

## Caracterización de la lámina foliar de plantas de *Agave fourcroydes* Lem. obtenidas por propagación asexual

Maryla Sosa del Castillo<sup>1\*</sup>, Silvia Alemán García<sup>1</sup>, Yunel Pérez Hernández<sup>1</sup>, Enildo Abreu Cruz<sup>1</sup>, Daynet Sosa del Castillo<sup>2</sup>, Gerardo González Oramas<sup>1</sup>. \*Autora para correspondencia

<sup>1</sup>Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Autopista a Varadero km 3½. Matanzas. Cuba. e-mail: maryla.sosa@umcc.cu

<sup>2</sup>Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Baruta. Caracas. 1080 Estado de Miranda. Venezuela.

### RESUMEN

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es un cultivo de gran importancia económica. Este trabajo se propuso caracterizar la lámina foliar de plantas de la variedad 'Sac Ki' o henequén blanco obtenidas por métodos de propagación asexual. Se emplearon plantas cultivadas *in vitro*, hijos de bulbillos de plantas *in vitro*, hijos de rizomas de plantas *in vitro*, hijos de bulbillos de plantas de campo e hijos de rizomas de plantas de campo. A los 7 y 15 meses de plantadas en vivero se caracterizó la epidermis a través del índice estomático y la densidad estomática. Además, se caracterizaron los haces conductores y paquetes de fibras en el mesófilo de la hoja. Se comprobó que la lámina foliar de plantas de henequén variedad 'Sac Ki' obtenidas por diferentes métodos de propagación asexual presentaron estructuras anatómicas similares. Sin embargo, se observó que las plantas cultivadas *in vitro* se diferenciaron del resto en cuanto al índice estomático y la densidad estomática en los dos momentos de evaluación lo cual sugiere un acomodo a las condiciones ambientales.

Palabras clave: densidad estomática, índice estomático, plantas *in vitro*

## Characterization of leaf area of *Agave fourcroydes* Lem. plants obtained from asexual propagation

### ABSTRACT

The henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) is a crop of great economic importance. This study was aimed to characterize the leaf surface of henequen plants variety 'Sac Ki' obtained by asexual propagation methods. *In vitro* plants, shoots of bulbils of *in vitro* plants, shoots of rhizomes of *in vitro* plants, shoots of bulbils of field plants and shoots of field rhizomes were used. At 7 and 15 months after planting in the nursery, the epidermis was characterized through the stomatal index and stomatal density. Moreover, the conductor vessels and fiber bundles in leaf mesophyll, were characterized. It was found that the leaf surface of henequen plants variety 'Sac Ki' obtained by different methods of asexual propagation showed similar anatomical structures. However, it was observed that *in vitro* plants were different from the rest in terms of stomatal index and stomatal density in both time points. It was suggesting a accommodate response to environmental conditions.

Key words: stomatic density, stomatic index, *in vitro* plants

### INTRODUCCIÓN

El henequén *Agave fourcroydes* Lem. es una especie perenne de propagación vegetativa, altamente productiva en áreas ecológicas limitantes por la escasez de agua y suelo (Garriga *et al.*, 2006). Tiene además alto potencial de uso como fuente de productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus saponinas (González *et al.*, 2003) y celulosa a partir de su fibra (Abreu *et al.*, 2007).

La ampliación de los mercados y las tendencias actuales, entre las que se destaca la conservación del ambiente, ofrecerán nuevos nichos de oportunidades para algunos cultivos. El henequén no es la excepción a esta situación y su futuro dependerá en gran parte de que pueda ser cultivado de manera más eficiente y con mayores beneficios económicos (Garriga *et al.*, 2010).

La propagación del henequén se realiza mediante la reproducción sexual por semillas

y asexualmente, por medio de los retoños producidos por los rizomas (hijos basales) y por bulbillos (yemas aéreas encontradas en el escape floral) (González *et al.*, 2011). Otra forma de propagación asexual es el uso de las técnicas de cultivo *in vitro* (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1997; González *et al.*, 2007).

