

Vías de penetración de un fertilizante foliar en *Agave tequilana* Weber var. Azul*

Penetration pathways for a foliar fertilizer in *Agave tequilana* Weber var. Azul

Galdino Bejines Ramos¹, Diego R. González Eguiarte^{1§}, María de la Nieves Rodríguez Mendoza² y Ramón Rodríguez Macías¹

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad de Guadalajara. Carretera a Nogales, km 15.5. Predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México. CP. 45110. Tel. 01(33)37771150, ext. 33040. (galdinobejines@herradura.com.mx; diegonz@cucba.udg.mx; ramonrod@cucba.udg.mx). ²Posgrado en Edafología-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. 01(595) 9520200, ext. 1262. (marinie@colpos.mx). [§]Autor para correspondencia: diegonz@cucba.udg.mx.

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo contribuir al conocimiento de la ruta de penetración de un fertilizante foliar 4-17-17 (NPK) en agave azul. En plantas de agave azul de 1.5 años de edad se hicieron cortes histológicos para identificar las principales características morfológicas de la hoja. Se asperjaron hojas con la solución fertilizante-colorante verde rápido más azul negro de naftol (F-VR-ANN) y por separado con la solución fertilizante-colorante calcofluor (F-C). Se hicieron cortes histológicos a los 30, 60 y 120 min después de la aplicación. Las actividades se realizaron en el laboratorio de Histopatología Vegetal del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, *Campus* Montecillo, durante los meses de agosto y septiembre de 2013. Se observaron haces vasculares pequeños dispersos en el parénquima en empalizada y en el parénquima esponjoso. El grosor de la cutícula varió de acuerdo al sitio de muestreo dentro de la hoja, en promedio, de 17.1 μm en la parte apical y 19.1 μm en la parte media de la hoja. En el parénquima en empalizada se observaron cristales, probablemente de oxalato de calcio en forma de prismas. Las evidencias en la acumulación de la solución F-VR-ANN sugieren que la

Abstract

This research aimed to contribute to the knowledge of the penetration pathway of the foliar fertilizer 4-17-17 (NPK) in blue agave. In 1.5-year-old blue agave plants, histological sections were made to identify the main morphological characteristics of the leaf. Leaves were sprayed with the fertilizer-dye fast green solution plus naphthol blue black (F-VR-ANN) and separately with the fertilizer-dye calcofluor solution (FC). Histological sections were made at 30, 60 and 120 min after application. The activities were conducted at the Laboratory of Plant Histopathology of the Postgraduate College in Agricultural Sciences, *Campus* Montecillo, during the months of August and September 2013. Small vascular bundles scattered in the palisade parenchyma and spongy parenchyma were observed. The thickness of the cuticle varied according to the sampling site within the leaf, on average, 17.1 μm in the apical part and 19.1 μm in the middle part of the leaf. In the palisaded parenchyma crystals were observed, probably of calcium oxalate in the form of prisms. Evidence on the accumulation of the F-VR-ANN solution suggests that the penetration route was stomatal and cuticular, since accumulation was

* Recibido: abril de 2017
Aceptado: mayo de 2017

ruta de penetración fue vía estomática y cuticular, ya que se observó acumulación a partir de los 30 min después de la aplicación en la cutícula y 120 min después en el parénquima en empalizada. Asimismo, la aplicación de la solución F-C sugiere también una penetración vía cuticular y estomática, ya que hubo fluorescencia dentro de las células epidérmicas 30 min después de haber realizado la aplicación y 120 min después se observó entre y dentro de las células del parénquima en empalizada. De esta manera, los resultados evidencian que la fertilización foliar puede ser una opción viable para complementar la fertilización al suelo.

Palabras clave: *Agave tequilana* Weber var. Azul, cutícula, fluorescencia.

