



DOI: [10.29298/rmcf.v13i70.1265](https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i70.1265)

Nota de Investigación

Importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *salmiana*

Importance of the cuticular layer during the colonization of the fungus that causes *negrilla* in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *salmiana*

Víctor Hugo Pérez España¹

Jaime Alioscha Cuervo Parra¹

José Esteban Aparicio Burgos¹

Mario Alberto Morales Ovando²

Martín Peralta Gil¹

Teresa Romero Cortes^{1*}

Abstract

The *Agave* genus plants represent a non-timber forest resource, valuable for soil recovery. The epidermis of the agave leaves contains multiple stomata and is covered by a cuticular layer. Currently, agave plants have a fungal disease that is characterized by circular gray spots on the *maguey* leaves, which over time become necrotic and eventually, these lesions end up drying them. The aim of this work was to describe the cuticular layer during the fungus colonization that causes bold in *Agave salmiana* subsp. *salmiana*. The cuticular layer is 121 mm \pm 2.8 thick. A homogeneous distribution of the stomata was observed, and the density (22.67-27.67 stomata mm⁻²) and the stomatal index (10.61-14.15) were determined. Tetracytic stomata and isodiametric polygonal epidermal cells were identified, the ostioles size were calculated as 57.9 mm \pm 5 long and 23.75 mm \pm 1.25 wide. The transverse and paradermal sections showed that the fungal hyphae and appressoria are restricted from the obverse side of the cuticular layer, which confirms the importance of preserving the epidermis in the *maguey pulquero* leaves.

Key words: *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *Asterina mexicana* Ellis & Everh., cuticle layer, stomata, negrilla, ostiole.

Resumen

Las plantas del género *Agave* representan un recurso forestal no maderable valioso para la recuperación del suelo. La epidermis de sus pencas contiene múltiples estomas y está cubierta por una capa cuticular. En la actualidad presentan una enfermedad fúngica que se caracteriza por la existencia de manchas grises circulares sobre las pencas, que con el tiempo se tornan necróticas; y en ocasiones, dichas lesiones terminan por secar las pencas. El objetivo de este trabajo fue describir la relevancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en *Agave salmiana* ssp. *salmiana*. La capa cuticular tiene un grosor de 121 \pm 2.8 mm. Se observó una distribución homogénea de los estomas y se determinó la densidad (22.67-27.67 estomas mm⁻²)

y el índice estomático (10.61-14.15). Los estomas observados son de tipo tetracítico, el tamaño de los ostiolos de $57.9 \text{ mm} \pm 5$ de largo y $23.75 \text{ mm} \pm 1.25$ de ancho y células epidérmicas poligonales isodiamétricas. Los cortes transversales y paradermales muestran que las hifas y los apresorios fúngicos quedan restringidos al lado anverso de la capa cuticular, por lo cual se corrobora la importancia de conservar la epidermis en las pencas del maguey pulquero.

Palabras clave: *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *Asterina mexicana* Ellis & Everh., capa cuticular, estomas, neqrilla, ostiolo.

Fecha de recepción/Reception date: 17 de agosto de 2021

Fecha de aceptación/Acceptance date: 22 de febrero de 2022

¹Escuela Superior de Apan, México.

²Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Sede Acapetahua. México.

*Autor para correspondencia; correo-e: romero@uaeh.edu.mx

Las plantas del género *Agave* representan un recurso forestal no maderable valioso para la recuperación del suelo, en particular en zonas áridas y semiáridas. Las hojas (pencas) de los agaves están recubiertas con una capa cuticular que desempeña funciones relevantes, como: el intercambio gaseoso, control de los cambios de temperatura, como barrera contra patógenos, entre otros (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). La capa cuticular que cubre las pencas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck otorga características muy apreciadas en la preparación de diversos platillos tradicionales; está formada por células epidérmicas, cutina, polisacáridos, ceras y estomas (Reina-Pinto y Yephremov, 2009; Staiger *et al.*, 2019; Pérez-España *et al.*, 2019). Los estomas están formados por dos células guarda u oclusivas, que dan lugar a un poro llamado ostiolo. Las células oclusivas controlan la apertura y el cierre de los ostiolos como respuesta a las señales hormonales y ambientales para regular el intercambio de gases (Zeng y He, 2010; Biswapriya *et al.*, 2015). Los agaves presentan estomas en la cara abaxial y adaxial de las pencas (Hernández-Valencia *et al.*, 2003) que se abren durante la noche y se mantienen cerradas durante el día para evitar la pérdida excesiva de líquidos en la planta (Lee, 2010).