En las plantas obtenidas *in vitro* se han observado cambios en la anatomía de las hojas, tales como: un reducido desarrollo de la cutícula, cierre estomático anormal (Pospósilová *et al.*, 1999), alta densidad estomática (Santamaría *et al.*, 1995) y ausencia o reducido desarrollo de las células de empalizada (Dami y Hughes, 1995), los cuales conllevan a la incapacidad de las plántulas de controlar las pérdidas de agua después de ser transferidas a condiciones *ex vitro*. No obstante, en estudios realizados en *Agave tequilana* (Weber) Santamaría *et al.* (1995) refirieron que el cultivo *in vitro* no afectó la capacidad de las hojas de controlar las pérdidas de agua ni alteró la apertura estomática. Los estudios sobre características anatómicas de las hojas de plantas de henequén obtenidas por cultivo *in vitro* son escasos.

Según Días (1993) las plantas obtenidas a partir de bulbillos e hijos de rizomas de plantas propagadas convencionalmente necesitaron menos tiempo (20 meses) para alcanzar 35-40 cm de altura (talla para ir a plantación comercial), que las provenientes de plantas cultivadas *in vitro* (28 meses). Por otra parte Peña *et al.* (1997) indicaron que el enraizamiento y desarrollo de hijos de rizomas de las plantas propagadas convencionalmente se comportaba de forma lenta. Por ello, todas estas vías de producir plantas de henequén requieren ser evaluadas para su empleo racional.

La transpiración y la intensidad de la respiración están en razón directa al número y apertura de los estomas y como las hojas son los principales órganos de las plantas donde se realiza la fotosíntesis, el número y distribución de los estomas influye directamente sobre la asimilación clorofílica. Roth *et al.* (1986) plantearon que en los estudios relacionados con la anatomía foliar, se deben considerar características anatómicas individuales tales como el índice estomático (IE) y la densidad estomática (DE) pues ambos están

influenciados por las condiciones ambientales y nutricionales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes este trabajo se propuso caracterizar la lámina foliar de plantas de henequén obtenidas por métodos de propagación asexual lo cual puede contribuir al conocimiento de sus características en el establecimiento de viveros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el vivero de la Granja La Conchita perteneciente a la Empresa Henequenera de Matanzas Eladio Hernández y en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. La preparación del material vegetal para la microscopía óptica se realizó en los laboratorios del IDEA y el INIA (Venezuela).

### *Material vegetal*

Se utilizaron plantas de henequén de la variedad 'Sac Ki' o henequén blanco denominada Línea 4 según evaluación molecular realizada por González *et al.* (2003), provenientes del banco de germoplasma de la Empresa Henequenera de Matanzas Eladio Hernández. Se conformaron cinco grupos según el origen del material vegetal: plantas cultivadas *in vitro* (V), hijos de bulbillos de plantas *in vitro* (BV), hijos de rizomas de plantas *in vitro* (RV), hijos de bulbillos de plantas de campo (BPC) e hijos de rizomas de plantas de campo (RPC). Las plantas empleadas se caracterizaron por mostrar un adecuado estado fisiológico y fitosanitario. Las plantas *in vitro* tenían 30 días de aclimatización y un mes en condiciones semi controladas (plena luz solar y riego) en la cual se mantuvieron también las plantas obtenidas a partir de rizomas y bulbillos para garantizar su correcto enraizamiento.

Como sustrato en los canteros se empleó pulpa de henequén descompuesta con 12% (m/m) de materia orgánica hasta una profundidad de 20 cm, donde se plantaron los distintos tipos de material vegetal. Se distribuyeron 400 plantas en cuatro parcelas diferentes, en las cuales se plantaron 20 individuos de cada tipo de material vegetal (100 plantas por parcela). El área estuvo ubicada a 20 msnm. Las evaluaciones se realizaron a los 7 meses periodo en que las plantas deben alcanzar la altura para

iniciar su establecimiento en los viveros y a los 15 meses cuando presentan de 40 a 50 cm, para ser llevadas a plantación comercial. De cada planta se seleccionó la primera hoja.

#### Caracterización de la epidermis

Para la caracterización anatómica de la epidermis se realizaron desprendimientos por la técnica de maceración en hidróxido de potasio al 3.0% (m/v) descrita por Rodés y Collazo (2006), hasta la separación de la epidermis. Para ello se seleccionaron porciones de aproximadamente 1.5 cm<sup>2</sup> de la zona central de la hoja más desarrollada en expansión, tanto de la superficie adaxial como abaxial y se evaluaron 10 campos por muestra a cinco hojas de cada tipo de material vegetal. Para la observación se utilizó un microscopio de contraste de fase (Olympus B), a un aumento de 400x y se tomaron microfotografías de las muestras.