El objetivo del presente trabajo fue hacer una caracterización foliar de la anatomía de la hoja del agave e identificar las vías de penetración del fertilizante foliar. Con base a metodologías utilizadas para estos fines (Nava *et al.*, 2003; García *et al.*, 2013), se utilizaron dos plantas de *Agave tequilana* de 1.5 años de edad, provenientes de la empresa Casa Herradura, en Amatitán Jalisco, México. Tomando en consideración las partes de la hoja que mayormente captan las soluciones aplicadas, las muestras se obtuvieron de la parte media y ápice de las hojas totalmente expandidas, localizadas tanto en la parte central como radial del cogollo. La investigación se desarrolló en el laboratorio de Histopatología Vegetal en el Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo, México, de agosto a septiembre de 2013. En la primera etapa, se caracterizó la estructura foliar y en la segunda se determinó la vía de penetración foliar del fertilizante.

Se disectaron fragmentos foliares de la parte apical y media de la hoja de aproximadamente 0.5 mm², los cuales se cortaron en un micrótopo de congelación (American Optical, modelo 880), a un grosor de 25 µm (Sandoval, 2005). Para medir el grosor de la cutícula, las secciones obtenidas se tiñeron con Sudan IV (C₂₄H₂₀N₄O) durante 25 min y se montaron con agua en portaobjetos y cubreobjetos. El Sudan IV se caracteriza por dar color a los lípidos al solubilizarse en ellos (Martínez y Gragera, 2008). Asimismo, otras secciones se tiñeron con Azul de Toluidina (C₁₅H₁₆N₃S⁺) durante 20 min para diferenciar los haces vasculares (D'Ambrogio, 1986). Se tomaron fotografías con una cámara digital integrada a un microscopio de luz (marca Velab modelo Ve-B6); la medición cuticular se hizo con el software Motic Imágenes Plus 2 M1, considerando tres campos visuales por sección y corte (Guerrero *et al.*, 2008; Alejo-Plata *et al.*, 2011).

observed after 30 min after application to the cuticle and 120 min after in the parenchyma in palisade. Also, the application of the F-C solution suggests a cuticular and stomatal penetration, as there was fluorescence within the epidermal cells 30 min after the application and 120 min after it was observed between and within the palisade parenchyma cells. In this way, the results show that foliar fertilization may be a viable option to supplement soil fertilization.

Keywords: *Agave tequilana* Weber var. Azul, cuticle, fluorescence.

The objective of this paper was to perform a foliar characterization of the anatomy of the agave leaf in a general way and to identify the penetration pathways of a foliar fertilizer. Based on methodologies used for these purposes (Nava *et al.*, 2003; García *et al.*, 2013), two plants of *Agave tequilana* of 1.5 years old, from the company Casa Herradura, in Amatitán Jalisco, Mexico were used. Taking into account the parts of the leaf that mostly capture the applied solutions, samples were obtained from the middle and apex of fully expanded leaves, located in both the central and radial parts of the bud. The research was developed in the Laboratory of Plant Histopathology at the College of Postgraduates *Campus* Montecillo, Mexico, in August and September of 2013. In the first stage, the leaf structure was characterized and in the second stage the penetration pathway of the fertilizer was determined.

Leaf fragments from the apical and middle part of about 0.5 mm² were dissected, which were cut on a freezing microtome (American Optical, model 880), to a thickness of 25 µm (Sandoval, 2005). To measure the cuticle thickness, the obtained sections were stained with Sudan IV (C₂₄H₂₀N₄O) for 25 min and were mounted in coverslips and slides using water. Sudan IV is characterized by coloring lipids when it is solubilized (Martínez and Gragera, 2008). Also, other sections were stained with Toluidine Blue (C₁₅H₁₆N₃S⁺) for 20 min to differentiate vascular bundles (D'Ambrogio, 1986). Photographs were taken with a digital camera integrated into a light microscope (Velab brand model Ve-B6); cuticular measurement was made with the Motic Images Plus 2 M1 software, considering three visual fields per section and cutting (Guerrero *et al.*, 2008; Alejo-Plata *et al.*, 2011).

