

MORFOANATOMÍA COMPARADA DE HOJAS DE *LEPIDIUM VIRGINICUM* L. (MASTUERZO) BRASSICACEAE EN CONDICIONES *IN VIVO* E *IN VITRO*

Morphoanatomy comparative study of leaf *Lepidium virginicum* L., Brassicaceae (cress) grown both *in vivo* and *in vitro*

María Graziella BRUCATO¹, Helga LINDORF²,
Iselen TRUJILLO³ y Maira OROPEZA⁴

^{1,3}Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Apartado 47925. Caracas 1010. Venezuela

^{2,4}Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal. Laboratorio de Mejoramiento Vegetal. Instituto de Biología Experimental, Centro de Botánica Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 20513. Caracas. 1020A. Venezuela

RESUMEN

Lepidium virginicum (mastuerzo) tiene propiedades medicinales, es utilizado para combatir afecciones en la piel, hemorroides sangrantes y cólicos. Esta especie se multiplica sexualmente en bajo porcentaje mediante semillas, por lo que es necesario desarrollar metodologías de cultivo *in vitro*. Sin embargo, no todas las plantas obtenidas logran adaptarse al ambiente externo, lo que hace necesario diseñar prácticas de manejo que tomen en cuenta el efecto del medio *in vitro* sobre las plantas regeneradas. Se tomaron hojas procedentes de la planta madre y de las plantas regeneradas y se efectuaron análisis morfo-anatómicos de acuerdo a la metodología propuesta por varios autores. Las hojas de la planta madre son equifaciales y presentan estomas levemente sobresalientes. Las hojas de las plantas regeneradas tienen el mesofilo homogéneo y estomas sobresalientes. El desarrollo de las plantas en el medio *in vitro* condiciona los cambios encontrados, siendo seguramente responsable de su baja capacidad de aclimatación.

Palabras clave: Anatomía foliar, Brassicaceae, cultivo *in vitro*, estomas, *Lepidium*

ABSTRACT

Lepidium virginicum (cress) has medicinal properties, it is used to combat skin conditions, hemorrhoids bleeding and cramping. This plant propagates sexually by seed, but in low percentage, therefore, it is necessary to develop *in vitro* culture methodologies. However, not all the regenerated plants can adapt to the external environmental, therefore, it is necessary to assay management strategies that consider the effect of the medium on regenerated plants. Leaves were collected from the mother and regenerated plants, were made morphoanatomic analysis according to methodology performed by several authors. The leaves of the mother plant are equifacial, with slightly elevated stomata. The leaves of the regenerated plants have a homogeneous mesophyll and elevated stomata. The growth of plants ad *in vitro* media culture determine changes responsible for their low capacity for acclimatization.

Key words: Anatomy leaf, Brassicaceae, *in vitro* culture, stoma, *Lepidium*

INTRODUCCIÓN

El cultivo de plantas medicinales constituye un campo de enorme potencial en investigaciones de diversa índole, ya que son recursos fitogenéticos de gran importancia y son eje fundamental para la atención primaria de salud en un porcentaje importante de la población.

La investigación implicada en el aprovechamiento de plantas medicinales ha estado centrada en la validación farmacológica, análisis químicos por aislamiento de principios activos, estudios toxicológicos y pruebas químicas. Adicionalmente, se considera necesario incluir estudios de variabilidad genética, conservación *in situ* o *ex situ*, evaluaciones agronómicas con respecto a requerimientos de siembra, cultivo, rendimiento de principios activos, y la certificación del material que ingresa en el mercado a cualquier nivel y en cualquier momento.

En la actualidad, se están desarrollando diversos estudios sobre plantas con potencial medicinal, con miras a ser implementadas en la atención primaria de ciertas enfermedades y para uso a nivel industrial. Específicamente en Venezuela, se llevan a cabo investigaciones en diversas especies que han sido señaladas con usos frecuentes en estudios etnobotánicos, entre las que destaca *Lepidium virginicum* (Brassicaceae).

