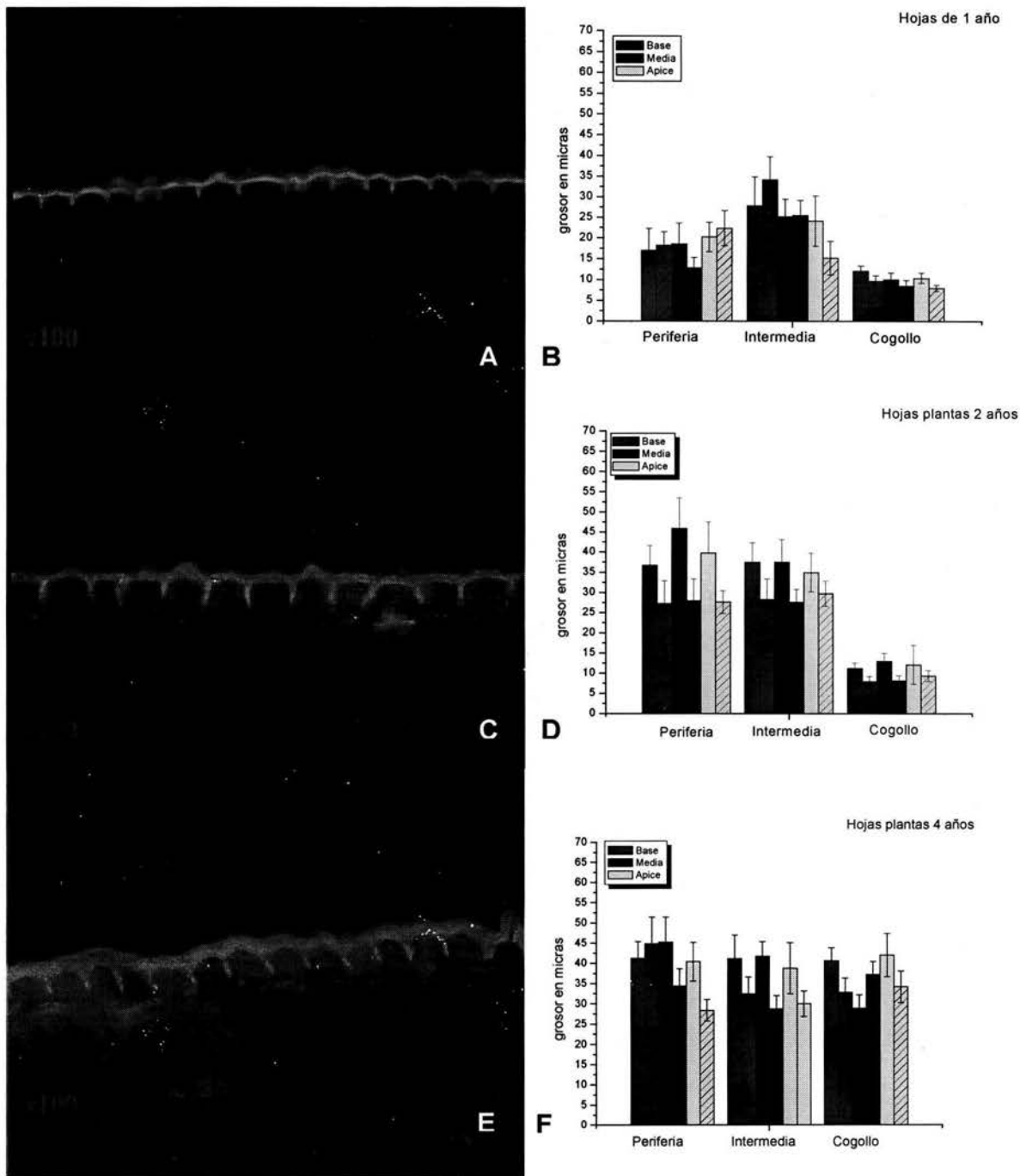


Figura 19. A, C y E muestra cortes transversales de las hojas de *A. tequilana* Weber en donde se observa el grosor de la cutícula en los tres grupos de edades. Las figuras B, D y F muestran el análisis de cada grupo de edad. Las barras con líneas diagonales representan el haz de la hoja, y las lisas el envés. Las cifras se dan como el promedio en cada caso  $\pm$  la desviación estándar.



Es necesario señalar también señalar que el grosor osciló entre  $8.0 \mu\text{m} \pm 0.74$  (en la parte apical y cara adaxial) y  $12.07 \mu\text{m} \pm 1.24$  (en la parte apical y cara abaxial).

Se observó que el grosor de la cutícula aumenta a medida que la planta crece; es decir, en las plantas de 4 años la cutícula es más gruesa que en las de 2 años, y a su vez, que en las de 1 año, también aumentó de las hojas centrales hacia las hojas de la periferia, con un mayor grosor en las partes basales de las hojas, por lo que las zonas apical y media de los tres grupos presentan un menor grosor. Algo que se observa también es que en general el grosor de la cutícula de los tres grupos de plantas es menor por el lado adaxial que por el abaxial para cada parte de la hoja. Hasta la fecha no hay reportes de estudios de la cutícula de *A. tequilana* para estos grupos de edades; sólo se conoce el grosor de la cutícula de otras especies como el de *A. americana* y *A. cochlearis*, que presentan valores de 4 y 25  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Villagrán, 1939; Wattendorff y Holloway, 1980; Wattendorff y Holloway, 1982).

En las hojas del cogollo en su parte apical presentaron un mayor número de estomas por  $\text{mm}^2$  y el menor grosor de la cutícula para los tres grupos de edades, y en la parte apical por la parte abaxial, en general, presentan mayor número de estomas y menor grosor de la cutícula que por la abaxial. El número de estomas y el grosor de la cutícula son factores importantes para la permeabilidad, como lo demuestran Wattendorff y Holloway (1980).

Dadas las características de número de estomas y grosor cuticular encontrados en las hojas de *A. tequilana*, se decidió utilizar las hojas del cogollo de las plantas de 1 año por su parte apical del lado adaxial, definiendo ésta como la mejor zona de

estudio para los experimentos de permeabilidad, para tener un mayor control de la densidad estomática y el grosor cuticular.



## **Microscopía electrónica de transmisión y barrido**

Se analizaron hojas del cogollo, de la parte intermedia y de la periferia de cada planta, para diferentes grupos de edad. En el análisis por medio de microscopía electrónica de barrido (bajo vacío), se observó que en los grupos de edades analizados, en las hojas de la periferia y de la parte media, la cera epicuticular forma una gruesa capa que cubre por completo la epidermis (Figura 20-A, B y D). En las hojas del cogollo de los tres grupos de edades, se encontró que las ceras epicuticulares se localizan sobre las células, estando libre de cera las paredes de las mismas (Figura 20-C). En estas hojas las ceras presentan láminas aplanadas, delgadas, erectas, sin organización aparente.

La composición química de las ceras epicuticulares tiene una estrecha relación con la morfología y ultraestructura de las mismas (Barthlott y col., 1998). De este modo, la presencia de unos u otros componentes va a determinar la aparición de estructuras de muy distintas morfologías (hélices, túbulos, cintas, varillas o placas) ya sean de tipo cristalino o amorfo. Los hidrocarburos y alcoholes primarios cristalizan en forma de placas, los alcoholes secundarios, cetonas y beta-dicetonas lo hacen como túbulos, los aldehídos cristalizan en forma de varillas y los dioles como cintas. Por el contrario, los triterpenoides, acil ésteres y estóolidos dan lugar a estructuras mayoritariamente amorfas (Reyna y Borraz, 2003). De esta manera es necesario realizar estudios de estructura química de las cera para correlacionarlas con la morfología propuesta por diferentes autores (Reyna y Borras, 2003; Barthlott y col., 1998).

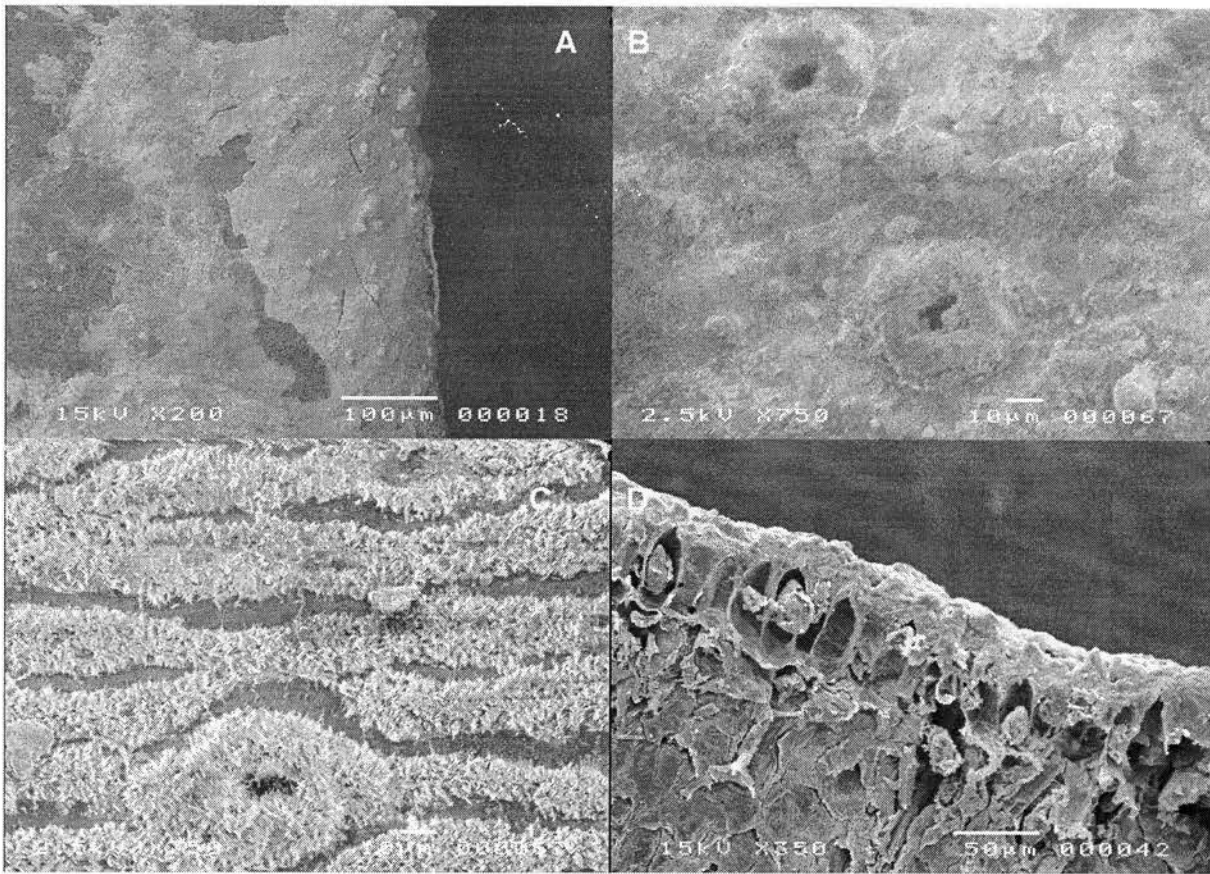


Figura 20.- Fotografías de microscopia electrónica de barrido de las superficie de hojas de *A. tequilana*. La figura A y D, muestra una imagen de plantas de 4 años en hojas de la periferia; B , muestra una imagen de plantas de 1 años en hojas de la periferia fotografías; C , muestra una imagen de la ceras epicuticulares en plantas de 1 años en hojas del cogollo.