El fertilizante foliar utilizado en este experimento fue un 4-17-17, a base de urea, fosfato de amonio y fosfato potásico a l 1%, complementado con DAP-PLUS® como tensoactivo. Se utilizaron los colorantes verde rápido ($C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$) + azul negro de naftol ($C_{22}H_{14}N_6Na_2OS_2$) a una concentración de 0.05% como trazadores no fluorescentes para la ubicación de la solución fertilizante y calcofluor (Fluorescent Brightener 28, $C_{40}N_{42}O_{10}S_2Na_2$) al 0.01% como un trazador fluorescente, estos colorantes se prepararon independientemente del fertilizante (Sandoval, 2005). Se asperjaron individualmente estos colorantes con el fertilizante y a la planta testigo se asperjó solo agua.

Después se muestrearon las hojas a los 30, 60, 90 y 120 min de haber aplicado el fertilizante foliar y de éstas se disectaron fragmentos de 0.6*0.4 cm (Sandoval, 2005), y se cortaron transversalmente con un microtomo de congelación (American Optical, modelo 880) a 25 μ m de grosor. Los cortes se montaron en portaobjetos y cubreobjetos. Las muestras se trataron con fertilizante más los colorantes verde rápido + el azul negro de naftol (F-VR+ANN) y se observaron en un microscopio de luz marca Velab modelo VE-B y las asperjadas con el fertilizante más el calcofluor (F-C) se observaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss para visualizar la penetración a través de la fluorescencia de las estructuras anatómicas de la hoja (Nava *et al.*, 2003; Sandoval, 2005; García *et al.*, 2013); cabe señalar, que el calcofluor es un colorante fluorescente inespecífico que se enlaza a la celulosa y a la quitina de las paredes celulares, por lo que en caso de que haya penetración en la hoja de la solución, habrá una fluorescencia azul en las estructuras anatómica de la misma.

Los resultados muestran que la hoja de agave es isolateral, ya que en las dos superficies de la lámina se presentaron estratos pluriestratificados de parénquima en empalizada, mientras que en la porción central del mesófilo se observaron células parenquimatosas de apariencia isodiamétrica, entre las cuales se distribuyeron los haces vasculares. En la fotomicrografía A (Figura 1) (10 X), las flechas muestran la posición de los haces vasculares en la porción central del mesófilo (PCM) y las fibras que rodean a los haces vasculares, así mismo se puede observar que la hoja es anfiestomática. La fotomicrografía B (Figura 1), muestra los haces vasculares de menor diámetro en el límite interno del parénquima en empalizada (PE) y en la parte central del mesófilo (PCM) (40 X).

The foliage fertilizer used was 4-17-17, based on urea, ammonium phosphate and potassium phosphate 1%, supplemented with DAP-PLUS® as surfactant. The Fast green dye ($C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$) + naphthol blue black ($C_{22}H_{14}N_6Na_2OS_2$) were used at a concentration of 0.05% as non fluorescent tracers for location of the fertilizer solution and calcofluor (Fluorescent Brightener 28, $C_{40}N_{42}O_{10}S_2Na_2$) at 0.01% as a fluorescent tracer, these dyes were prepared apart from the fertilizer (Sandoval, 2005). The dyes were individually sprinkled with the fertilizer and the control plant was sprayed only with water.

The leaves were then sampled at 30, 60, 90 and 120 min after the leaf fertilizer was applied and 0.6*0.4 cm (Sandoval, 2005) fragments were dissected and transversely cut with a freezing microtome (American Optical, Model 880) at 25 μ m thickness. The cuts were mounted on slides and coverslips. The samples were treated with fertilizer plus rapid green + black blue naftol (F-VR+ANN) dyes and were observed in a light microscope of Velab brand VE-B model and those sprayed with fertilizer plus calcofluor (FC) were observed in a Carl Zeiss fluorescence microscope to visualize penetration through fluorescence of the leaf's anatomical structures (Nava *et al.*, 2003; Sandoval, 2005; García *et al.*, 2013); it should be noted that calcofluor is a non-specific fluorescent dye which binds to the cellulose and chitin of the cell walls, so that in case it penetrates into the leaf, there will be a blue fluorescence in its anatomical structures.