Esta especie es conocida comúnmente como escobilla o mastuerzo, y es usada popularmente debido a sus múltiples propiedades farmacológicas y medicinales en el tratamiento de afecciones de la piel, encías, útero, hemorroides, escorbuto y cólicos (Kozel 1991). Cortés-Arroyo *et al.* (2004) evidencian que es utilizada para combatir infecciones gastrointestinales, cardíacas, inflamaciones y para la elaboración de supositorios empleados para la anorexia. Calzada *et al.* (2003) demostraron que presenta actividad contra los parásitos responsables de la diarrea como *Entamoeba histolytica* *thophozoites* y *Giardia lamblia*, en pruebas *in vitro*. También, Naval *et al.* (2003) establecen que extractos de raíces maceradas de *L. virginicum* presentan actividad antiestrés.

La multiplicación de esta especie se realiza por métodos convencionales a través de semillas, pero no siempre se encuentra disponible durante todo el año. Generalmente crece en regiones con condiciones adversas, con altas intensidades de luz solar, fuertes vientos y a temperaturas bajo cero. Existen estudios que han logrado la multiplicación masiva de esta especie a través de técnicas *in vitro* (Osuna *et al.* 2006). El uso de biotécnicas ha permitido en muchas especies generar mayor número de individuos a escala industrial, sin embargo, no todas las plantas obtenidas logran adaptarse al ambiente *ex vitro* generando pérdidas considerables (Majada *et al.* 2000). Resulta obvio que el diseño de prácticas de manejo más eficaces está ligado a la comprensión cabal del efecto del ambiente *in vitro* sobre las plantas regeneradas, lo que a su vez implica la realización de estudios morfoanatómicos.

En la bibliografía consultada no se encontraron trabajos referentes a la anatomía foliar de *Lepidium virginicum*, pero sí de otras especies del género y de las Brassicaceae en general (Metcalfe & Chalk 1950; Rao & Inamdar 1983; Marín-Bravo 2003; Chacón-Gamboa 2004). El objetivo de este trabajo fue comparar a nivel morfo anatómico las hojas de las plantas regeneradas *in vitro* con las plantas desarrolladas *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 15 hojas con una longitud de 2,4 cm y una edad aproximada de cuatro meses, procedentes de la planta madre en condiciones de vivero (*in vivo*) y de las plantas obtenidas a través de procesos *in vitro* (micropropagación y organogénesis indirecta).

A continuación se describen las metodologías empleadas para obtener las plantas a través de los procesos *in vitro*.

Micropropagación

Para la etapa de iniciación del proceso de micropropagación se utilizaron segmentos de tallo los cuales fueron sembrados en medios Murashige & Skoog (1962) (MS) modificado suplementados o no, con diferentes concentraciones hormonales de auxina (ANA: ácido naftalenacético) y citoquinina (BA: 6-bencilaminopurina). La composición hormonal utilizada fue 1 mg/l de BA, 1 mg/l de BA- 0,25 mg/l de ANA, 2 mg/l de BA, 2 mg/l de BA-0,25 mg/l de ANA. Luego de cumplida la etapa de inducción los explantes se transfirieron al medio MS (1962) modificado, con mayor concentración de citoquininas (3 mg/l de BA y 4 mg/l de BA).

Organogénesis indirecta

En el proceso de organogénesis indirecta, en la base de los microesquejes sembrados en los medios utilizados para la inducción de la micropropagación se evidenció la formación de callos (diferentes tamaños); a partir de éstos se escindieron trozos aproximados de 1 cm de ancho y alto, con peso promedio de 0,40 g, y se transplantaron en los mismos medios para su multiplicación.

Las hojas fueron fijadas en etanol al 70% v/v; posteriormente se procedió a describir la forma, el tipo de ápice, base, margen, superficie, y patrón de nervaduras de la hoja empleando la terminología citada por Melville (1976) y Lindorf *et al.* (2006). El largo y el ancho de las láminas se determinaron promediando los valores obtenidos en cinco hojas. Para la evaluación anatómica se hicieron preparados epidérmicos y secciones transversales y paradérmicas a mano alzada.

Para el estudio de la nerviación y las observaciones anatómicas se tomaron trozos de la parte media de la lámina foliar las cuales se sumergieron en una solución al 10% v/v de hipoclorito de sodio (5,25% de ingrediente activo) hasta la aclaración de los tejidos, y luego se lavaron con abundante agua destilada. Los fragmentos para los estudios epidérmicos se mantuvieron en la solución de cloro

hasta observar el desprendimiento de las epidermis, las cuales se separaron con la ayuda de agujas de disección y pinzas tipo relojero. Se utilizó alternativamente para el estudio de las epidermis el método de cubrir las superficies de las hojas con una capa de esmalte transparente para uñas, dejarlas secar y luego desprender la película formada con la mano, montarla en la lámina y realizar las observaciones al microscopio.