El Índice Estomático (IE) se determinó utilizando la fórmula de Salisbury sugerida por Wilkinson (1979):

$$\text{Índice Estomático} = \frac{\text{NE}}{\text{NCE} + \text{NE}} \times 100$$

en la cual, NE es el número de estomas por campo de observación y NCE es el número de células epidérmicas típicas en el campo de observación.

La Densidad Estomática (DE) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad Estomática} = \frac{\text{Número estomas por campo}}{\text{Área del campo}} \quad (\text{estomas}/\mu\text{m}^2)$$

Dónde:

$$\text{Área del campo}_4 (\mu\text{m}^2) = (\text{Número de divisiones del diámetro} \times 10)^2$$

#### Caracterización de haces conductores y paquetes de fibras en el mesófilo de la hoja

Para el estudio del mesófilo las muestras se fijaron en solución FAA y fueron lavadas con agua destilada previo a realizar cortes transversales de la parte media de la lámina foliar (8 μm), con un micrótopo de congelación (Leica CM 1850) y se montaron en agua: glicerina (v/v), para la obtención de láminas semipermanentes. Por cada tipo de material vegetal se observaron cinco muestras en un microscopio óptico (Leica

con aumento de 400x y las imágenes se capturaron y procesaron con el programa Micrometrics SE Premium.

Los datos fueron procesados según el paquete Statgraphic plus 5.1. Se determinó el ajuste a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett. Se aplicó ANOVA de clasificación simple y la prueba de Duncan para comparación de medias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La epidermis en las hojas de los materiales vegetales analizados resultó ser del tipo anfiestomática que presenta estomas tanto por la superficie adaxial como abaxial (Figura 1). Se observaron células epidérmicas típicas de forma poligonal, aparato estomático constituido por cuatro células anexas asociadas a las células oclusivas del tipo tetracítico (Figura 2), con una cámara supraestomática y subestomática similar a la descrita en *A. fourcroydes*, *A. tequilana*, *A. americana*, *A. salamina*, *A. angustifolia* y *A. victoriana reginae*, con paredes celulares engrosadas, de cutícula gruesa característico de especies de ambientes xerófitos como lo es el género *Agave* (Álvarez de Zaya, 2009). Se observó que se desarrollaban primero las células anexas antes de las oclusivas, aspecto este no referido en los estudios de epidermis para *Agavaceae*.

La presencia de estomas en ambas epidermis es característico de plantas de ambientes secos (Roth, 1992).

Los cortes transversales al mesófilo (Figura 3) mostraron para todos los tipos de material vegetal una estructura isolateral con parénquima en empalizada por ambas superficies, caracterizada por células alargadas, isodiamétricas, dispuestas transversalmente de manera ordenada, con abundantes cloroplastos y un parénquima lagunar esponjoso con células irregulares, escasos o ausentes cloroplastos y amplios espacios intercelulares. Los haces colaterales se observaron cerrados situados hacia el centro del mesófilo y paquetes de fibras hacia la superficie adaxial en mayor número que hacia la abaxial en disposición de zigzag con respecto a los haces conductores. La epidermis superior e inferior se observó monoestratificada.

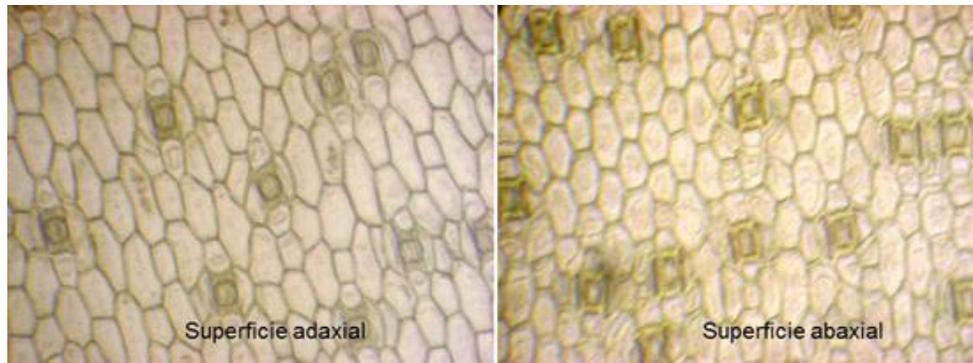


Figura 1. Células epidérmicas de bulbillo de planta *in vitro* (15 meses de cultivo) de *A. fourcroydes* Lem. superficie adaxial y abaxial. Aumento 100x.