The results showed that the agave leaf is iso-lateral, since on the two surfaces of the lamina there were pluriestratified strata of palisade parenchyma, while in the central portion of the mesophyll parenchymal cells of isodiametric appearance were observed, among which the vascular bundles were distributed. In the photomicrograph A (Figure 1) (10 X), the arrows show the position of the vascular bundles in the central portion of the mesophyll (PCM) and the fibers surrounding the vascular bundles, it can also be observed that the leaf is amphistomatic. Photomicrograph B (Figure 1), shows the smaller diameter vascular bundles at the inner border of the palisade parenchyma (PE) and at the central part of the mesophyll (PCM) (40 X).

On the other hand, both photomicrographs show that the epidermal tissue was formed by a layer of slightly elongated cells in a perpendicular direction to the leaf surface; no plastids were observed, which are cell organelles

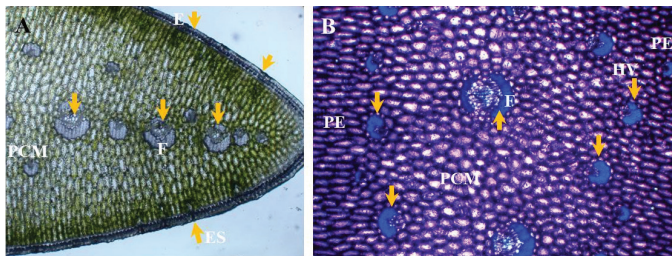


Figura 1. Fotomicrografías de sección transversal de hoja de agave. A= haces vasculares en la porción central del mesófilo (PCM), fibras (F), epidermis (E) y estomas (ES). B= haces vasculares (HV) en el límite interno del mesófilo (flechas), fibras (F), porción central del mesófilo (PCM), parénquima en empalizada (PE).

Figure 1. Photomicrographs of cross section of agave leaf. A= vascular bundles in the central portion of the mesophyll (PCM), fibers (F), epidermis (E) and stomas (ES). B= vascular bundles (HV) at the mesophyll internal border (arrows), fibers (F), central portion of the mesophyll (PCM), palisade parenchyma (PE).

Por otra parte, ambas fotomicrografías evidencian que el tejido epidérmico estuvo formado por un estrato de células ligeramente alargadas en dirección perpendicular a la superficie de la hoja; no se observaron plastos, que son orgánulos celulares característicos de las plantas en el que se acumulan lípidos, proteínas, pigmentos, etc., según de qué tipo sea (cloroplastos, amiloplastos y proplástidos), y que es una característica típica de plantas adaptadas a condiciones de aridez (Nobel, 1988). La fotomicrografía A de la Figura 2, muestra que la pared tangencial externa presentó una cutícula gruesa (C) proyectada hacia las paredes periclinales y sobre una capa de células epidérmicas (CE).

Las células guarda (CG) se distribuyeron ligeramente más abajo que el resto de las células epidérmicas ordinarias, tal como se muestra en la fotomicrografía B (Figura 2). Aparentemente, las células del parénquima en empalizada (PE) presentaron mayor número de cloroplastos que las células parenquimatosas de la región central de la lámina (fotomicrografía A y B, Figura 2). Cada haz vascular presentó un gran número de fibras (F) y estuvo rodeado por células parenquimatosas de pared delgada (P), asimismo, se pueden observar el xilema (X) y el floema (FO) (fotomicrografía C, Figura 2); también se observan estructuras prismáticas no abundantes que probablemente sean cristales de oxalato de calcio (fotomicrografía D, Figura 2).

characteristic of plants in which lipids, proteins, pigments, etc, depending on the type (chloroplasts, amyloplasts and proplasts) accumulate, and which is a typical characteristic of plants adapted to aridity conditions (Nobel, 1988). Photomicrograph A of Figure 2 shows that the outer tangential wall had a thick cuticle (C) projected towards the periclinal walls and on a layer of epidermal cells (EC).