Todos los preparados se colorearon con azul de metileno al 60% v/v y se montaron en la lámina portaobjeto con una mezcla glicerina-agua al 50% v/v, la cual fue sellada con barniz transparente para su preservación (Roth 1964).

Para cada carácter se efectuaron 25 mediciones escogidas al azar en diferentes cortes. Con los datos recogidos se realizó una prueba de t para variables independientes, utilizando el programa Statistical Product and Service Solutions (SPSS) versión 12.0 para Windows. Las observaciones y contajes se efectuaron en un microscopio marca Nikon®, al cual se adaptó una cámara digital para tomar las fotos.

RESULTADOS

Las mediciones efectuadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Mediciones realizadas en hojas de *L. virginicum* mantenidas en condiciones de vivero y regeneradas *in vitro*, ambas de 4 meses de edad.

Variable	Planta madre	Plantas obtenidas mediante		
		Micropropagación	Organogénesis	
Grosor de epidermis (μm)	Superior	13,64 ^{a*}	11,67 ^{bc}	10,35 ^c
	Inferior	13,4 ^a	11,46 ^b	10,12 ^c
Mesofilo (μm)	Grosor	123,95 ^a	100,90 ^b	86,31 ^c
Distancia intervascular (μm)		238,26 ^{ac}	315,34 ^b	302,47 ^{bc}
Tricomas (μm)	Longitud	25,15 ^a	21,87 ^{ac}	20,23 ^{bc}
Tamaño estomas (longitud de las células oclusivas en μm)	Haz	17,52 ^a	16,27 ^b	16,09 ^c
	Envés	17,4 ^a	15,85 ^b	13,94 ^c
Densidad estomática (estomas por mm^2)	Haz	104,66 ^a	132,34 ^b	190,26 ^c
	Envés	103,87 ^a	237,78 ^b	267,04 ^c
Lámina foliar (cm)	Ancho	1	1	1
	Largo	4	2	2,2

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba de t para variables independientes.

Morfología y anatomía foliar de la planta madre

Las hojas de *Lepidium virginicum* son simples, de consistencia membranosa, pubescentes, oblanceoladas, de márgenes dentados con un par de tricomas tuberculados en el extremo de cada lóbulo (ocasionalmente con 1 ó 3 tricomas), el ápice de las hojas es acuminado, base obtusa, nervaduras de tipo pinnatinervio y

craspedódromo (Fig. 1a). Son anfiestomáticas y equifaciales con epidermis uniestratificada en ambas caras, células de aspecto rectangular o bien algo redondeado y papiloso en vista transversal, y de contorno sinuoso en vista superficial. Paredes y cutícula delgadas. El parénquima en empalizada está conformado por dos a tres capas de células cortas en cada cara de la hoja. El parénquima esponjoso es de consistencia más o menos compacta, constituido por dos a tres estratos en los que se disponen los haces vasculares, nervio principal prominente hacia la cara abaxial (Fig. 2b). El nervio medio es prominente hacia la cara inferior, formado por un haz vascular colateral con una vaina parenquimatosa que rodea débiles casquetes de fibras de esclerénquima de paredes delgadas, más desarrollados en la cara abaxial. Los nervios secundarios aparecen en mediana densidad (reflejada en una distancia regular intervacular) y están formados por haces colaterales rodeados por una vaina vascular de células parenquimáticas incoloras y bien definidas. Idioblastos de tipo traqueidal en la zona media del mesofilo limitados casi exclusivamente al nivel de los haces vasculares. Células de mirosina acompañando a los haces menores (Fig. 2a).