Hernández-Valencia y col. (2003), al estudiar la epidermis de *A. tequilana*, encontraron en ambas superficies de la hoja cristales de oxalato de calcio. En ninguna de las plantas estudiadas se encontró sobre la superficie, solo encontramos gran cantidad de cristales en el interior de los fragmentos de hoja. Los cristales están presentes en el interior de las células epidérmicas y parénquima esponjoso, hasta la región de los haces vasculares (Figura 21). La cantidad de cristales debajo de las células epidérmicas aumentaba con la edad (datos no mostrados) y en las plantas de 4 años se encontró que los cristales tipo drusa están en abundancia cerca de las



capas de la epidermis en ambos lados de la hoja (Figura 21-A). Al realizar un análisis de los tipos morfológicos de los cristales se encontró cristales tipo estiloide, rafidios y drusas (Fig. 21-B, C y D). Los cristales están formados de oxalato de calcio, también están presentes en interior de las células epidérmicas y parénquima esponjoso, hasta la región de los haces vasculares.

Existen diferentes tipos de cristales en las plantas (Prychid y Rudall 1999; Nakata 2003) estos cristales de oxalato de calcio, al parecer juegan un papel importante en procesos como la regulación de calcio, protección contra herbívoros, y detoxificación de metales. Sin embargo en *A. tequilana*, aunque se ha mencionado su presencia en otros trabajos (Hernández-Valencia y col., 2003 y 2002), solo se ha realizado un trabajo de sobre la dermatitis causada en los trabajadores de la industria tequilera (Salinas y col 2001).



Figura 21.- Fotografías de microscopia electrónica de barrido y optico de los fragmentos de hoja estudiados de *A. tequilana*. La figura A muestra un fragmento de la hoja de plantas de 4 años en hojas de la periferia; B , muestra una macrofotografía de un cristal tipo estiloides; C , muestra una macrofotografía de un cristal tipo rafidios; D, muestra una macrofotografía de un cristal tipo drusa, el cristal es un conglomerado de las facetas múltiples que irradian hacia fuera de una base central.

Las plantas superiores, así como sus frutos, mantienen un alto grado de aislamiento con el medio externo gracias a la cutícula de composición variada que se encuentra cubriendo las zonas aéreas. La cutícula tiene una función importante en

procesos como la absorción y pérdida del agua del interior celular, la absorción y difusión de compuestos aplicados exógenamente. Se observó que la cutícula de la planta forma una capa uniforme por encima de las células de la epidermis, bordeando las cámaras supraestomáticas. Se analizó la cutícula por medio de microscopía electrónica (Fig 22) en la que se encontró que *A. tequilana* presenta tres capas, la capa epicuticular, la cutícula propiamente dicha y la capa cuticular, estas son de tamaño variable y dependen de la edad de la planta.

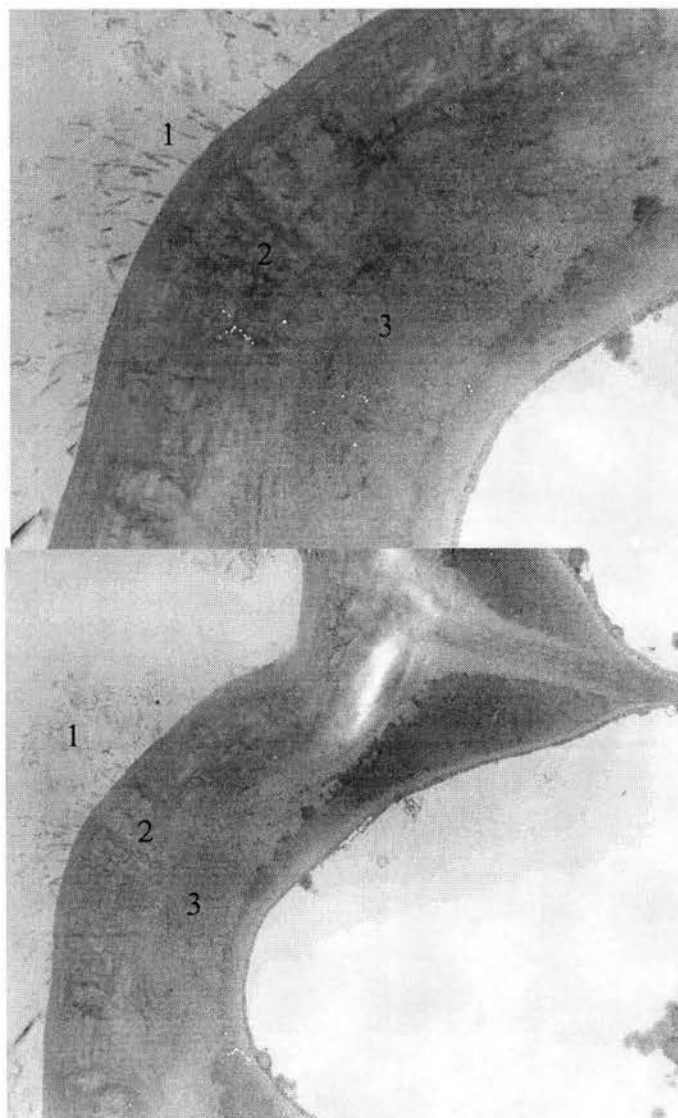


Figura 22. Fotografías de microscopio electrónico de transmisión en donde se observa las partes de la cutícula de *Agave tequilana* Weber, capa Epicutícula (1), cutícula propiamente dicha (2) y capa cuticular(3).

No existe un límite definido entre la cutícula y la pared celular de las células de la epidermis, existe una zona de transición donde las microfibrillas de celulosa y pectina se encuentran entremezcladas con cutina y sustancias de la capa cuticular que forman la matriz de la pared primaria.

En *Agave americana*, Wattendorff y Holloway (1980), realizaron un estudio de la ultra estructura de la cutícula. En este trabajo utilizaron hojas de mediana edad (plantas de 10 cm de largo) en su trabajo describen la cutícula compuesta de 6 capas, las cuáles designo como; ceras epicuticulares, cutícula propiamente dicha, una capa exterior e interior de cutícula y una interior y exterior de la pared celular. Esto es un reflejo de la diferente terminología en el estudio de la cutícula, sin embargo al analizar sus imágenes y comparar las terminologías, las ultimas dos capas que menciona es a lo que se conoce actualmente como la pectina y la pared celular de estos organismos. Así estos dos agaves presentan las tres capas propuestas anteriormente (Jetter, 2000); la capa epicuticular, la cutícula propiamente dicha y la capa cuticular. Presentando diferencias en grosor, debidas a plantas estudiadas de diferente edad en ambos estudios, lo cual dificulta su comparación de tamaño.

En las aplicaciones foliares de interés agronómico, el conocimiento de la morfología de las ceras epicuticulares y la cutícula es de suma importancia para conocer el efecto de los tensoactivos en el organismo (Falk, 1994; Henning, 2000; Urzúa , 2002).

Algunos de los tensoactivos utilizados en la agricultura humectan la cutícula de las plantas y permite el paso del principio activo que se intenta introducir en la planta. La humectabilidad o retención de la superficie de las plantas es el resultado de las múltiples interrelaciones entre las propiedades de aspersion y las de la superficie vegetal. La humectabilidad de las superficies vegetales, es extraordinariamente variada. El análisis de las ceras epicuticulares obtenidas con microscopio electrónico (Henning, 2000), revelan lo fácil o difícil de la humectabilidad: las superficies rugosas, cubiertas con cristaloides de cera, son difícilmente humectables a causa del aire contenido en la microestructura; las superficies cubiertas con una película lisa de cera son fácilmente humectables. Por lo tanto sería de esperarse una fácil humectación en las hojas de *A. tequilana* con la ayuda de diferentes tensoactivos, por la presencia de placas y laminas delgadas en las ceras epicuticulares. Sin embargo es necesario profundizar el estudio de las estructuras epicuticulares ya que no se siguió a un grupo de organismo e lo largo de un o varios ciclos anuales, con la finalidad de ver el crecimiento y formación de las ceras y como estas afectan los procesos de aplicaciones foliares.

### Tensoactivos y su importancia en la permeabilidad cuticular

Las ceras epicuticulares son la primera barrera a su difusión, y a la de solutos que atraviesan la cutícula (Falk, 1994), actúa como una barrera que impide la entrada de sustancias de interés agronómico. Una gota de agua, al ser depositada sobre la cutícula de *A. tequilana* queda compactada (Fig. 23) sin observar que humecte la cutícula.