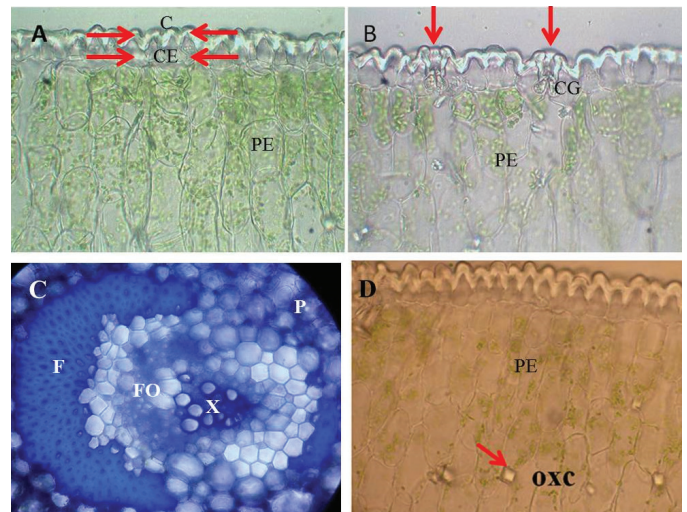


Figura 2. Fotomicrografías de sección transversal de hoja de agave. A= epidermis uniestratificada con células ordinarias sin plastos; cutícula (C), célula epidérmica (CE), parénquima en empalizada (PE). B= aparato estomático; célula guarda (CG), parénquima en empalizada (PE). C= tejido vascular; fibras (F), parénquima (P), xilema (X), floema (FO). D= parénquima en empalizada (PE) se señalan estructuras prismáticas, que pueden ser cristales cuya composición química probable sean de calcio (OXC).

Figure 2. Photomicrographs of cross section of agave leaf. A= unstratified epidermis with ordinary cells without plastids; cuticle (C), epidermal cell (CE), palisade parenchyma (PE). B= stomatal apparatus; guard cell (CG), palisade parenchyma (PE). C= vascular tissue; fibers (F), parenchyma (P), xylem (X), phloem (FO). D= palisade parenchyma (PE) where prismatic structures are indicated, which may be crystals whose probable chemical composition is calcium (OXC).

The guard cells (CG) were distributed slightly lower than the rest of the ordinary epidermal cells, as shown in photomicrograph B (Figure 2). Apparently, the cells of the palisade parenchyma (PE) had more chloroplasts than the parenchymal cells of the central region of the lamina (photomicrographs A and B, Figure 2). Each

Las imágenes anteriores muestran cómo la hoja de agave tiene una cutícula gruesa, con revestimiento ceroso y una acumulación probablemente de oxalato de calcio en forma de cuerpos, lo que le permite aislar la superficie foliar e impenetrable a gases como el CO₂ y vapor de agua, así como la protección ante agentes adversos del medio ambiente. También se puede notar que las células contienen grandes vacuolas para la acumulación de los ácidos orgánicos y agua.

En el mesófilo, en las células en empalizada, se observaron lo que probablemente sean cristales prismáticos de oxalato de calcio (Figura 2, fotomicrografía D). En plantas de 1.5 años de edad, el grosor promedio de la cutícula adaxial varió según la región en donde se tomó la muestra: en el ápice fue de 17.1 µm, mientras que en la parte media fue de 19.1 µm.

Respecto a las rutas de penetración, a los 30 min después de la aplicación del fertilizante foliar con verde rápido y azul negro de naftol (F-VR-ANN), el F-VR-ANN se acumuló en la cutícula, capa que se encuentra arriba de la epidermis (E) (fotomicrografía A, Figura 3), a los 60 minutos en los ostiolas de los estomas (ES) (fotomicrografía B, Figura 3), y a los 90 y 120 min en la cámara estomática y células del parénquima en empalizada (PE), respectivamente (fotomicrografía C y D, Figura 3). El empleo de los colorantes verde rápido y azul negro de naftol como trazadores permitió observar la acumulación de los mismos en los estomas y en la cutícula, para posteriormente encontrarlos en las células del parénquima, con estas evidencias se puede señalar que la penetración de solutos es vía estoma y cuticular; sin embargo, es necesario realizar más pruebas que permitan obtener información más consistente respecto a estas vías de penetración en *Agave tequilana*.