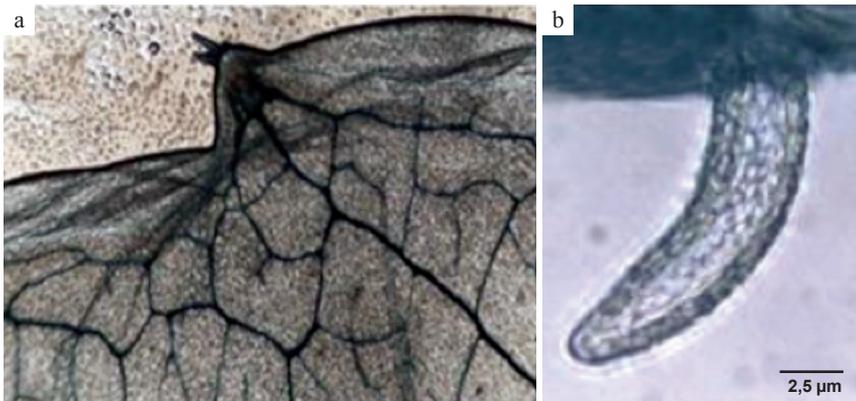


Fig. 1. *L. virginicum*. **a.** Arquitectura foliar de planta mantenida en condiciones de vivero (200x). **b.** Tricoma tuberculado (400x).

Estomas anisocíticos poco sobresalientes, o ubicados a nivel de las demás células epidérmicas (Fig. 3a, b). Tricomas unicelulares presentes en gran cantidad en ambas superficies de la hoja, de forma curva y naturaleza tuberculada debido a la aposición de diminutas verrugas cuticulares (Fig. 1b).

El pecíolo es alado y con forma de U amplia en el corte transversal, con la cara adaxial cóncava y la abaxial convexa. La epidermis es uniestratificada y los estomas están ordenados en filas. Presenta un haz principal en la zona central y dos haces secundarios de menor tamaño hacia las alas. Células parenquimatosas incoloras con espacios intercelulares visibles conforman el sistema fundamental (Fig. 4a).