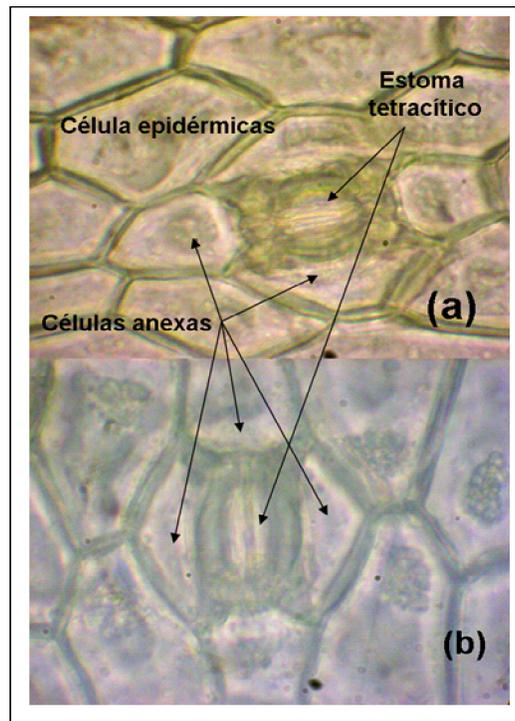


Figura 2. Epidermis de bulbillo de plantas obtenidas *in vitro* (15 meses de cultivo) de *A. fourcroydes* Lem. (a) superficie adaxial, (b) superficie abaxial. Aumento 400x.

En todos los tipos de material vegetal se observaron paquetes de fibras en el área floemática, aspecto característico de esta especie según lo descrito por Macía (2006). Las fibras están asociadas con los haces conductores donde aparecen como cordones independientes en el mesófilo formando paquetes de fibras (Figura 3 c y d).

Una comparación de ambas superficies de la hoja, entre los diferentes tipos de material vegetal, a los 7 meses, mostró un mayor IE

(Tabla 1) en plantas *in vitro*, valor el cual diferenció significativamente del resto de los tratamientos. Por otra parte, a los 15 meses de cultivo en ambas superficies se encontró un incremento del IE excepto para plantas *in vitro* que fue significativamente inferior.

En este sentido, Schoch *et al.* (1980) refirieron que el índice estomático está en función de la radiación recibida y de las variaciones que experimenta durante los días precedentes a la diferenciación de los estomas de la hoja. En tal

sentido ello sugiere, que el cambio de condiciones, indujo a la respuesta diferencial de las plantas *in vitro* que en el primer momento de evaluación (7 meses) presentaron el mayor IE y posteriormente (15 meses) el menor valor de IE. Esta variable representa el cociente entre el número de estomas y la cantidad de células epidérmicas por superficie foliar, y puede variar dentro de la misma hoja según la parte del limbo que se analice (ápice, media o base), posición de la hoja en la planta y también del ambiente ecológico, el cual puede ejercer cierta influencia sobre este carácter (Roth *et al.*, 1986).

La evaluación de ambas superficies de la hoja, en los diferentes tipos de material vegetal reveló a los 7 meses, una mayor DE (Tabla 2) en las plantas *in vitro*, que se diferenció significativamente del resto de los tratamientos. Por otra parte, a los 15 meses en la superficie adaxial se encontró un comportamiento similar al observado para IE. En la superficie abaxial los mayores valores de DE se produjeron en BV y RV los cuales, no se diferenciaron significativamente entre ellos, pero sí del resto. El valor significativamente más bajo se obtuvo en las plantas *in vitro*.