Los hongos fitopatógenos utilizan diferentes mecanismos para la invasión de las plantas (Gudesblat *et al.*, 2009) tales como: adhesión de las esporas a la capa cuticular, formación de apresorios y de estructuras adhesivas, invasivas e infectivas,

desarrollo de una alta presión de turgencia en las células invadidas (Mendgen *et al.*, 2016) y degradación de la pared celular y la capa cuticular mediante la secreción de enzimas. Algunos fitopatógenos tienen la capacidad de modular la apertura o el cierre de los estomas mediante la liberación de compuestos químicos (Staples y Macko, 1980; Lee *et al.*, 1999; Bury *et al.*, 2013).

Actualmente, las plantas de *A. salmiana* presentan una enfermedad conocida como "negrilla"; ocasionada por el hongo *Asterina mexicana* Ellis & Everh. (Ellis and Everhart, 1900; Cesaveg, 2008), del cual existe escasa información. Los síntomas son manchas oscuras en ambas caras de las pencas que pueden llegar a necrosarlas y secarlas. El objetivo de este trabajo fue describir la importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en *Agave salmiana*.

Las capas cuticulares se obtuvieron de pencas de plantaciones de agave en los municipios Pachuca de Soto, Apan, Cardonal (Hidalgo) y Calpulalpan (Tlaxcala), de febrero a junio de 2019. Se recolectaron tres pencas por planta de ~8 años (de acuerdo con la experiencia de los productores) por municipio, que portaran síntomas de la enfermedad. De la cara adaxial de cada penca se tomó una muestra de los sitios apical, media y base (Figura 1a). Las muestras de la capa cuticular se removieron del sitio de colecta y se mantuvieron en solución de glicerol al 2 % hasta su análisis.

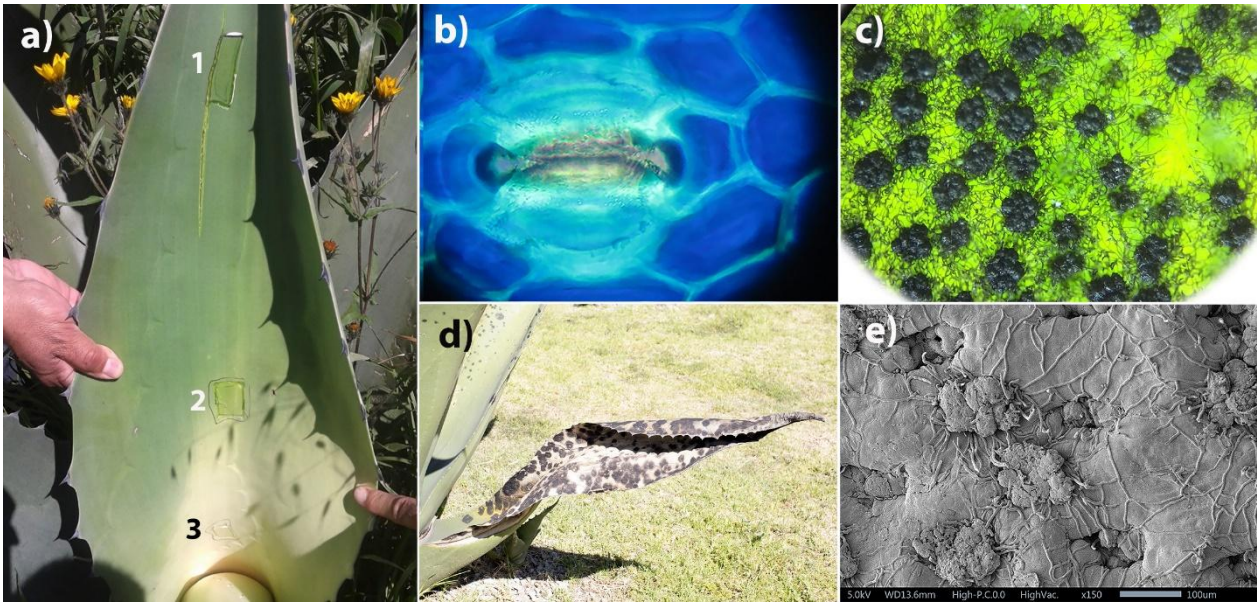


Figura 1. Capa cuticular de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *salmiana*, (a) Extracción de la capa cuticular en tres zonas de la cara adaxial: 1) zona distal, 2) zona media y 3) zona proximal; (b) Adverso de estomas, células oclusivas y células epidérmicas; (c) apresorios observados en mancha negra (4X), (d) penca deshidratada por invasión de la negrilla y (e) apresorios obstruyendo los estomas (SEM).