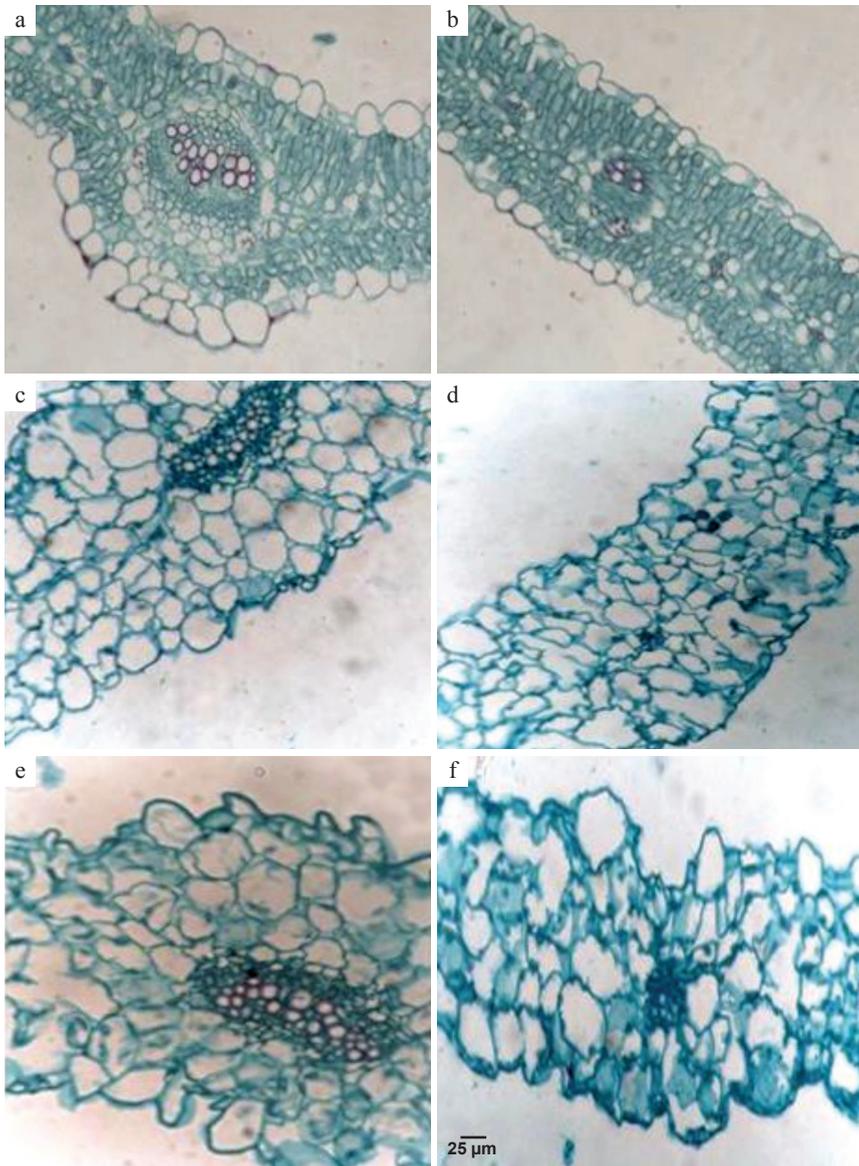


Fig. 2. Cortes transversales de hojas de *L. virginicum*. Planta mantenida en condiciones de vivero: **a.** nervio medio. **b.** Lámina con nervios secundarios. Planta obtenida mediante micropropagación: **c.** nervio medio. **d.** Lámina con nervios secundarios. Planta obtenida mediante el proceso de organogénesis indirecta: **e.** Nervio medio. **f.** Lámina con nervios secundarios. En todos los casos el aumento es 200X.

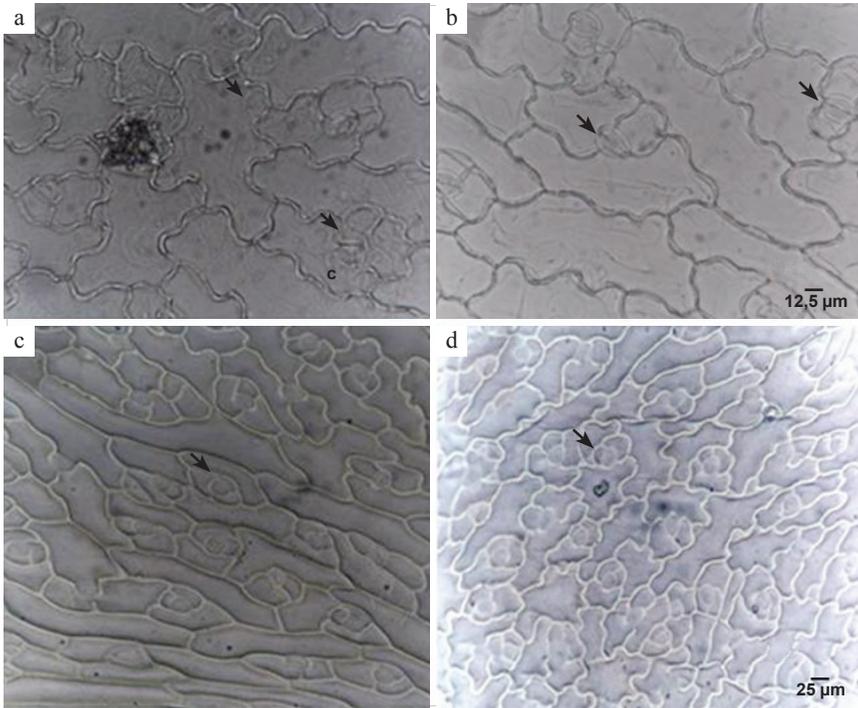


Fig. 3. Estomas de *L. virginicum* en vista superficial. Planta mantenida en condiciones de vivero: **a.** Epidermis adaxial. **b.** Epidermis abaxial (400x). Planta obtenida mediante micropropagación: **c.** Epidermis adaxial. **d.** Epidermis abaxial. En todos los casos el aumento es 200X.

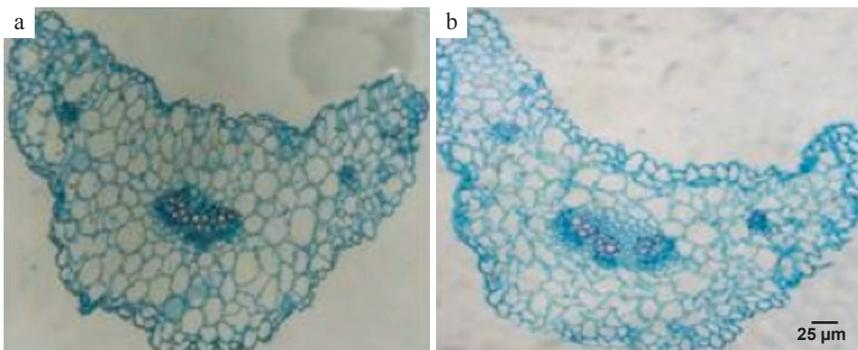


Fig. 4. Corte transversal del peciolo de *L. virginicum*. **a.** Planta mantenida en condiciones de vivero. **b.** Planta obtenida mediante micropropagación. En todos los casos el aumento es 200X.