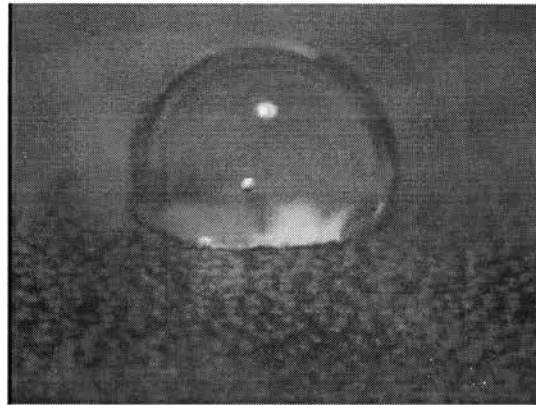


Fig. 23. Gota de agua sobre la superficie de una hoja de *A. tequilana*

Con el propósito de extender el agua, pero más bien el de los materiales disueltos en ella, que se pretenden aplicar por vía foliar, se utilizan agentes tensoactivos que permitan el aumento del área de contacto, para facilitar estas aplicaciones de compuestos de interés agronómico. En los organismos xerófitos se han utilizado tensoactivos en la aplicación de hormonas vegetales (Rodríguez, 1990; Aguilar 1980, 1987), pero no existen trabajos sobre la aspersión de compuestos de interés agronómico en *A. tequilana*, y mucho menos un análisis de tensoactivos en sus hojas. Para estudiar esto, se utilizaron diferentes concentraciones de tensoactivos, entre ellos el tween 20, 80, así como otros 5 productos del mercado de

naturaleza no iónica: Full-Extensor<sup>®</sup>, Agrex F<sup>®</sup>, Inex A<sup>®</sup>, Impacto<sup>®</sup> y Agrex ABC<sup>®</sup> (composición anexo1). Cabe mencionar que ninguno de estos agentes se ha probado en plantaciones de ningún agave para ayudar a la penetración de sustancias de interés, como hormonas de crecimiento (Vademécum Agrícola, 2002).

Se utilizaron agentes tensoactivos de naturaleza no iónica porque no tienen carga eléctrica y ionizan muy poco en agua; además son químicamente inactivos en presencia de sales. Esta característica permite mezclarlos con diversos compuestos, sin reaccionar químicamente con ellos, por lo que no se tiene el riesgo de que el agente reaccione con las soluciones en estudio e influya en la permeabilidad (Jiménez y Macarullá, 1989).

La acción biológica de los compuestos que se aplican vía foliar en la industria agronómica, depende tres eventos principales: primero, que se mantengan en cantidad suficiente y con buen cubrimiento sobre el objeto a tratar; segundo, que penetren al interior de la planta; y tercero, que el principio activo lleve a cabo su actividad en los sitios de acción (Urzúa 2002). En el caso de las aplicaciones al foliares, es frecuente que los compuestos no se depositen adecuadamente sobre las hojas, ya sea por que las gotas no alcancen a extenderse sobre la superficie; que impacten y luego reboten, o que no se extiendan sobre la superficie y que por su tamaño, resbalen (Henning, 2000). Así pues, la humectación lograda con los tensoactivos, la tensión superficial (que logran romper en las capas epicuticulares) y su naturaleza química, son tres de los factores mas importantes en las aplicaciones foliares de entres agronómico (Bautista y Reynaga 2004).

En *A. tequilana*, aunque se les utiliza, no hay reportes sobre la eficacia de los tensoactivos, por lo que se midieron algunos parámetros fisicoquímicos que se consideran de importancia y relacionados con el efecto que ejercen sobre la sustancia y la superficie de la hoja de la planta (Bautista y Reynaga 2004). Los resultado se resumen en la Tabla 2, los parámetros medidos fueron el pH, tensión superficial y área de humectación del tensoactivo en la hoja.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de los distintos agentes tensoactivos utilizados, a la concentración recomendada de uso por el fabricante.

Tensoactivo	Clasificación	pH	$\gamma$ (Dina/cm)	Área de humectación del tensoactivo en la hoja (cm)
Full Extensor <sup>®</sup>	No iónico	6.62	23.5	2.4
Inex A <sup>®</sup>	No iónico	6.61	29	1.8
Agrex ABC <sup>®</sup>	No iónico	3.06	30.7	Se forma gota
Agrex F <sup>®</sup>	No iónico	7.98	31.8	Se forma gota
Impacto <sup>®</sup>	No iónico	3.12	33.2	Se forma gota
Tween 20	No iónico	6.9	40.5	Se forma gota
Tween 80	No iónico	6.8	42.5	Se forma gota
Triton X- 100	No iónico	6.5	30.0	Se forma gota



Todos los tensoactivos utilizados y las mezclas mostraron valores de pH entre los 3 y 7.98 unidades. La naturaleza ácida o neutra de los tensoactivos es importante si en la aplicación foliar se requiere la selección del pH en el cual el principio activo a utilizar funciona o se mantiene de manera eficaz (Vademécum Agrícola, 2002). Se encontró que sólo los tensoactivos Full Extensor e Inex redujeron la tensión superficial al grado de impedir la formación de la gota al contacto con las ceras epicuticulares. Los tensoactivos que no forman gota en la superficie de las hojas son los únicos capaces de disminuir la tensión superficial de soluciones acuosas a valores bajos (23 Din/cm para el Full-Extensor<sup>®</sup>, y 29.1 Din/cm para el Inex A<sup>®</sup>).

El área de humectación es un parámetro correlacionado con la tensión superficial, al aumentar la tensión superficial se reduce el área de humectación del tensoactivo, forman en algunos casos la gota que se observa en la figura 23. Este es un parámetro que tiene una importancia práctica, si se considera que en muchos de los casos no existen equipos de laboratorio en zonas agrícolas para medir parámetros de tensión superficial ni los proveedores de estos productos lo mencionan en sus etiquetas. En la figura 24 se muestra el área de humectación del Full extensor como uno de los mejores tensoactivos en este parámetro.

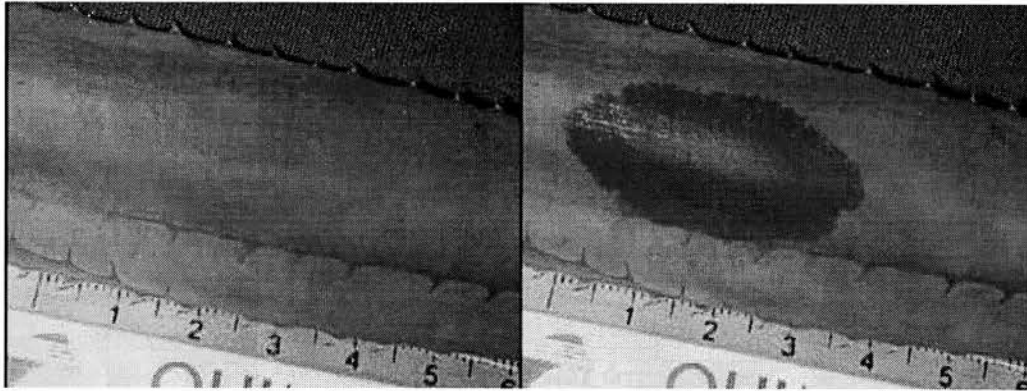


Fig. 24. Área de humectación del Full-Extensor<sup>®</sup> sobre la hoja a los 0.5 min de aplicada.

Los dos mejores tensoactivos son surfactantes de silicón, reportados en la literatura como los únicos capaces de disminuir la tensión superficial de soluciones acuosas a valores aproximados a 20 dinas/cm, teniendo como referencia el valor de la  $\gamma_{H_2O}$  de 72.8 Dinascm (Penner y col., 1999)

Con la finalidad de conocer la concentración mínima que pueda utilizarse los tensoactivo, sin que cambien sus propiedades de tensión superficial se realizó una curva de concentraciones. Al medir el efecto de la concentración de estos surfactantes sobre la  $\gamma$  del agua, en la figura 25 se observa que el Full-Extensor<sup>®</sup> es capaz de disminuir la  $\gamma$  hasta 23 Dinascm e Inex A<sup>®</sup> a un valor de 29.1 Dinascm a una concentración de 1  $\mu$ l/ml.

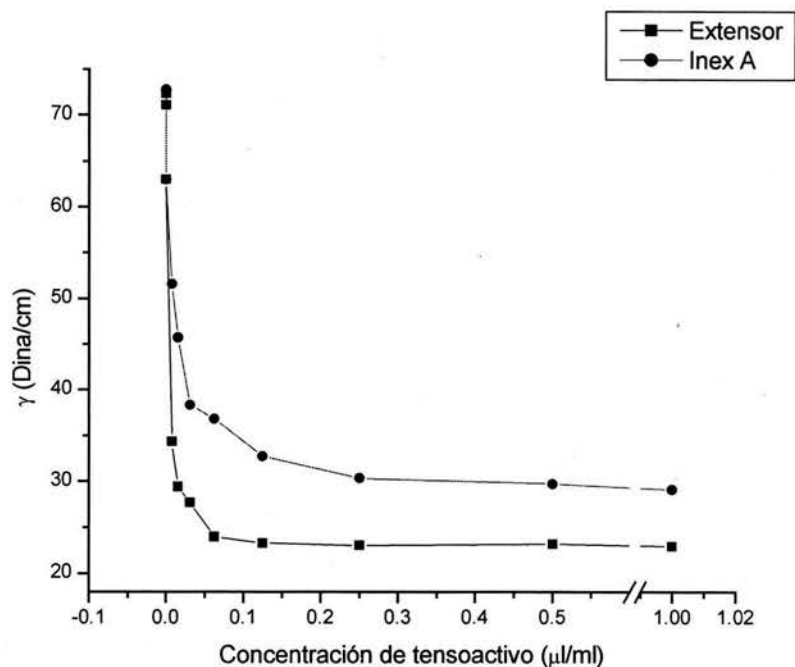


Fig. 25. Efecto de dos surfactantes de silicón no iónicos, Full-Extensor<sup>®</sup> e Inex A<sup>®</sup> sobre la  $\gamma$  a diferentes concentraciones.