El índice estomático (IE) y la densidad estomática (DE) se determinaron con un microscopio óptico (Zeigen, ZB-7300). Las cutículas se tiñeron con azul de metileno para obtener una mayor definición. El IE se calculó de acuerdo con lo recomendado por Sosa *et al.* (2014) a partir de la siguiente fórmula:

$$IE = (NE)/(CE + NE) \times 100.$$

Donde:

NE = Número de estomas por campo de observación

CE = Número de células epidérmicas en el mismo campo de observación

La *DE* se determinó al calcular el número de estomas identificados en un área de 19.635 mm^{-2} , equivalente al campo observado (40X) en un radio de 2.5 mm. Los resultados del *IE* y la *DE* se analizaron con ANOVA y las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos con la prueba *Bonferroni* (*Software GraphPad Prism* versión 5.00 para *Windows*, *GraphPad Software Inc.*).

Para el análisis de la microestructura, las capas cuticulares se deshidrataron en una estufa con vacío (*Shel-Lab*, Mod. 1407) a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 45 kPa. Posteriormente, se fijaron con cinta de carbón a una platina de aluminio, se recubrieron con oro-paladio y se observaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM, Modelo JEOL JMS-5600LV).

La distribución de los estomas en la capa cuticular de la cara abaxial mostró homogeneidad en las zonas analizadas. En las micrografías de la capa cuticular de *A. salmiana* ssp. *salmiana* con un grosor de $121 \text{ mm} \pm 2.8$, se reconoció la presencia de ceras, células epidérmicas y estomas. El espesor promedio registrado para la cutícula de *A. tequilana* F. A. C. Weber es de $8.67 \text{ }\mu\text{m}$ para la cara abaxial (Hernández-Valencia *et al.*, 2003).

La *DE* evidenció homogeneidad en las zonas analizadas. Los estomas de tipo tetracítico, el tamaño de los ostiolos de $57.9 \text{ mm} \pm 5$ de largo y $23.75 \text{ mm} \pm 1.25$ de ancho y las células epidérmicas poligonales isodiamétricas (Figura 1b) son similares a lo consignado por Vargas-Rodríguez *et al.* (2017) y por Chávez-Güitrón *et al.* (2019). La diferencia del tamaño de los ostiolos se atribuye a variaciones en el grosor y distribución de la cera cuticular, a la especie y a las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas (García, 2007; Bernardino-Nicanor *et al.*, 2012).

Macroscópicamente, la enfermedad de la negrilla se observa como manchas grises que con el tiempo se tornan de color negro (Figura 1d). Al interior de la mancha se identifica la existencia de apresorios (hifas modificadas) especializadas en la invasión del tejido vegetal (Figura 1c) que se acumulan en la penca de maguey y obstruyen los estomas; además se observan otras hifas adheridas a la capa cuticular (Figura 1e).

La *DE* (22.67 a 27.67 estomas mm^{-2}) no presentó diferencias significativas entre las zonas de la cara adaxial de las pencas analizadas, ni entre municipios (Figura 2a); los valores (mm^{-2}) fueron similares con lo reconocido para otras especies de *Agave*, como: *A. mapisaga* Trel in L. H. Bailey (20-50 estomas; Nobel, 1994), *A. deserti* Engelm. (34 estomas; Gentry y Sauck, 1978) y *A. atrovirens* Karw. ex Salm-Dyck (29-30 estomas; Bernardino-Nicanor *et al.*, 2012); pero difieren de *A. promontorii* Trel. (18 estomas) y *A. sisalana* Perrine (11 estomas; Neto y Martins, 2012).

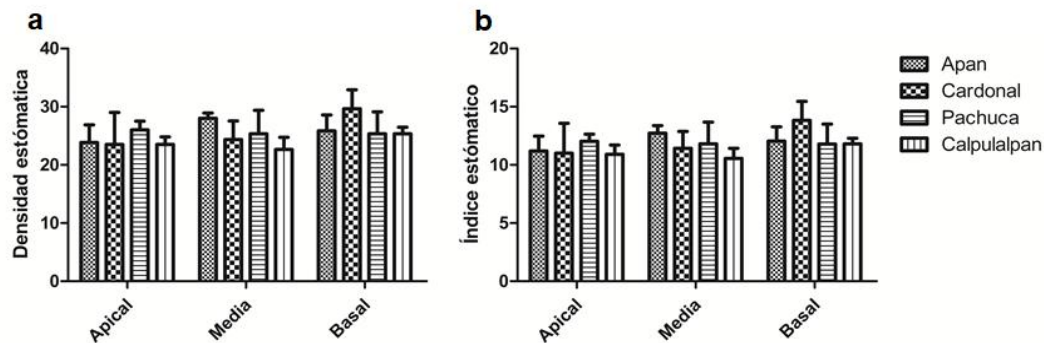


Figura 2. Índice y densidad estomática en la capa cuticular de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *salmiana* en diferentes municipios.