Morfología y anatomía de las plantas regeneradas en comparación con la planta madre

Las hojas de las plantas obtenidas mediante micropropagación y organogénesis directa comparten varias de las características morfológicas con la planta madre, pero difieren en que su consistencia es más membranosa y son de menor longitud. Desde el punto de vista histológico, también se aprecian diferencias (Fig. 2c-f), ya que el mesofilo no se encuentra diferenciado en parénquima en empalizada y esponjoso, sino que es homogéneo, la epidermis es discontinua, con algunas células hipertrofiadas, y los estomas -especialmente los de la cara inferior-, en su gran mayoría sobresalientes, con grandes cámaras subestomáticas. Los tricomas tuberculados unicelulares se encuentran presentes en ambas caras de la hoja, pero en menor proporción que en la planta madre. Se nota mucha reducción del tejido vascular, el casquete esclerenquimático del haz del nervio medio está poco desarrollado y no presenta vaina parenquimatosa en los haces de los nervios secundarios. Los estomas de las plantas regeneradas de *Lepidium virginicum* son similares bajo microscopía de luz a los de la planta madre, aunque más pequeños (Fig. 3c, d). El pecíolo muestra morfología y anatomía similar de la planta madre, solo que las alas son más cortas (Fig. 4b).

Las diferencias cuantitativas conseguidas muestran predominio de valores menores a los observados en la planta madre; únicamente la densidad estomática y la distancia intervascular alcanzaron números mayores (Tabla 1). Entre las plantas regeneradas a través de los dos métodos se evidencian diferencias significativas en cuanto a grosor de epidermis superior e inferior, grosor del mesofilo, distancia intervascular, tamaño y densidad de estomas en la haz y el envés, con valores menores en las derivadas de la organogénesis directa, exceptuando la densidad estomática que alcanzó cifras mayores, tanto en la haz como en el envés, en las plantas obtenidas por el método de micropropagación.

DISCUSIÓN

El desarrollo anatómico y fisiológico de las plantas cultivadas *in vitro* resultó afectado por los factores físicos y ambientales relacionados con este tipo de técnica, en especial por la baja intensidad de luz, la alta humedad relativa y la abundancia de nutrientes y azúcares contenidos en el medio de cultivo (Lamhamedi *et al.* 2003; Hazarika 2006; Caio *et al.* 2008).

La alta humedad del medio *in vitro* desencadena en las plantas que se desarrollan en dichas condiciones variadas respuestas anatómicas, entre las que se cuentan: menor grado de lignificación, desarrollo discontinuo de la epidermis y cutícula, ausencia del parénquima en empalizada, poco desarrollo de los estomas (Vieitez *et al.* 1985; Werker & Leshem 1987; Alves & Oliveira 1993).

Estas respuestas se observan también en las hojas de las plantas de mastuerzo regeneradas a partir de los procesos *in vitro*: su mesofilo es homogéneo y su epidermis muestra una notable discontinuidad; asimismo, la lignificación es es-

casa por el poco desarrollo de los casquetes de esclerénquima del nervio medio y además porque los nervios secundarios están reducidos y se presentan en una densidad más baja (reflejada en una mayor distancia intervascular). Se notó además un mayor grado de sinuosidad en las paredes anticlinales de las células epidérmicas, condición que podría responder a la baja luminosidad en el medio *in vitro* donde se desarrollaron. Estudios realizados en ambientes naturales señalan que el grado de ondulación de las paredes anticlinales de la epidermis está relacionado con la intensidad de la luz, observándose que son más rectas en lugares con mayor iluminación y onduladas en hábitats más sombríos (Lindorf 1992).

Se detectaron variaciones en la ubicación de los estomas de las plantas de *Lepidium virginicum* regeneradas *in vitro* con respecto a la planta madre. En condiciones naturales los estomas de las plantas pueden ubicarse al mismo nivel de la epidermis, sobresalir o estar hundidos, dependiendo de la especie y del ambiente donde crecen (Lindorf *et al.* 2006). En las plantas regeneradas se evidenciaron estomas sobresalientes, de tipo higomorfo, como los que suelen presentarse en especies propias de ambientes muy húmedos (Lindorf 1980; Roth 1990).