La disminución de la tensión superficial y el aumento del área de humectación con Inex A<sup>®</sup> no es tan apreciable como con el Full-Extensor<sup>®</sup>; esto puede deberse a que Full Extensor<sup>®</sup> (anexo 1), es 100% un poliéter de polimetil siloxano, y el Inex A<sup>®</sup> sólo tiene en su composición 1.85% de dimetil polisiloxano. Los surfactantes de siloxanos consisten de un grupo siloxano metilado acoplado a uno o más grupos polares en el cual el grupo hidrofóbico es el silicio; estos pueden disminuir la tensión superficial a valores menores que los surfactantes hidrocarbonados debido a los grupos metilados que tienen en su estructura, pues estos grupos quedan atrapados en una red flexible causada por los enlaces  $-O-Si-O-Si-$ , generando una mayor actividad sobre la superficie por el acomodo de las moléculas con respecto a los surfactantes hidrocarbonados. En la Fig. 26 se muestra el acomodo de los

surfactantes hidrocarbonados y los surfactantes de siloxano (Penner y col., 1999). En surfactantes de siloxano tienen en su estructura metilos que presentan una energía sobre la superficie de alrededor 20 Dinan/cm; este es el valor mas bajo de energía que se puede alcanzar usando surfactantes de siloxano (recordemos que con Full-Extensor<sup>®</sup> se alcanza una  $\gamma$  de 23.5 dinan/cm y con Inex A<sup>®</sup>, de 29 dinan/cm, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura) los surfactantes hidrocarbonados constan de grupos hidrofóbicos alquilo o alquilarilo que contienen muchos grupos CH<sub>2</sub> en su estructura, que se acomodan de forma apilada en la interfase aire-líquido, provocando una energía superficial de alrededor de 30 Dinan/cm o más; es por éso que al tener la flexibilidad inusual del enlace siloxano y al comparar las diferentes energías de los grupos -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>, se obtienen los valores mas bajos de tensión superficial con los surfactantes de siloxano (Penner y col., 1999), permitiendo por esta razón la disminución a cero del ángulo de contacto.

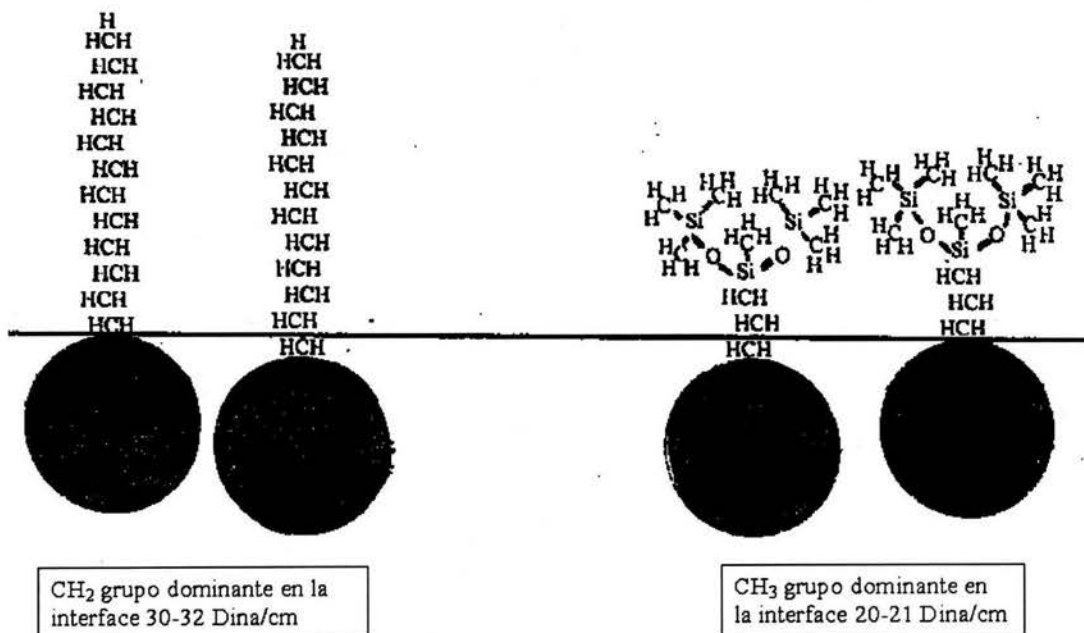


Fig. 26. Comparación de la superficie característica de un surfactante hidrocarbonado contra un surfactante de siloxano. (tomado de Holloway y cols., 1994).

Algunos autores señalan que la naturaleza hidrofóbica de la cutícula no cambia con el uso de los tensoactivos (Jiménez y Macarullá, 1989); sin embargo, realizamos un análisis de las ceras epicuticulares para conocer el efecto de estos tensoactivos, Inex y Full Extensor, en la morfología de las mismas.

Para estudiar por microscopía electrónica de barrido el efecto sobre las ceras epicuticulares, se tomaron hojas de la periferia, la parte media y el cogollo en plantas de un año. Los fragmentos de hojas analizados se observaron en microscopía de bajo vacío, congelando por contacto las muestras con nitrógeno líquido. En las hojas del cogollo se observó (figura 27) que estos productos producen cambios importantes en la morfología de las ceras, pero sin su eliminación aparente. Algunos autores consideran el efecto un fenómeno de plastificación (Holloway, 1994); sin embargo, se desconoce el efecto de estos tensoactivos a tiempos mayores y el impacto posible en el programa de manejo anual del cultivo.

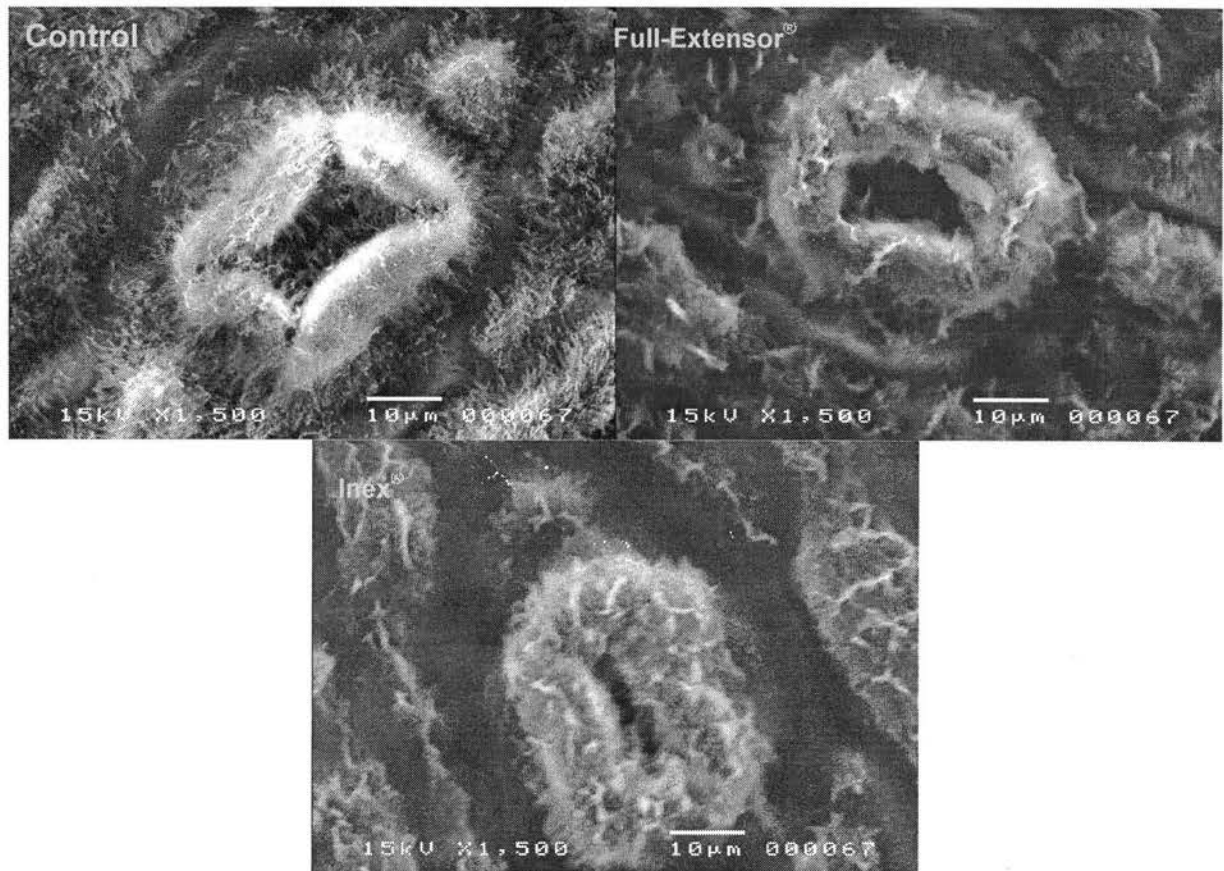


Figura 27. Efecto del tensoactivo Full Extensor e Inex sobre las ceras epicuticulares, en hojas del cogollo de *A. Tequilana*.

En esta parte del trabajo se demuestra que las ceras epicuticulares al ser la primera barrera de la difusión de compuestos de interés agronómico, actúan como una barrera que impide la entrada de sustancias y es alterada en su morfología al utilizar tensoactivos en aplicaciones foliares. Es importante realizar estudios en tiempos mas largo para conocer el efecto y permanencia de los cambios estructurales observados.

### **Permeabilidad a colorante y Zeatina**

La cutícula de la planta es una barrera para la toma foliar de nutrientes, reguladores de crecimiento, fungicidas sistémicos, insecticidas y herbicidas, importantes desde el punto de vista agrícola. Su permeabilidad a los iones es extremadamente baja, sin embargo, esta permeabilidad puede favorecerse aplicando tensoactivos (Bautista y Reynaga, 2004). El conocimiento de la estructura cuticular y la selección del tensoactivo son importantes para aumentar la permeabilidad de compuestos de compuestos de interés (Bautista y Reynaga, 2004; Urzúa, 2002).

Como ya se mencionó, y a partir de los datos de la estructura de la cutícula y su relación con el complejo estomático se desechó la posibilidad de utilizar la epidermis aislada, porque al obtenerse esta, se obtiene una membrana con poros abundantes que son restos del complejo estomático. Por esa razón se consideró estudiar la permeabilidad de la cutícula de la hoja sin desprender. El sistema utilizado consistió en adherir tubos cortados Eppendorf a la hoja, con un polímero adhesivo de silicón, (Bautista y Reynaga, 2004).