El IE para *A. salmiana* ssp. *salmiana* es de 10.61-14.15 (Figura 2b) mientras que para *A. tequilana* es de entre 5.72 y 6.68 estomas/células epidérmicas (Hernández-Valencia *et al.*, 2003). Ambos parámetros (IE y DE) están influenciados por diversas condiciones ambientales y nutricionales (Wilkinson, 1979; Roth *et al.*, 1986).

En los cortes paradermales y transversales se advirtió que la capa cuticular actúa como barrera mecánica e impide el paso de las estructuras reproductoras del hongo patógeno al interior de la penca. Con las micrografías en SEM, se detectó que las hifas y los apresorios del fitopatógeno solo se manifiestan del lado anverso de la capa cuticular, ya que no se lograron identificar en el lado reverso. Además, se observó que los apresorios se localizan, principalmente, en los estomas, lo que sugiere que el mecanismo de invasión de este hongo consiste en desecar las pencas

mediante la modulación de los estomas, al impedir que cumplan el ciclo día-noche de forma adecuada en las plantas afectadas.

Las micrografías SEM muestran la importancia de la capa cuticular como barrera mecánica al evitar que las hifas ingresen a las capas más internas de la penca; por lo tanto, la infección queda restringida al lado anverso de la capa cuticular.

La *DE* coincide con los registros para otras especies de *Agave*. Sin embargo, este es el primer reporte sobre la importancia de la capa cuticular de *Agave salmiana* ssp. *salmiana* durante su interacción con el hongo fitopatógeno responsable de la enfermedad de la negrilla. Es necesario realizar estudios complementarios para proponer alternativas que permitan evitar o controlar la invasión fúngica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribución por autor

Víctor Hugo Pérez España: desarrollo de la investigación, análisis de datos y corrección del manuscrito; Jaime Alioscha Cuervo Parra: análisis de datos, estructura y diseño del manuscrito; José Esteban Aparicio Burgos y Martín Peralta Gil: interpretación de datos y corrección del manuscrito; Mario Alberto Morales Ovando: estructura y diseño del manuscrito; Teresa Romero Cortes: coordinación del trabajo, desarrollo de la investigación, análisis e interpretación de resultados.

Referencias

Bernardino-Ninacor, A., R. Mora-Escobedo, J. L. Montañez-Soto, S. Filardo-Kerstupp and L. González-Cruz. 2012. Microstructural differences in *Agave atrovirens* Karw leaves and pine by age effect. African Journal of Agricultural Research 7(24):3550-3559. Doi:10.5897/ AJAR11.1185.

Biswapriya, B. M., R. A. Biswa, D. Granot, S. M. Assmann and S. Chen. 2015. The guard cell metabolome: functions in stomatal movement and global food security. Frontiers in Plant Science 6:1-13. Doi:10.3389/fpls.2015.00334.

Bury, M., A. Andolfi, B. Rogister, A. Cimmino, V. Mégalizzi, V. Mathieu, O. Feron, A. Evidente and R. Kiss. 2013. Fusicoccin A, a phytotoxic carbocyclic diterpene glucoside of fungal origin, reduces proliferation and invasion of glioblastoma cells by targeting multiple tyrosine kinases. Translational Oncology 6(2):112-23. Doi: 10.1593/tlo.12409.

Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato A.C. (CESAVEG). 2008. Manual de plagas y enfermedades del *Agave*. Casa editorial. Irapuato, Gto., México. 28p.

Chávez-Güitrón, L. E., F. C. Salinas-Pérez, E. A. Pérez-Salinas, J. Caballero, A. Vallejo-Zamora y E. Sandoval-Zapotitla. 2019. Variación de caracteres epidérmico-foliares de *Agave salmiana* subsp. *salmiana* (Asparagaceae) en el centro de México. Botanical Sciences 97 (4): 711-724. Doi: 10.17129/botsci.2159.

Y

García M., A. 2007. Los agaves de México. Ciencias 87:14-23. <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf> (20 de enero de 2021).