Trabajos recientes sobre técnicas de cultivo *in vitro* dan cuenta igualmente de poco desarrollo del mesofilo en plantas regeneradas de diferentes especies (Zobayed *et al.* 2001; Hazarika 2006; Yang & Yeh 2008; Caio *et al.* 2008; Robinson *et al.* 2009). Zobayed *et al.* (2001) demostraron también la presencia de estomas sobresalientes en plantas regeneradas *in vitro* sometidas a alta humedad relativa y, de igual manera, Him de Fréitez & Páez de Cásares (2004) destacaron la presencia de estomas higromorfos durante el cultivo *in vitro* de plantas de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae).

Los estomas de las plantas regeneradas de mastuerzo poseen menor tamaño que los de la planta madre pero su densidad es mayor. Zobayed *et al.* (2001) reportan que plantas de *Brassica oleracea* (Brassicaceae) obtenidas *in vitro* presentan incremento de la densidad estomática, mientras que Torres *et al.* (2006) señalan una reducción significativa en las dimensiones estomáticas durante el cultivo *in vitro* de *Cattleya jenmanii* (Orchidaceae). Algunos autores consideran el aumento de la densidad estomática como una estrategia para enfrentar el ambiente húmedo con poca difusión de ventilación de los frascos de cultivo. Caio *et al.* (2008) comprobaron un aumento en la densidad estomática en plantas micropropagadas de *Annona glabra* (Annonaceae) y destacan que los estomas obtenidos *in vitro* presentan poca funcionalidad.

La presencia de azúcar, la acumulación de etileno y la alta humedad relativa en el medio de cultivo afectan el desarrollo normal de los estomas y su capacidad de respuesta frente a las condiciones ambientales *ex situ* pues su poca funcionalidad conduce a un intercambio gaseoso deficiente y a la deshidratación de las plantas que se encuentran en proceso de aclimatación (Díaz-Pérez *et al.* 1995). En algunas especies cultivadas *in vitro* se ha encontrado que la estructura estomática difiere marcadamente de la que muestran las plantas en el campo, particularmente en la forma de las células oclusivas y del poro. Muchos investigadores han repor-

tado además que los estomas no se cierran, posiblemente a causa de un desarrollo anormal de la pared celular o por defectos en la función del protoplasto (Hazarika 2006). Los estomas de las plantas regeneradas de *Lepidium virginicum* son similares bajo microscopía de luz a los de la planta madre, aunque más pequeños; sin embargo, es posible que una observación al microscopio electrónico y el estudio de intercambio de gases aporten nuevas conclusiones.

Se ha enfatizado que los cambios anatómicos y fisiológicos que presentan las plantas *in vitro* dificultan su capacidad de aclimatarse a las condiciones ambientales externas (Zobayed *et al.* 2001). La anatomía observada en las plantas regeneradas *in vitro* de *Lepidium virginicum* podría ser indicativa de una menor capacidad fotosintética y de una mayor susceptibilidad a la deshidratación, sin embargo, sería conveniente realizar estudios ecofisiológicos para determinar el efecto sobre su funcionalidad. Los bajos porcentajes de sobrevivencia obtenidos en esta especie con los métodos de micropropagación y de organogénesis indirecta pudieran estar relacionados con algunas de las variaciones histológicas reportadas y, en definitiva, estas diferencias histológicas deberían asociarse a las condiciones a las cuales son sometidas las plantas durante los procesos *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este estudio morfoanatómico apoyan lo reportado por numerosos autores que insisten en la necesidad de ampliar los estudios de aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*, de manera de incrementar los porcentajes de sobrevivencia de las plantas regeneradas *in vitro* a las condiciones externas de manera progresiva, con el fin de lograr aumentar el porcentaje de sobrevivencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, E. & M. Oliveira. 1993. Selección de material de propagación para siembra. CNPMF. Cruz das Almas. Compendiado en Musarama (FR). 6(3): 12.
- Caio, S., A. Soares, R. Paiva & E. de Castro. 2008. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. *Sci. Hort.* 117: 341-344.
- Calzada, F., E. Barbosa & R. Cedillo-Rivera. 2003. Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Res.* 17: 618-619.
- Chacón-Gamboa, R. 2004. *Estudio anatómico de diez plantas medicinales y espontáneas*. Editorial, Cartago Instituto Tecnológico de Costa Rica / Centro de Información Tecnológica CR.
- Cortés-Arroyo, A., B. Lara-Chacón, & K. Aoki-Maki. 2004. Screening and selection of plants by positive pharmacologic effect on *Jejunum muscular* contractility. *Pharm. Biol.* 1: 24-29.
- Díaz-Pérez, J., K. Shackel & E. Sutter. 1995. Effects of in vitro formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 435-440.