Se utilizaron discos de 15 mm de diámetro (cortados de la hoja con un sacabocados del número once) a los que denominamos fragmentos circulares de hoja (FCH), en ellos se pegaron los tubos Eppendorf para colocar las sustancias de estudio (ver material y métodos).

Se utilizó la tercera hoja a partir de la primera hoja erecta (Woodhouse y cols., 1980) como material de obtención de los FCH. Se utilizaron plantas de 1 año, por se las que tienen un mayor número de estomas y menor grosor de la cutícula, como parte de los resultados de la estructura de cutícula y estomas de este trabajo.

Una vez acoplado el tubo se verificó la ausencia de fugas del tubo con el FCH, para lo cual se le agregaron 200  $\mu$ l de agua destilada por una hora. Una vez verificada la ausencia de fugas se retiró el agua destilada y se colocaron 200  $\mu$ l de la solución de estudio.

Para favorecer el transporte vía la cutícula se le adiciono a todos los colorantes el tensoactivo que mostró una mejor humectación en las hojas de *A. tequilana* y al mismo tiempo una menor tensión superficial en las soluciones. Se adiciono Full Extensor a una concentración de 1 $\mu$ l / ml en la solución de colorantes, la concentración para cada colorante se muestra en la tabla 1. El FCH con el tubo ya verificado las ausencia de fugas, se dejo en exposición por 5 horas con la solución de estudio. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución de estudio y se despegó el FCH del tubo y del silicón, se enjuago el FCH y se realizar cortes transversales, con la finalidad de observar la presencia del colorante en las células de la epidermis o en el mesófilo de fragmento de hoja.

En el sistema formado por el FCH, se realizaron pruebas de permeabilidad de diferentes colorantes; Amarillo de acridina, azul brillante, fluorescente brillante (calcofluor), bromuro de etidio, cristal violeta, fluoresceína, naranja de acridina, nigrosina, piranina, rodamina B, rojo neutro y rojo de Ponceau. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.-Detección de colorantes en cortes transversales después de 5 horas de exposición al colorante.



Colorante	Concentración	Detectado en cortes transversal
amarillo de acridina	10	SI
azul brillante,	10	NO
bromuro de etidio	1	SI
calcofluor	10	SI
cristal violeta,	10	NO
fluoresceína,	10	SI
naranja de acridina	2.5	SI
nigrosina	10	NO
piranina	10	SI
rodamina B,	1	NO
rojo de Ponceau	10	NO
rojo neutro	10	NO

De los colorantes utilizados los únicos que no se detectaron que atravesaran la cutícula son: azul brillante, cristal violeta, nigrosina, rojo neutro y rojo de Ponceau, todos ellos colorantes no fluorescentes, lo cual al parecer es una limitante su detección mas que el paso a través de la cutícula. Sí penetran: amarillo de acridina, calcoflúor, bromuro de etidio, fluoresceína, naranja de acridina, piranina y rodamina B (Figura 22), todos ellos colorantes fluorescentes. Salvo la piranina y el calcofluor, se trata de moléculas hidrofóbicas con carga positiva, pero aún estas tienen una estructura a base de varios anillos bencénicos, que pudiera deslocalizar la carga de los grupos ionizables. Los colorantes que fueron detectados en los cortes transversales, incluso mostraron indicios del colorante en la parte opuesta en donde se le aplico el colorante (Figura 22 B, D y E).

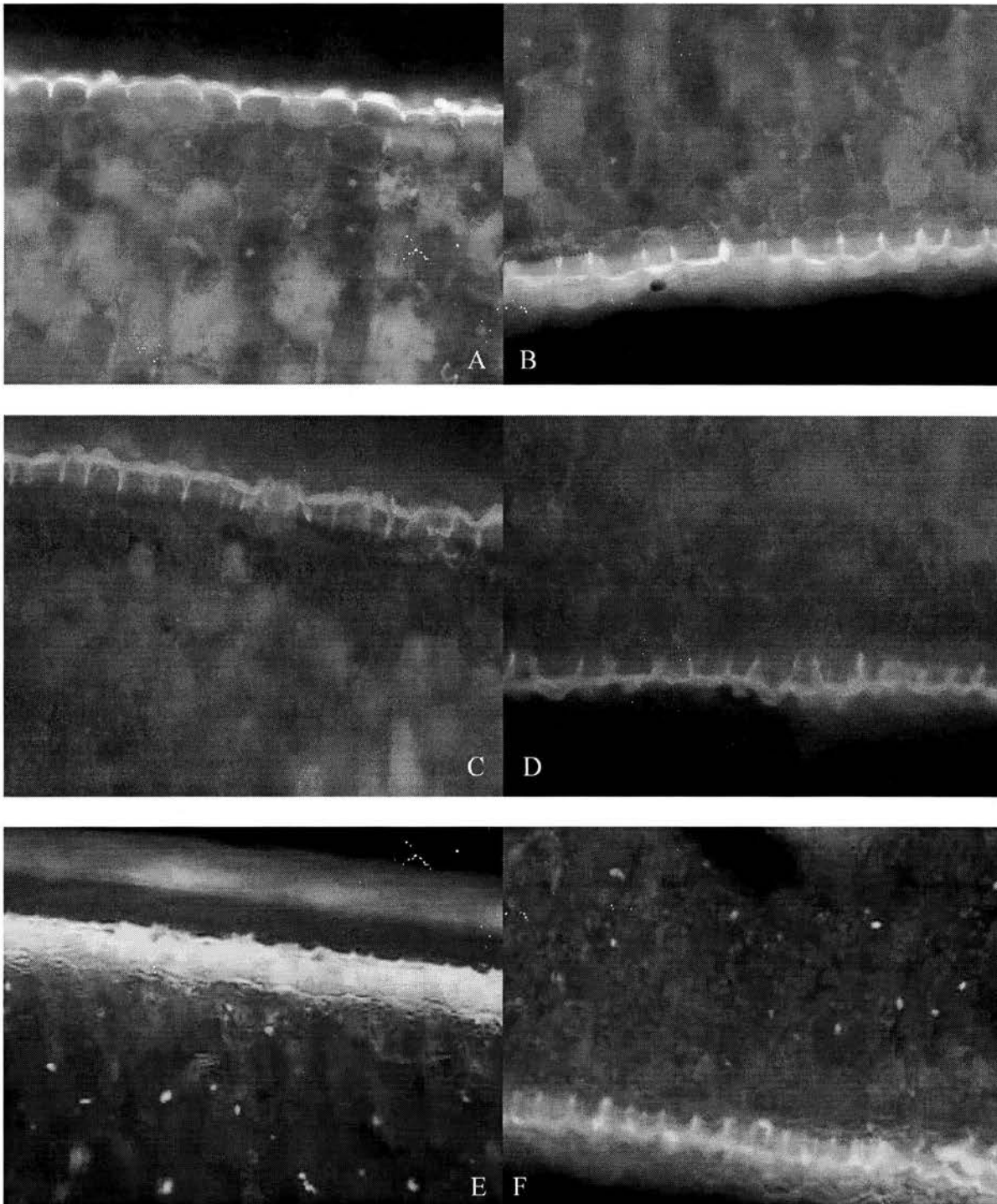


Figura 22. Cortes transversales de las hojas de *A. tequilana* Weber en donde se observa la fluorescencia por la presencia de la 4-aminoacridina (A y B); piranina (C y D); y rodamina B (E y F). Las figuras de la izquierda corresponde al lado donde se le aplico el colorante y las fotografías del lado derecho la parte opuesta del FCH.

Para el análisis cuantitativo de los colorantes los FCH congelados se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido, el polvo se resuspendió en un amortiguador de MES pH 7.0. Se toma la lectura en un fluorómetro la concentración del colorante que había entrado al fragmento de hoja y los resultados se muestran en la figura 23, en la cual se observa que el naranja de acridina es el colorante que más penetra en los fragmentos circulares de hoja ( $8.21 \text{ nM/cm}^2/\text{h}$ ). Después tenemos al Rodamina, Fluoresceína y Bromuro de E. con 3.18, 3.44 y  $3.26 \text{ nM/cm}^2/\text{h}$ . De los colorantes que se encuentran en muy baja cantidad tenemos a Piranina, Amarillo de acridina y calcoflúor: 1.02, 1.27 y  $0.048 \text{ nM/cm}^2/\text{h}$ .

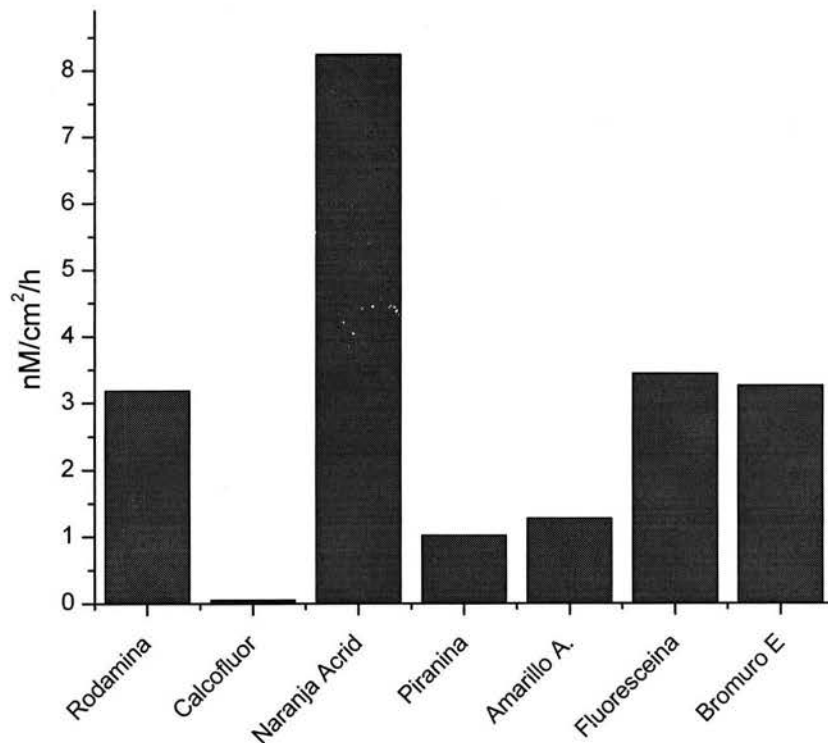


Fig. 23 Permeabilidad de los diferentes colorantes fluorescentes analizados en un periodo de exposición de 5 horas, todos en presencia de Full Extensor.