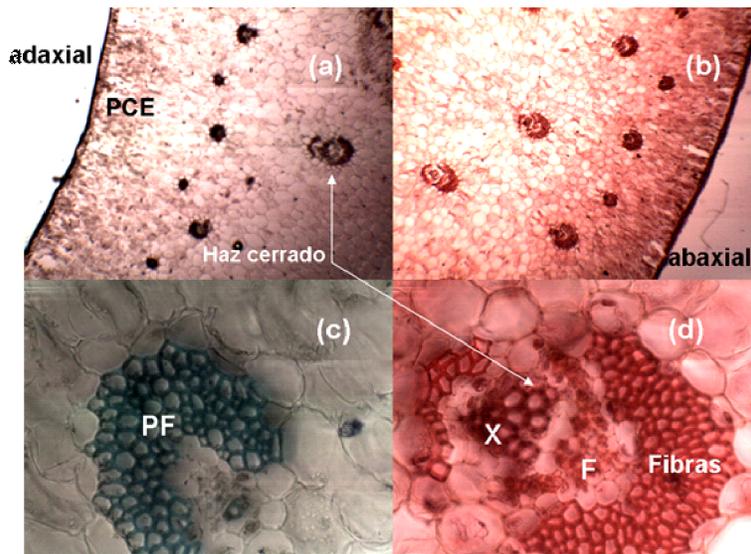


Figura 3. Características del mesófilo en hijo de rizoma de plantas *in vitro* (15 meses de cultivo) de *A. fourcroydes* Lem. (a) y (b) Aumento 100X; (c) y (d) Aumento 400x. PCE (Parénquima Clorofílica Empalizada); PF (Paquete Fibra); X (xilema); F (floema).

Tabla 1. Índice estomático en la epidermis de láminas foliares de plantas de henequén propagadas por diferentes métodos.

Material vegetal	Índice estomático			
	Superficie adaxial		Superficie abaxial	
	7 meses	15 meses	7 meses	15 meses
RPC	15.65 ± 3.99 b	21.53 ± 4.50 a	15.51 ± 5.28 b	23.72 ± 4.46 a
BV	14.17 ± 4.88 b	21.90 ± 4.38 a	15.32 ± 2.74 b	22.49 ± 6.13 a
V	20.88 ± 5.69 a	13.24 ± 2.90 b	22.14 ± 5.39 a	15.08 ± 5.50 b
RV	14.49 ± 4.51 b	22.47 ± 3.63 a	15.15 ± 8.75 b	24.41 ± 7.90 a
BPC	13.22 ± 0.97 b	21.38 ± 3.49 a	15.67 ± 7.61 b	22.09 ± 3.29 a

Valores medios ± desviación estándar con letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ . V- Plantas *in vitro*, BV-hijos de bulbillos de plantas *in vitro*, RV- hijos de rizomas de plantas *in vitro*, BPC- hijos de bulbillos de plantas de campo, RPC- hijos de rizomas de plantas de campo.

Tabla 2. Densidad estomática en la epidermis de láminas foliares de plantas de henequén propagadas por diferentes métodos.

Material vegetal	Densidad estomática (No.estomas/ $\mu\text{m}^2$ )			
	Superficie adaxial		Superficie abaxial	
	7 meses	15 meses	7 meses	15 meses
RPC	24.72 $\pm$ 3.72 b	32.43 $\pm$ 8.32 a	23.54 $\pm$ 5.55 b	37.67 $\pm$ 4.96 b
BV	22.95 $\pm$ 6.68 b	34.14 $\pm$ 8.69 a	22.37 $\pm$ 3.72 b	51.80 $\pm$ 8.23 a
V	31.78 $\pm$ 5.69 a	23.54 $\pm$ 5.55 b	34.14 $\pm$ 3.72 a	29.43 $\pm$ 6.20 c
RV	22.90 $\pm$ 4.96 b	35.37 $\pm$ 8.69 a	23.54 $\pm$ 9.61 b	43.56 $\pm$ 11.16 a
BPC	23.54 $\pm$ 0.01 b	31.78 $\pm$ 9.69 a	24.43 $\pm$ 6.20 b	34.14 $\pm$ 6.68 b

Valores medios  $\pm$  desviación estándar con letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ . V- Plantas *in vitro*, BV-hijos de bulbillos de plantas *in vitro*, RV- hijos de rizomas de plantas *in vitro*, BPC- hijos de bulbillos de plantas de campo, RPC- hijos de rizomas de plantas de campo.