- Hazarika, B. 2006. Morpho-physiological disorders in vitro culture of plants. *Sci. Hort.* 108: 105-120.
- Him de Fréitez, Y. & J. Páez de Cásares. 2004. Anatomía foliar comparada de plantas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivadas en tres ambientes de crecimiento. *Bioagro* 16: 27-30
- Kozel, C. 1991. Guía de medicina natural. Editorial de la misión “La verdad presente”. Décima octava edición. Colombia.
- Lamhanedi, M., H. Chamberland & F. Tremblay. 2003. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to in vitro acclimatization. *Physiol. Pl.* 118: 554-561.
- Lindorf, H. 1980. Estructura foliar de monocotiledóneas de sombra del bosque nublado de Rancho Grande. I. Bifaciales: Araceae, Marantaceae y Musaceae. *Mem. Soc. Ci. Nat. La Salle* 40(113): 19-71.
- Lindorf, H. 1992. Anatomía foliar de especies de un bosque húmedo en el Territorio Federal Amazonas, Venezuela. *Mem. Soc. Ci. Nat. La Salle* 52(137): 65-91.
- Lindorf, H., L. de Parisca & P. Rodríguez. 2006. *Botánica: clasificación, estructura, reproducción*. Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. Primera reimpresión de la segunda edición. Caracas
- Majada, J., F. Tadeo, M. Fal & R. Sánchez-Tamés. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 63: 207-214.
- Marín-Bravo, M. 2003. Histología de la maca, *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). *Revista Peruana Biol.* 10: 101-108.
- Melville, R. 1976. The terminology of leaf architecture. *Taxon* 25: 549-561.
- Metcalf, C. & L. Chalk. 1950. *Anatomy of dicotyledons. Leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. First edition. Clarendon Press. Oxford.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-497.
- Naval, M., M. Gómez-Serranillos, M. Carretero, M. Grupta & A. Villar. 2003. Estudio fitoquímico y de la actividad antiestrés de *Lepidium virginicum* L. II Congreso de Fitoterapia- XXIII Reunión de la AEMN-II Reunión de la SEFIT.
- Osuna, L., M. Tapia-Pérez, O. Figueroa, E. Jiménez-Ferrer, M. Garduño-Ramírez, M. González-Garza, P. Carranza-Rosales & D. Cruz-Vega. 2006. Micropropagation of *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), a plant with antiprotozoal activity. *In Vitro Cell. Developmental Biol., Plant* 42: 596-600.
- Rao, N. & J. Inamdar. 1983. Leaf architectural in the Brassicaceae. *Bot. Mag. (Tokyo)* 96: 15-28.
- Robinson, P., J. Britto & S. Senthilkumar. 2009. Comparative anatomical stu-

- dies on *Emilia zeylanica* C.B. Clarke with *in vitro* regenerated plants. *Middle-East J. Sci. Res.* 4: 140-143.
- Roth, I. 1964. *Microtécnica Vegetal*. Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Roth, I. 1990. *Leaf structure of a Venezuelan cloud forest in relation to the microclimate*. *Encyclopedia of Plant Anatomy*. XIV, 1. Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Torres, J., L. Laskowski & M. Sanabria. 2006. Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmanii* Rolfe. *Bioagro* 18: 93-99.
- Vieitez, A.M., A. Ballester, M.C. San José & E. Vieitez. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. *Physiol. Pl.* 65: 177-185.
- Werker, E. & B. Leshem. 1987. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Ann. Bot.* 59: 377-385.
- Yang, S. & D. Yeh. 2008. *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 93: 201-207.
- Zobayed, S., J. Armstrong & W. Armstrong. 2001. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Pl. Sci.* 161: 537-548.