Otro de los compuestos a estudiar, que atraviese la cutícula fue la Zeatina, esta en una Citoquininas, presente en formulaciones de interés agronómico como el Agromil super (Vademécum, 2002). En conjunto con auxinas las citoquininas induce apertura de estomas, inhibe senescencia hojas, suprime dominancia apical, promueven la división celular y afectan la diferenciación celular en cultivo. Como mencionamos anteriormente no existen trabajos de permeabilidad de compuestos de interés agronómico como es el caso de reguladores del crecimiento.

Al realizar los experimentos de permeabilidad de la zeatina, en fragmentos circulares de hojas, se encontró que la cantidad de zeatina que entra en FCH fue mayor en presencia de Inex y Full Extensor. Sin embargo se compara con la entrada de agua y  $\text{Ca}^{++}$  es mucho menor su entrada. Pese a que es una cantidad muy pequeña de hormona la que atraviesa la capa cuticular la importancia radica en que si atraviese y una de las siguientes preguntas que nos formulamos es si esta cantidad permeabilidad de la zeatina se a diferencia de los colorantes en presencia y ausencia de los tensoactivos seleccionados.

Compuesto	Permeabilidad ( $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ )*		
	Control	Extensor	Inex A
Zeatina	$8 \times 10^{-4}$ *	$1.7 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$
$^3\text{H}_2\text{O}$ □	$8 \times 10^5$	$8.9 \times 10^5$	$8.06 \times 10^5$
$^{45}\text{Ca}$ □	2.3	9.5	6.3

Tabla 24. Permeabilidad de la cutícula de *A. tequilana* Weber, por 5h de exposición de la zeatina comparada con otros compuestos ( □datos tomados de Bautista y Reynaga 2004).

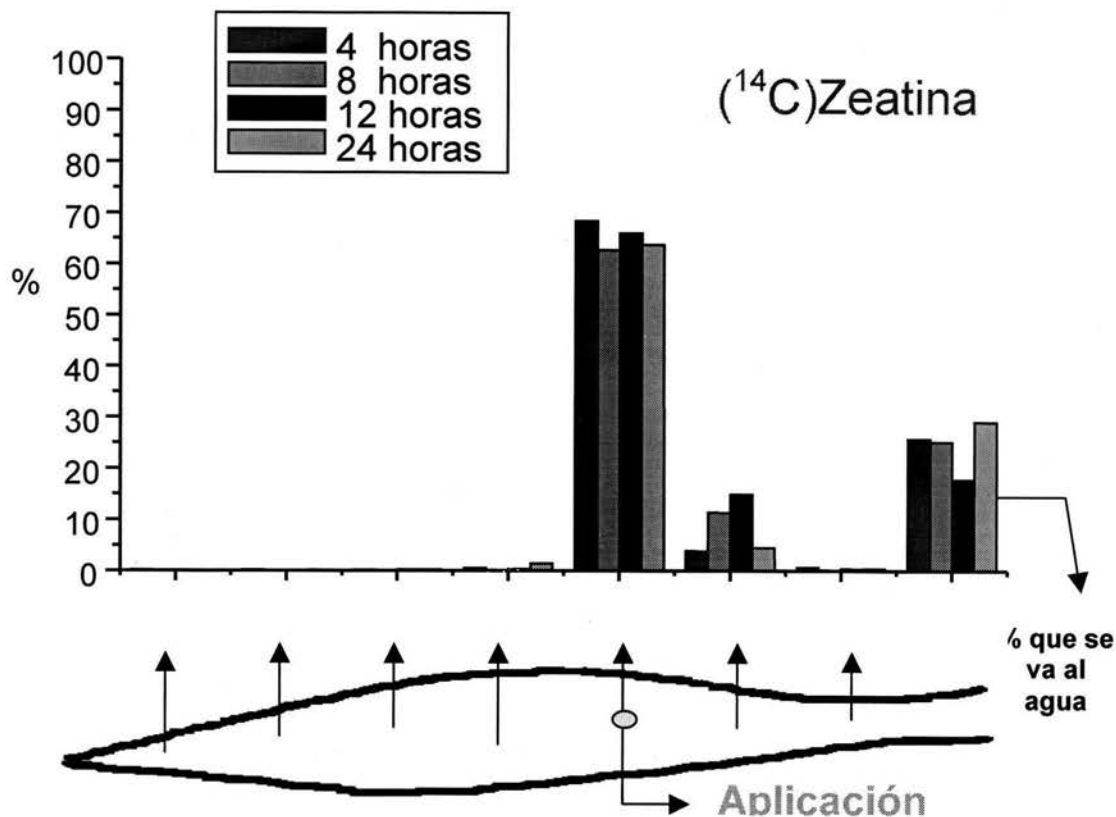


Fig. 24 Porcentaje de incorporación de la marca de zaeatina en diferentes tiempos con una pulso de marca, todos en presencia de Full Extensor.

Como se puede apreciar, la permeabilidad al calcio es mucho menor en comparación con el  $^3\text{H}_2\text{O}$ , el valor de la permeabilidad al  $^3\text{H}_2\text{O}$  es muy bajo comparado con la permeabilidad al  $^3\text{H}_2\text{O}$  que presenta la cutícula aislada de la especie *Jungla Regia* el cual es de  $2 \times 10^7 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (Niederl y cols., 1998), aunque por otro lado puede considerarse un valor normal comparado con la permeabilidad al  $^3\text{H}_2\text{O}$  aplicada por aspersion para varias especies como *Sloanea woolsii* o *Ginkgo biloba*, que reporta un valor de  $0.0138 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  y  $56.4$

$\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  respectivamente (Kerstiens, 1996b). Probablemente la baja permeabilidad de *A. tequilana* es debida a la presencia de una cutícula mas gruesa, al ser una planta que habita en zonas desérticas es importante para la supervivencia el evitar la perdida de agua por la cutícula.

Una variable importante en las aplicaciones foliares es que el componente principio activo llegue al sitio en donde actúa, en el caso de la zeatina, es la piña de la planta. Para lo cual se decidió colocar una gota de la solución de zeatina en la superficie de una hoja y se midió en diferentes tiempos su distribución en la hoja y en el recipiente donde estaba contenida la hoja. Los resultados se muestran en la figura 24, en la cual se observa que un porcentaje importante se queda en la zona de aplicación (70 %) pero sin embargo existe una dirección de movimiento a la base de la hoja importante (20 30 %), es claro que la zeatina aplicada foliarmente en presencia de Full Extensor puede ser utilizada para aplicaciones de interés agronómico con la finalidad de aumentar azúcares importantes en la industria tequilera.

Todo compuesto aplicado a la parte aérea tiene como vía principal de entrada a las hojas, el principio activo del compuesto aplicado vía foliar debe pasar a través de varias estructuras de diferente composición antes de alcanzar el sitio de interés. Dichas estructuras comprenden la cutícula, la pared celular y la membrana plasmática. La cutícula presenta la primera y la mayor barrera a la absorción, sin embargo, la pared celular y la membrana celular pueden también impedir la entrada en alguna medida. Las vías de paso de los compuestos serán favorecidas por la naturaleza química del mismo siendo los compuestos, siendo el simplasto y el apoplasto las rutas alternas. En general los compuestos polares (solubles en agua)

siguen una ruta diferente a los apolares (solubles en solventes orgánicos). La cutícula es una barrera a la penetración de los compuestos polares ya que está formada por la cutina (parcialmente lipofílica y parcialmente hidrofílica) y por las ceras (lipofílicas). Las condiciones ambientales afectan la absorción de los compuestos, sobre todo los hidrofílicos. Bajo condiciones de alta humedad, las gotas se evaporan menos favoreciendo la permanencia de las mismas sobre la hoja. Al mismo tiempo la pectina y las porciones hidrofílicas de la cutina pueden absorber humedad e hincharse separando las láminas de cera abriendo caminos para los compuestos polares. Los compuestos apolares toman la ruta cerosa ya que al ser lipofílicos penetran rápidamente la capa de cera, pasando luego por las porciones lipofílicas de la cutina y por la cera.

Con el presente estudio se conoce mejor la estructura de la epidermis de *A. tequilana* y las estructuras presentes en ella, cutícula y estomas. El conocimiento de la morfología de la epidermis es de vital importancia en estudios de aplicaciones foliares. Se realizaron algunos experimentos de permeabilidad de colorante y hormona sin embargo es necesario profundizar en parámetros que afectan la permeabilidad de compuesto de interés agronómico. Estos resultados indican que las hojas del agave tequilero incorporan pequeñas cantidades de compuesto via foliar, que pueden ser utilizados en el metabolismo de la planta, ayudando de esta manera al desarrollo y sustento de la misma, surgiendo esto como una alternativa para el mejoramiento en los cultivos de *A. tequilana*; este estudio contribuye a investigaciones enfocadas al desarrollo de la industria del tequila.

## Conclusiones:

- La estructura estomática de la cutícula de *Agave tequilana* Weber, aunque corresponde a la general de las plantas, presenta peculiaridades que debían conocerse. Se obtuvo una imagen bastante aproximada de sus características anatómicas, no reportada para esta especie.
- El estoma de *A. tequilana* está constituido por las células oclusivas, un ostiolo, una cámara supraestomática y otra subestomática, así como de las células adjuntas.
- Dado que la separación de la epidermis de la hoja produce la ruptura de las células guarda, para los estudios de la permeabilidad de la cutícula de *Agave tequilana* Weber se descarta la posibilidad de utilizarla aislada, ya que al ser desprendida se observan defectos que corresponden a la pérdida de una parte de las células guarda y de las células subsidiarias.
- El grosor de la cutícula aumenta con la edad de la planta.
- La abundancia de los estomas es mayor en las plantas 1 año, y menor en las plantas de dos años de edad, con una disminución ligera en las de cuatro años.
- Es necesario que los estudios sobre la permeabilidad de la cutícula se realicen con preparaciones uniformes. Las hojas del cogollo y las de la parte intermedia de las plantas de dos años de edad parecen las más adecuadas para estos estudios, pues cuentan con un mayor número de estomas, aunque un mayor grosor de la cutícula. Considerando que la penetración de compuestos del exterior tiene lugar a través de los estomas, este sería el sistema experimental más conveniente.