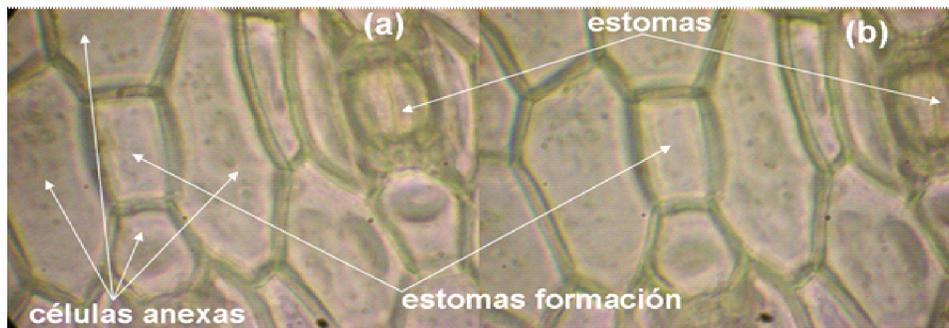


Figura 4. Epidermis con estomas en formación, (a) Bulbillo de planta *in vitro* (15 meses) (adaxial) y (b) Bulbillo de planta *in vitro* (15 meses) *A. fourcroydes* Lem 400x.

Atendiendo a los resultados, el origen del material vegetal influyó en el número de estomas. En las plantas *in vitro* al proceder de un medio controlado tanto ambiental, como nutricional se favoreció la presencia de un mayor número de estomas en la primera etapa evaluada (7 meses). Sin embargo, posiblemente al no estar totalmente endurecidas, no contar con las reservas necesarias y sufrir mayor pérdida de agua, se redujo el número de estomas en ambas superficies para los 15 meses, lo que indica una respuesta de acomodación de la planta a condiciones adversas para continuar su crecimiento y desarrollo.

Varios autores han informado valores de densidad estomática para ambas superficies de la hoja en especies de *Agave*. Por ejemplo, estudios realizados por Arroyo *et al.* (2008) en diferentes especies de *Agave* indicaron para *A. tequilana*, una densidad estomática superior a la observada en este trabajo para *A. fourcroydes*,

tanto por la superficie adaxial ( $99.55 \mu\text{m}^2$ ) como la abaxial ( $95.33 \mu\text{m}^2$ ) pero en plantas cultivadas en campo. Además, observaron que *A. americana* y *A. tequilana* presentaron una mayor densidad estomática por la superficie adaxial, no así *A. angustifolia*, el cual se considera ancestro de *A. fourcroydes* (Colunga, 1998). Estos autores plantearon que existe una relación entre la densidad estomática y la posición y grado de desarrollo de la lámina foliar. Atendiendo a lo anterior se pudiera considerar que al tiempo de cultivo muestreado (15 meses) las hojas continuaban en expansión. En relación con lo anterior en el análisis histológico se observaron estomas en formación en las superficies adaxial y abaxial de la epidermis, donde se apreció la formación de las cuatro células anexas antes de la formación de las células oclusivas (Figura 4). Estos resultados indicaron la necesidad de aumentar el periodo de evaluación de las plantas en vivero para constatar su completo desarrollo.

Las plantas *in vitro* a los siete meses de cultivo superaron al resto en las variables evaluadas (índice estomático y densidad estomática) sin embargo, a los 15 meses mostraron los menores valores. Se requieren otros estudios que permitan profundizar en la relación de estas características con las condiciones de cultivo en aclimatización y vivero y la posterior respuesta de las plantas en campo.

## CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado se comprobó que la lámina foliar de plantas de henequén variedad 'Sac Ki' obtenidas por diferentes métodos de propagación asexual (plantas cultivadas *in vitro*, hijos de bulbillos de plantas *in vitro*, hijos de rizomas de plantas *in vitro*, hijos de bulbillos de plantas de campo e hijos de rizomas de plantas de campo) presentaron estructuras anatómicas similares. Sin embargo, se observó que las plantas cultivadas *in vitro* se diferenciaron del resto en cuanto al índice estomático y la densidad estomática en los dos momentos de evaluación lo cual sugiere un acomodo a las condiciones ambientales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Dercy Parra, Carmen Camejo y Tomás Daniel Fariñas del INIA-Miranda, Venezuela, por la colaboración brindada en la realización de los cortes histológicos.