Gentry, H. S. and J. R. Sauck. 1978. The stomatal complex in *Agave*: groups Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. Proceedings of the California Academy

of Sciences series 41:371–387. <https://ia800206.us.archive.org/0/items/biostor-78394/biostor-78394.pdf> (25 de octubre de 2020).

Gudesblat, E. G., S. P. Torres and A. A. Vojnov. 2009. Stomata and pathogens: warfare at the gates. *Plant Signaling & Behavior* 4(12):1114-1116. Doi: 10.4161/psb.4.12.10062.

Hernández-Valencia, R. E. M., R. López-Franco and A. Benavides-Mendoza. 2003. Micromorfología de la epidermis foliar de *Agave tequilana* Weber. *Agrofaz* 3(2):387-396. <https://www.researchgate.net/publication/283995003> (15 de octubre de 2020).

Lee S., H. Choi, S. Suh, I.S. Doo, K. Y. Oh, E. J. Choi, A. T. S. Taylor, P. S. Low and Y. Lee. 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology* 121:147-52. [Doi:10.1104/pp.121.1.147](https://doi.org/10.1104/pp.121.1.147).

Lee, J. S. 2010. Stomatal opening mechanism of CAM plants. *Journal of Plant Biology* 53:19–23. [Doi:10.1007/s12374-010-9097-8](https://doi.org/10.1007/s12374-010-9097-8).

Mendgen, K., M. Hahn and H. Deising. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34:367–86. Doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.367.

Neto, I. L. C. and F. M. Martins. 2012. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Agavaceae). *Revista Caatinga* 25(2):72-78. <https://www.redalyc.org/pdf/2371/237123825011.pdf> (12 de febrero de 2021).

Nobel, P.S. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Cambridge University Press. New York, NY, USA. 166 p.

Pérez-España, V. H., J. A. Cuervo-Parra, C. Paz-Camacho, M. A. Morales-Ovando, C. A. Gómez-Aldapa, G. C. Rodríguez-Jimenes, V. J. Robles-Olvera, P. A. López-Pérez and T. Romero-Cortés. 2019. General characterization of cuticular membrane isolated from *Agave salmiana*. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 10(1):046-052. Doi:10.23910/IJBSM/2019.10.1.1950.

Reina-Pinto, J. J. and A. Yephremov. 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(6):540-549. [Doi:10.1016/j.plaphy.2009.01.004](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.004).

Roth I., T. Merida y 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 Acta Científica Venezolana. Caracas, Venezuela. pp. 205-241.

Sosa, C. M., G. S. Alemán, H. Y. Pérez, C. E. Abreu, C. D. Sosa and O. G. González. 2014. Caracterización de la lámina foliar de plantas de *Agave fourcroydes* Lem. obtenidas por propagación asexual. *Biotecnología Vegetal* 14(1):37-44. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/40/433> (12 de febrero de 2021).

Staiger, S., P. Seufert, K. Arand, M. Burghardt, C. Popp and M. Riederer. 2019. The permeation barrier of plant cuticles: uptake of active ingredients is limited by very long-chain aliphatic rather than cyclic wax compounds. *Pest Management Science* 75(12):3405-3412. [Doi: 10.1002/ps.5589](https://doi.org/10.1002/ps.5589).

Staples, R. C. and V. Macko. 1980. Formation of infection structures as a recognition response in fungi. *Experimental Mycology* 4(1):1-15. [Doi:10.1016/0147-5975\(80\)90045-6](https://doi.org/10.1016/0147-5975(80)90045-6).

Tafolla-Arellano, J. C., A. González-León, M. E. Tiznado-Hernández, L. Zacarías G. and R. Báez-Sañudo. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(1):3-12. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100001&lng=es&tlng=es (20 de noviembre de 2020).

Vargas-Rodríguez, L., M. I. García-Vieyra, B. I. León-Bata and P. Lozano-Sotomayor. 2017. Physical properties and microscopic structure of the *Agave salmiana* cuticle (mixiote). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 17(2):1-9. [Doi: 10.5154/r.rchsza.2017.12.017](https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2017.12.017).

Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mainly leaf). *In*: C. R. Metcalfe and L. Chalk (eds.). *Anatomy of Dicotyledons*. Oxford Clarendon Press. London, UK. pp. 97-16.

Zeng, W. and S. Y. He. 2010. A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 153:1188–1198. Doi: 10.1104/pp.110.157016.



Todos los textos publicados por la **Revista Mexicana de Ciencias Forestales** –sin excepción– se distribuyen amparados bajo la licencia *Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional)*, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.