- Los datos sobre la permeabilidad que se deducen de las tinciones indican que penetran: amarillo de acridina, calcoflúor, bromuro de etidio, fluoresceína, naranja de acridina, piranina y rodamina B, todos ellos colorantes fluorescentes. Salvo la piranina y el calcoflúor, se trata de moléculas hidrofóbicas con carga positiva, pero aún estas, tienen una estructura a base de varios anillos bencénicos, que pudiera deslocalizar la carga de los grupos ionizables.
- El Full Extensor e Inex son los mejores tensoactivos para humectar la superficie de las hojas de *A. tequilana*.
- La concentración mínima de Full Extensor para humectar la hoja fue de 0.125  $\mu\text{l/ml}$ .
- Los tensoactivos alteran la morfología de las ceras epicuticulares, en hojas del cogollo.
- El uso de Full Extensor favorece la entrada de la Zeatina
- La Zeatina se mueve en dirección basal de la hoja.



## BIBLIOGRAFÍA

Acosta Zamudio, Carlos, 1991. Mecanismos de absorción foliar de nutrimentos. Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Difusión Cultural. 56 pp.

Aguilar Becerril G. 1980. Tesis Licenciatura. Efecto de varios reguladores del crecimiento en Nopal Tunero (*Opuntia amyoclea*). Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Edo de México.

Aguilar Becerril G. 1987. Tesis Maestro en Ciencias. Efecto de la aplicación del ácido giberélico (AG3) y la urea en fruto de nopal (*Opuntia amyoclea*). Colegio de postgraduados Centro de Fruticultura, Montecillos, Edo de México.

Arrizon, J. and Gschaedler, A. 2002. Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Canadian Journal of Microbiology*, Nov2002, Vol. 48 Issue 11, p965.

Azcon B.J. y Talón M. 2000. Fundamentos de Fisiología vegetal. McGraww-Hill/ Interamericana. Barcelona España. 522 pp.

Bañuls J., Quiñones A., Martín B., Primo-Millo E. y Legaz F., 2001. Efecto complementario de la aplicación foliar de nitrato potásico sobre la nutrición del potasio y la calidad del fruto en *Citrus clementine*. *Levante Agrícola* 4: 368-376.

Barreiro P. M. 2000. Pencas que abrazan al mundo. *Claridades agropecuarias* Vol. 87: 3-30.

Barthlott W., Neinhuis C., Cutler D., Ditsch F., Meusel I., Theisen I. and Wilhelmi H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 237-260.

Baur P. Schonherr J. and Terence G., 1999. Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. 2: Separation of effects on driving force and mobility and reversibility of surfactant Action. *Pesticide Science Pestic Sci* 55:831-842.

Bautista B., y Reynaga I., 2003. Tesis Licenciatura (Químico de Alimentos) Estudio de la Permeabilidad a iones de la cutícula de *Agave tequilana* Weber. Universidad Autónoma de México, Facultad de Química, Mexico D.F.

Benavides-Mendoza, A., J. Garnica-Serna, A. Michtchenko, C. Hernández-Aguilar, H. Ramírez-Rodríguez, J. Hernández-Dávila, V. Robledo-Torres., 2003. Respuesta al estrés y crecimiento de plántulas cuyas semillas fueron irradiadas con láser de baja intensidad. *AGROFAZ* 3:269-272, Publicación Semestral de Investigación Científica ISBN 968-6404-50-3.



Blanco Arreola, Salvador. 1987. Tesis Licenciatura (Ingeniero Agrícola). Efecto de algunos reguladores de crecimiento sobre el enraizamiento en hijuelos de agave tequilero (*Agave tequilana*, W.). Universidad Autónoma de Guadalajara, Escuela de Ingeniería Agrícola. Guadalajara, Jal. México.

Bukovac MJ and Petracek P.D., 1993. Characterizing pesticide and surfactant penetration with isolated plant cuticles. *Pesticide Science* 37, 179–194.

Burghardt M. and Riederer M., 2003. Ecophysiological relevance of cuticular transpiration of deciduous and evergreen plants in relation to stomatal closure and leaf water potential. *Journal of Experimental Botany*, 54, 389:1941-1949.

Casado C. G. and Heredia A. 2001. Specific heat determination of plant barrier lipophilic components: biological implications. *Biochimica et Biophysica Acta* 1511, 291-296.

Chen L., Li C., Chaloner W., Beerling D.J., Sun Q., Collinson M., and Mitchell P., 2001. Assessing the potential for the stomatal characters of extant and fossil Ginkgo leaves to signal atmospheric CO<sub>2</sub> change. *American Journal Botany* 88: 1309-1315.

Clouse, S.D., Brassinosteroids (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/>

Croxdale J., 2001. Stomata. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, [www.els.net](http://www.els.net).

Curiel Navarro, Fernando. 1994. Tesis Licenciatura (Ingeniero Mecánico Electricista). Mejoramiento del proceso de extracción del jugo de agave en las industrias tequileras y mezcalera. Universidad Panamericana, Escuela de Ingeniería. México.

Edwards D, Kerp H and Hass H., 1998. Stomata in early land plants: an anatomical and ecophysiological approach. *Journal of Experimental Botany* 49: 255–278.

Fahn A. 1990. *Plant Anatomy*. Pergamon Press New York. 144 pp.

Falk R.H., 1994. Influence of formulation and adjuvants on the foliar location and physical form of the Active ingredient. En *Interaction between adjuvants agrochemical and target organisms*. Holloway P.J., Rees R., Stock D., Spring Verlag 195 pp.

Fernández S., Osorio S. and Heredia A. 1999. Monitoring and visualising plant cuticles by confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 789-794.

Flores-Vindas E. M. 1999. *La planta estructura y Función*. Libro Universitario Regional. Cartago Costa Rica. 367 pp.



García-Mendoza, A. 1995. "Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México", en Linares, E., P. Dávila, F. Chiang, R. Bye, y T. Elias (comps.), Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM, México, 1995, pp. 51-75.

García Mendoza A. 1998. Con sabor a maguey. Guía de la colección Nacional de Agavaceas y Nonlinaceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM, 114 pp

Gentry H. and Sauck J. The stomatal complex in Agave: Group Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. Proceedings of the California Academy of Sciences Vol XLI, 371-387 (1978).

Gil Vega K.; Gonzalez Chavira M.; Martinez de la Vega O.; Simpson J.; Vandemark G. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. Euphytica Kluwer Academic Publishers. Vol. 119:3:335-441.

Glover, B. J., 2001. Epidermis. Encyclopedia of life sciences / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net

Glover, B. J., 2002. Differentiation in plant epidermal cells. Journal of Experimental Botany 51: 344: 497-505.

Hennig G.S. and Wirth W., 2000. Changes in the biosynthesis of epicuticular waxes in maize and their influence on wetting properties. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1:105-125.

Hernández Valencia R.E.M., López Franco R., Ruiz Ordóñez J. y Benavides Mendoza A. Ultraestructura Estomática en *Agave tequilana* Weber (Amaryllidaceae). XXXII Congreso de Investigación y Extensión. ITESM (2002).

Hernández-Valencia, R.E.M., R. López-Franco, A. Benavides-Mendoza. 2003. Micromorfología de la epidermis foliar de *Agave tequilana* Weber. AGROFAZ 3(2):387-396. Publicación Semestral de Investigación Científica ISBN 968-6404-65-13.

Holloway P.J. 1994. Physicochemical Factors Influencing the Adjuvants –enhanced Spray Deposition and Coverege of Foliage Apliedd Agrochemicals. En Interactions between adjuvants agrochemicals and target organisms. Ernst Schering Research Foundation Workshop 12, Springer Verlag Berlin. 195 pp.

Iñiguez-Covarrubias G., R. Díaz-Teres, R. Sanjuan-Dueñas, J. Anzaldo-Hernández and Roger M. Rowell 2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves, Bioresource Technology, Volume 77, Issue 2, April 2001, Pages 101-108

Jeffree C.E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. En Kerstiens G. 1996. Plant cuticles an integrated functional approach. Environmental Plant Biology series



- Jetter R., Schaffer S. and Riederer M. 2000. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus*. *Plant Cell Environment* 23, 619-628.
- Jiménez, J., Macarulla, J. 1989. *Fisicoquímica Fisiológica*. Mc Graw-Hill 6ª edic., Madrid, España, Cap 10.
- Kerstiens G. 1996. Plant cuticles an integrated functional approach. *Environmental Plant Biology series*.
- Kerstiens G, 1996b. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47: 1813-1832.
- Kerstiens G, 2001. Plant Cuticle. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, [www.els.net](http://www.els.net).
- Kirkwood P. 1999. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pestic Sci* 55:69-77.
- Kirsch T., Kaffarnik F., Riederer M. and Schreiber L. 1997. Cuticular permeability of the tree species *Prunus laurocerasus* L., *Ginkgo biloba* L. and *Juglans regia* L: comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *Journal Experimental Botany Vol 48* 310: 1035-1045.
- Kolattukudy P.E., 1996. Biosynthetic pathway of cutis and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. En Kerstiens G. 1996. *Plant cuticles an integrated functional approach*. *Environmental Plant Biology series*.
- Kunts L. and Samuels A.L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant wax. *Progress en lipid reseach* 42: 51-80.
- Lack A.J. and Evans D.E. 2001. *Plant biology*. Springer Verlag, New York, United State of America. 121 pp.
- Lake J., Quick W., Beerling D. and Woodward F., 2001. Signals from mature to new leaves. *Nature* 411: 154.
- Larcher W. 1999. *Physiological Plant Ecology*. Springer . New York, United State of America. Pp
- Linton, Matthew J.; Nobel, Park S. 2001. Hydraulic conductivity, xylem cavitation, and water potential for succulent leaves of agave deserti and agave tequilana. *International Journal of Plant Sciences*, Jul 2001, Vol. 162 Issue 4, p747.
- Llanos López, José Humberto. 1983. Tesis Licenciatura (Ingeniero Químico. Obtención de pulpa de celulosa a partir de la penca del Agave tequilana. Universidad Autónoma de Guadalajara, Escuela de Ciencias Químicas. Guadalajara, Jal. México.