## REFERENCIAS

- Abreu E, G González, P Rodríguez, R Domech, M Garriga (2007) Evaluación de plantas *in vitro* de henequén (*Agave fourcroydes*) durante fase de aclimatización. ITEA-Producción Vegetal 103(2): 65-75
- Álvarez de Zaya A (2009) El complejo estomático en la familia Agavaceae II. Epidermis adulta. Feddes Repertorium 101(3-4): 113-134
- Arroyo J, F Matías, Espinosa S, Espinoza H, Peña A (2008) Estudio comparativo de las microestructuras foliares en Agaves de importancia económica. [En línea] En: <http://www.amemi.org/congreso/BIOLOGIA/RNO3.pdf>. Consultado mayo 2010
- Colunga, PS (1996) Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis presentada para obtener el grado Científico de Doctora en Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. DF
- Dami L, Hughes HG (1995) Leaf anatomic and water loss of *in vitro* PEG treated Valliant grape. Plant Cell Tissue and Organ Culture 42: 179-184
- Días, R (1993) Evaluación de material vegetativo de henequén proveniente de cultivo de tejidos. Plaza. En: Memorias Conferencia Nacional sobre el henequén y la zona henequenera de Yucatán, pp. 161- 164. INIFAP. Mérida
- Garriga M, González G, Alemán S (2006) Comportamiento *in vitro* de la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem. Biotecnología Vegetal 6(1): 3-7
- Garriga M, González G, Alemán S, Abreu E, Quiroz K, García-González R (2010) Management of auxin-cytokinin interactions to improve the micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). Chilean Journal of Agricultural Research 3: 245-250
- Gentry HS, Sauck JR (1978) The stomatal complex in *Agave*: groups *Deserticolae*, *Campaniflorae*, *Umbelliflorae*. Proc. California Acad Sci 41: 371-387
- González G, Alemán S, Abreu E, Figueroa H, Toapanta P, Doam C (2011) Evaluación de la cosecha de plantas seleccionadas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y propagadas *in vitro*. Revista Ciencia Amazónica 2(2): 13-16
- González G, Alemán S, Garriga M, Ortíz R, de la Fe C (2007) Radiosensitivity to gamma rays (60Co) in shoot tips of henequen. Biotecnología Vegetal 7 (2): 115 – 117
- González G, Alemán S, Infante D (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* Lem II: selection among individuals in clonally propagated population. Plant Science 165: 595-601
- Hernández R, López R, Benavides A (2003) Micromorfología de la epidermis foliar de *Agave tequilana* Weber. Agrofaz 3 (2003) 387-396
- Lüttge U, Gustafsson MHG, Winter K, Bittrich V (2007) Diversity, Phylogeny and Classification of *Clusia*. Vol 194, pp. 95-116. Springer Berlin Heidelberg
- Macía M J (2006) Las plantas de fibra. En: M Moraes R, B Ollgaard, L P Kvist, F Borchsenius, H Balslev (Eds.). Botánica Económica de los Andes Centrales, pp. 370-384. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz
- Peña E, González G, Berrillo A, Sosa D, Arteaga M, Rittoles D, Pérez D, Torriente Z (1997) Tecnología para la micropropagación del henequén a gran escala. Rev. Jardín Botánico Nacional 18: 169-176

- Pospósilová J, Ticha I, Kadlec P, Haisel D, Y Plzakova (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481- 497
- Robert ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F (1992) Micropropagation of *Agave* spp. En: JPY Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, pp.306 - 329. Springer-Verlag. Dordrecht
- Rodés G, Collazo O M (2006) *Manual de Prácticas de Fotosíntesis* 1era ed. Universidad Autónoma de México. México DF
- Roth I (1992) *Leaf structure: coastal vegetation and mangroves of Venezuela*. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- Roth I, H Lindorf (1986) *Morfología y Anatomía foliar de plantas de la Selva Nublada de Rancho Grande*. Parque Nacional Henry Pittier. El ambiente físico, ecología general y anatomía vegetal. Fondo Editorial Act. Cient. Venezolana. Caracas
- Santamaría JM, Robert ML, Herrera JL (1995) Stomatal physiology of micropropagated CAM plant, *Agave tequiliana* (Wever). *Plant Growth Regulation* 16: 211-214
- Schoch P, C Zinsou, M Sibí (1980) Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. *Jour Exp Bot* 31(124):1211-1216
- Wilkinson H (1979) *The plant surface (mainly leaf)*. En: C Metcalfe, L Chalk (Eds.) *Anatomy of the dicotyledons*, pp. 97- 165. Vol. I. 2<sup>da</sup> ed. Clarendon Press, Oxford

Recibido: 18-9-2013  
Aceptado: 11-12-2013