En la aplicación del fertilizante foliar con calcofluor (F-C), en las fotomicrografías A y B de la Figura 4, se muestran cortes transversales de hoja, vistas en el microscopio de luz y de fluorescencia, respectivamente; se puede observar la cutícula (C) y el parénquima en empalizada (PE). A 30 minutos después de haber asperjado la hoja, el F-C se acumuló en la cutícula después de haber realizado la aplicación y hubo poca fluorescencia en las células del mesófilo (fotomicrografía C, Figura 4). A 60 min, la fluorescencia se observó en las células epidérmicas (fotomicrografía D, Figura 4). A 90 min después de la aplicación, se observó un ligero incremento de fluorescencia en algunas células del mesófilo (fotomicrografía E, Figura 4); y a 2 h, en todos los tejidos del mesófilo, incluyendo las cámaras subestomáticas (fotomicrografía F, Figura 4).

vascular bundle showed a large number of fibers (F) and was surrounded by thin-walled parenchymal cells (P), as well as xylem (X) and phloem (FO) (photomicrography C, Figure 2); there are also abundant prismatic structures that probably correspond to calcium oxalate crystals (photomicrograph D, Figure 2).

The images above show how agave leaf has a thick cuticle, with waxy coating and an accumulation probably of calcium oxalate shaped bodies, allowing to isolate the leaf surface and impenetrable to gases such as CO₂ and water vapor, as well as protection against adverse environmental agents. It can also be noted that the cells contain large vacuoles for the accumulation of organic acids and water.

In the mesophyll, in palisade cells, what were probably prismatic crystals of calcium oxalate (Figure 2, photomicrograph D) were observed. In plants of 1.5 years old, the average thickness of the adaxial cuticle varied according to the region where the sample was taken: at the apex it was 17.1 µm, while in the middle part it was 19.1 µm.

Regarding the penetration routes, 30 minutes after the application of foliar fertilizer with rapid green and naphthol black blue (F-VR-ANN), the F-VR-ANN accumulated in the cuticle, which is a layer found above the epidermis (E) (photomicrograph A, Figure 3), at 60 minutes in the ostiols of the stomata (ES) (photomicrograph B, Figure 3), and at 90 and 120 min in the stomatal chamber and parenchymal cells in palisade (PE), respectively (photomicrographs C and D, Figure 3). The use of rapid green and black blue Naftol dyes as tracers allowed to observe its accumulation in the stomata and in the cuticle, to later find them in the parenchyma cells, with these evidences it can be pointed out that the solutes penetration is via stoma and cuticular; however, it is necessary to perform more tests for more consistent information about these penetration pathways in *Agave tequilana*.

In the application of the foliar fertilizer with calcofluor (FC), in the photomicrographs A and B of Figure 4, cross sections of leaf are shown, seen under the light and fluorescence microscope respectively, the cuticle (C) and the palisade parenchyma (PE) are shown. At 30 minutes after sprinkling, the F-C accumulated in the cuticle after the application and there was little fluorescence in the mesophyll cells (photomicrography C, Figure 4). At 60 min, fluorescence was observed in the epidermal cells (photomicrograph D,