Meister M.H. and Bolhar H.R., 2001. Stomata Imprints. En Reigosa R. 2001. Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Kluwer Academia Publishers. Netherlands. pp 235-250.

Murguía Rosete, María Esperanza. 1960. Tesis Licenciatura (Químico). Acetificación de azúcares del Agave tequilana. UNAM, Facultad de Química

Nakata P.A., 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164: 901-909.

Navarro Bravo, Alvaro. 1987. Tesis Licenciatura (Ingeniero Químico). Optimización de pulpa para papel a partir de la fibra del Agave tequilana por el método peroxi-alcalino. Universidad Autónoma de Guadalajara, Escuela de Ciencias Químicas. Guadalajara, Jal. México.

Niederl, S., Kirsch, T., Riederer, M., Schreiber, L. 1998. Co-permeability of <sup>3</sup>H-labeled water and <sup>14</sup>C-labeled organic acids across isolated plant cuticles. *Plant Physiol.* 116: 117-123.

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.

Nobel P.S.; Castaneda M.; North G.; Pimienta-Barrios E.; Ruiz. A. 1998. Temperature influences on leaf CO<sub>2</sub> exchange, cell viability and cultivation range for Agave tequilana. *Journal of Arid Environments (Academic Press)*. 1998:39:1:1-9.

Nobel Park S; Pimienta-Barrios Eulogio; Zanudo Hernández Julia; Ramírez-Hernández Blanca. 2002. Historical aspects and net CO<sub>2</sub> uptake for cultivated Crassulacean acid metabolism plants in Mexico. *Annals of Applied Biology (Association of Applied Biologists)*. 2002: 140: 2: 133-142.

Pearse A.G. 1960, *Histoquímica*. Editorial Aguilar, España. 587pp.

Penner D. Burow R. and Roggenbuck F., 1999. Use of organosilicone surfactants as agrochemical adjuvants. En, *Silicon Surfactants*. Randal M Hill Ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA, 360 pp.

Pesacrea T. Hasenstein K. The internal cuticle of *Cirsium horridulum* (Asteraceae) leaves. *American Journal of Botany* 86, 923-928 (1999).

Prychid C.J. and Rudall P., 1999. Calcium Oxalate Crystals in Monocotyledons: a Review of their Structure and Systematics 84: 725-739.



Reynosa Lara, Elvis Mayolo 1987. Tesis Licenciatura (Ingeniero Agrícola). Efecto de métodos de corte y reguladores del crecimiento en el enraizamiento de hijuelos de agave (*Agave tequilana*, W). Universidad Autónoma de Guadalajara, Escuela de Ingeniería Agrícola. Universidad Autónoma de Guadalajara. Guadalajara, Jal. México.

Rivera Cazares, Juan.1983. Tesis Licenciatura (Biólogo). Estudio citogenética y fitogeogeografico de *Agave tequilana* y *A. kaywinskii*, zucc. en los Valles de Tehuacan, Puebla y centrales de Oaxaca, México. UNAM, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. México.

Rodríguez-Aranda, F.J., A. Benavides-Mendoza, J.J. Galván-Luna, H. Ramírez-Rodríguez, 2002. Cambios en la absorción de minerales y anatomía epidérmica de manzano al aplicar ácidos orgánicos. XIX Congreso Nacional de Fitogenética. Saltillo, Coah., p. 74. ISBN 968-839-314-2.

Rodríguez Garcia Cecilia Monica, 1990. Tesis Maestro en Ciencias. Reguladores del crecimiento X: Efecto de la aspirina y giberelina en *Opuntia amyclaea*. Colegio de postgraduados Centro de Botanica, Montecillos, Edo de México.

Rojas G. M. y Robalo M., 1979. Fisiología Vegetal Aplicada. Ed. Limusa. México, D.F. 261 pp.

Ruvalcaba-Ruiz D. and Rodríguez-Garay B. 2002. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. Azul. BMC Plant Biology 2002 2:10

Ruvalcaba-Ruiz Domingo and Rodríguez-Garay Benjamín. 2002. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. Azul. BMC Plant Biology 2002 2:10.

Salinas, Maria Lorenza; Ogura, Tetsuya; Soffchi, Luis. 2001. Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals, raphides, in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. Contact Dermatitis, Feb 2001, Vol. 44 Issue 2, p94.

Santamaria J., Davies W. and Atkinson C.J., 1993. Stomata of Micropropagated *Delphinium* Plants Respond to ABA, CO<sup>2</sup>, Ligth and Water Potential, but Fail to close Fully. Journal of Experimental Botany 258: 99- 107.

Schreiber, L, Kirch and Reiderer M. Diffusion through cuticles: principles and models. En Kerstiens G. 1996. Plant cuticles an integrated functional approach. Environmental Plant Biology series.

Schönherr J and Baur P, 1994. Modelling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rates of penetration. Pestic Sci 42:185-208.



- Schönherr, J. 2000. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta* 212:112-118.
- Schönherr J. and Luber M. 2001. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant and Soil* 236: 117–122.
- Schönherr J., Baur P. and B.A. Uhlig B.A., 2000. Rates of cuticular penetration of 1-naphthylacetic acid (NAA) as affected by adjuvants, temperature, humidity and water quality. *Plant Growth Regulation* 31: 61–74.
- Schoettle, A.W., and Rochelle S.G., 2000. Morphological variation of *Pinus flexilis* (Pinaceae), a bird disperse pine, across a range of elevations. *Am. J. Bot.* 87:1797-1806.
- Shu Z., Wu W., Oberly G., and Cary E., 1994. Permeability of peach leaf cuticles to boron. *Journal of plant nutrition* 17: 1231-1242
- Tambutti Allende M.I. 2002. Tesis Licenciatura. Diversidad del Genero Agave en México: una síntesis para su conservación. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Departamento Biología, Ciudad Universitaria, México DF.
- Tucker S.C., 1974 Dedifferentiated guard cell in magnoliaceous leaves. *Science* 185; 445-447.
- Urzúa S. F. 2002. Pruebas de campo con surfactantes. SILCA II - 2nd Ibero American Agricultural Adjuvant Symposium. Mexico City October 3-4, 2002
- Vaca-Garcia C. and M. E. Borredon.1999. Solvent-free fatty acylation of cellulose and lignocellulosic wastes. Part 2: reactions with fatty acids, *Bioresource Technology*, Volume 70, Issue 2, November 1999, Pages 135-142
- Vademécum Agrícola IPE, 2002. Agroquímicos y semillas. Rezza Editores, 3a edic., León Guanajuato, México.
- Valenzuela, Z. 1994. El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Monsanto. Agata México, Zapopan Jalisco.
- Velásquez González, Beatriz. 1955. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). Identificación de glucidas en el maguey tequilero agave tequilana, por cromatografía. Universidad Nacional Autónoma de México. DF. México. UNAM, Facultad de Química. DF. México.
- 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.dradalbertobenavides.com/estomajo.htm>. (consultado el 30 de junio del 2003.)





Villagrán P. Contribución al conocimiento de la Histología y citología del Maguey (agave), Anales del Instituto de Biología 10, 1-18 (1939).

Wattendorff J. and Holloway P.J, 1980. Studies on the Ultrastructure and Histochemistry of Plant Cuticles: The Cuticular membrane of *Agave americana* L. in situ. Ann. Bot. 46, 13-28

Wattendorff J. and Holloway P.J.,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. Ann. Bot. 49: 769-804.

White A.D., Heaverlo C.A., Owen M.D.K., 2002. Evaluation of methods of quantify herbicide penetration in leaves. Weed Technology 16; 37-42.

Willmer C. M., 1996. Stomata. Longmann Group Limited. 375 pp.

Woodhouse R., Williams J.G. and Nobel P. Leaf Orientation, radiation interception and nocturnal acidity increases by the CAM plant *Agave deserti* (Agavaceae). Amer J. Bot. 67, 1179-1185 (1980).

Yepiz Gómez, Ma. Antonieta.1990. Tesis Licenciatura (Ingeniero Químico). Concentración de ácido clorhídrico y tiempo de reflujó, variables a optimizar en la hidrólisis de pulpa celulósica obtenida de pencas de Agave tequilana. Universidad de Sonora, Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia. Hermosillo, Son. México.

Young, C.1951. Agentes tensoactivos: Aspectos teóricos y aplicaciones industriales. Aguilar., 1ª edic., Madrid España. 398 pp.

Zelling G, Peters J., Jiménez M.S., Dorales D., Grill D. and Perkold A. Three Dimensional Reconstruction of the Stomatal Complex in *Pinus canariensis* Needles Using Serial Sections. Plant Biol 4, 70-76 (2002).



## Sitios consultados

Academia Mexicana del Tequila

<http://www.acamextequila.com/amt3/index1024.html>  
(12-Marzo-2003).

Australian New Crops. Listing of Useful Plants of the World

<http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/agavetequilana.htm> (1-Agosto-2003)

Bancomext, <http://www.bancomext.com/Banc/publicaciones/secciones/2626/AnexoEstadenero2003.pdf> (3-Agosto, 2003).

Consejo Regulador del Tequila CRT <http://www.crt.org.mx/> (28-Feb-2003).

NOM-006-SCFI-1994 Bebidas alcohólicas - Tequila - Especificaciones. (Contiene dos modificaciones) <http://www.economia.gob.mx>, (2003).

Reina, J., Borraz, Y., Ceras epicuticulares en el reino vegetal: química ultraestructura y aspectos evolutivos.

<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS43/ceras.html>  
(26-julio-2003).

Unda T., Tensoactivos, Fenómenos de superficie y equilibrios de interfase <http://depa.pquim.unam.mx/~tunda/humectación.html> (13-mayo-2003).