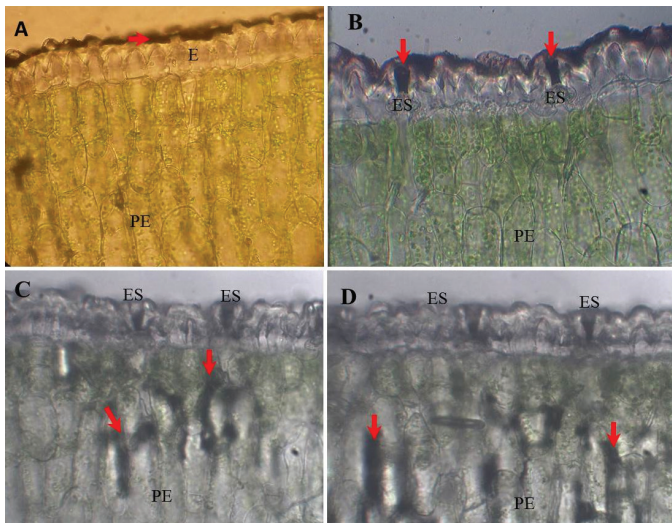


Figura 3. Fotomicrografías de secciones transversales en hojas de agave asperjadas con el fertilizante 4-17-17 más verde rápido y azul negro de naftol. A= la flecha indica la presencia del fertilizante a 30 min después de la aplicación en la superficie de la hoja; epidermis (E), parénquima en empalizada (PE). B: a 60 min el fertilizante se ubicó en los estomas (ES), parénquima en empalizada (PE). C= a 90 min el fertilizante se ubicó en el parénquima en empalizada (PE), estomas (ES). D= a 120 min el fertilizante se mantuvo en este mismo lugar; estomas (ES), parénquima en empalizada (PE).

Figure 3. Photomicrographs of cross-sections in agave leaves sprinkled with 4-17-17 fertilizer plus rast green and naphthol lue black. A= the arrow indicates the presence of fertilizer at 30 minutes after application to the leaf surface; epidermis (E), palisade parenchyma (PE). B= at 60 min the fertilizer was placed in the stomata (ES), palisade parenchyma (PE). C= at 90 min the fertilizer was located in the palisade parenchyma (PE), stomata (ES). D= at 120 min the fertilizer remained at the same place; stomata (ES), palisade parenchyma (PE).

Los estomas se encuentran tanto en el haz como en el envés de la hoja y los haces vasculares de mayor tamaño se encuentran en la porción central del mesófilo, mientras que los de menor tamaño en el límite interno del parénquima en empalizada. En el parénquima en empalizada se observó la probable presencia de cristales, quizás de oxalato de calcio, en forma de prismas.

Hay diferencias en el grosor de la cutícula, la cual varió en función de una región a otra de la hoja; en la región apical con un valor promedio de 17.1 μm , mientras que en la parte media fue de 19.1 μm .

Figure 4). At 90 min after application, a slight increase of fluorescence was observed in some mesophyll cells (photomicrograph E, Figure 4); and at 2 h, in all mesophyll tissues, including the sub-static chambers (photomicrograph F, Figure 4).

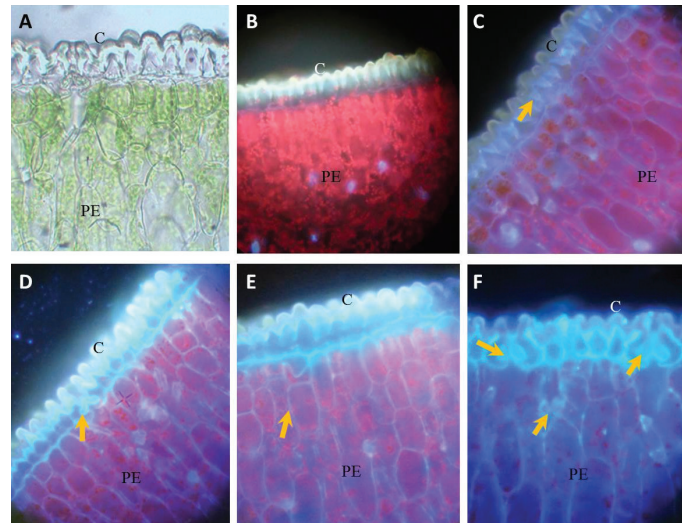


Figura 4. Fotomicrografías de secciones transversales en hojas de agave asperjadas con el fertilizante 4-17-17 con el calcofluor. A= sección de hoja sin aplicación del fertilizante observada con microscopio de luz; cutícula (C), parénquima en empalizada (PE). B= sección de hoja sin aplicación del fertilizante observada con microscopio de fluorescencia; cutícula (C), parénquima en empalizada (PE). C= Las flechas señalan la fluorescencia donde la solución fertilizante más calcofluor se encuentra a 30 min, cutícula (C), parénquima en empalizada (PE). D= a 60 min; cutícula (C), parénquima en empalizada (PE). E= a 90 min; cutícula (C), parénquima en empalizada (PE). F= a 120 min después de la aplicación; cutícula (C), parénquima en empalizada (PE).

Figure 4. Photomicrographs of cross sections in agave leaves sprayed with 4-17-17 fertilizer with calcofluor. A= leaf section without fertilizer application observed with light microscope; cuticle (C), palisade parenchyma (PE). B= leaf section without fertilizer application observed with fluorescence microscope; cuticle (C), palisade parenchyma (PE). C= Arrows point fluorescence where fertilizer plus calcofluor is found at 30 min, cuticle (C), palisade parenchyma (PE). D= 60 min; cuticle (C), palisade parenchyma (PE). E= at 90 minutes; cuticle (C), palisade parenchyma (PE). F= at 120 min after application; cuticle (C), palisade parenchyma (PE).

Conclusiones

Se observó penetración de la solución de fertilizante-verde rápido + azul negro de naftol a través de los estomas y posteriormente se visualizó en el parénquima. Con el fertilizante-calcofluor se observó penetración de la solución, ya que se tiñe prácticamente la cutícula, los estomas, la epidermis, las células en empalizada y las células del parénquima esponjoso.

Literatura citada

- Alejo, P. C.; Gómez, J. L. y Salgado, U. I. H. 2011. Edad y crecimiento del dorado *Coryphanea hippurus*, en el Golfo de Tehuantepec, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2(46):125-134.
- D'Ambrogio, A. A. 1986. Manual de técnicas de histología vegetal. Ed. Hemisferio Sur, Argentina. 83 p.
- García, G. V.; Rodríguez M. M. N.; Valdovinos P. G.; Pedraza S. M. E.; Trejo T. L. I. y Soto H. M.; 2013. Rutas de la penetración foliar en la fertilización de la orquídea *Cymbidium* sp. (Orchidaceae). *Rev. Mex. Cienc. Agríc. Pub. Esp. Núm. 5*.
- Guerrero, C. B.; Ramírez, S. H. U.; Varela, O. R.; Mondragón, E. J. D.; Meléndez, R. J. L.; León, C. J. M. y López, A. M. 2008. Evaluación del sellado apical de sistemas resinosos en la obturación de conductos radiculares: "estudio *in vitro*". *Acta Odontológica. Venez.* 1(48):1-11.
- Martínez, R. R. y Gragera, R. R. M. 2008. Fundamentos teóricos y prácticos de la Histoquímica. Vol.40 de Textos universitarios; Ed. CSIC-CSIC Press; España. p. 425-426.
- Nava, S. R.; Almaguer, V. G.; Pérez, G. M.; Maldonado, T. R. y Cárdenas, S. E. 2003. Fertilización foliar en cebolla. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 10(2):159-163.

Stomas are found in both the bundle and the underside of the leaf and the larger vascular bundles are found in the central portion of the mesophyll, while the smaller bundles in the inner border of the palisade parenchyma. In the palisade parenchyma, the probable presence of crystals, possibly of calcium oxalate, was observed in the form of prisms.

There are differences in the cuticle thickness, which varies depending on the region of the leaf; in the apical region with an average value of 17.1 μm , while in the middle part it was 19.1 μm .

Conclusions

Penetration of the fast-green fertilizer solution + naphthol black blue through the stomata was observed and subsequently visualized in the parenchyma. With the fertilizer-calcofluor penetration of the solution was observed, as it practically stained the cuticle, the stomata, the epidermis, the palisade cells and the cells of the spongy parenchyma.

End of the English version



- Nobel, 1988. *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge University Press. p. 40-41.
- Sandoval, Z. E. 2005. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Instituto de Biología. Colección: Cuadernos del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 64-66.