



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS DE
PLANTAS JÓVENES DE DOS ESPECIES DE *Agave***

JESÚS ADALBERTO JIMÉNEZ TORRES

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: **Efecto de la temperatura en características bioquímico-fisiológicas de plantas jóvenes de dos especies de Agave**, realizada por el alumno: **Jesús Adalberto Jiménez Torres**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. CECILIA BEATRIZ PEÑA VALDIVIA

ASESOR



DR. DANIEL PADILLA CHACÓN

ASESOR



DR. JOSÉ RODOLFO GARCÍA NAVA

ASESOR



DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

ASESORA



DRA. JUANA JUÁREZ MUÑOZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2016

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS DE PLANTAS JÓVENES DE DOS ESPECIES DE *Agave*

Jesús Adalberto Jiménez Torres, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El incremento de las temperaturas diurnas, nocturnas o ambas, como resultado del cambio climático global, puede generar estrés y afectar el desarrollo de las plantas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la temperatura en características bioquímico-fisiológicas de plantas jóvenes de *Agave*. La hipótesis fue que estas plantas ajustan los procesos bioquímicos-fisiológicos independientemente del termoperiodo diurno/nocturno, de su procedencia y de la especie. Dos ensayos se realizaron con un diseño completamente al azar, los resultados se analizaron con ANDEVA y comparación múltiple de medias de Tukey. En uno las plantas de *A. salmiana* se mantuvieron a 25 °C constante día/noche (en cámara con ambiente controlado) o en invernadero (15 d). La temperatura constante incrementó ($P \leq 0.05$) el contenido de fructosa, sacarosa y aminoácidos libres en las hojas y afectó la acumulación de biomasa. En otro ensayo, plantas de *A. salmiana* de tres procedencias y *A. mapisaga* se mantuvieron en termoperiodo de: (1) 25/25, (2) 25/15, (3) 45 °C durante 4 h en termoperiodo 25/15 °C y (4) en invernadero. Las plantas mostraron diferencias significativas en temperaturas de 25/25 y 45°C en las que se observó acumulación de aminoácidos libres y reducción de biomasa.

Palabras clave: *Agave*, termoperiodo, estrés, aminoácidos libres, azúcares.

**EFFECT OF TEMPERATURE IN BIOCHEMICAL-PHYSIOLOGICAL
CHARACTERISTICS OF YOUNG *Agave* PLANTS**

Jesús Adalberto Jiménez Torres, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

The increase of temperatures during the day, night, or both, as result of global climate change, creates stress affecting the development of the plants. The objective of the study was to evaluate the effect of temperature on biochemical-physiological processes of young plants of *Agave*. The hypothesis was that these plants fit the biochemical and physiological processes regardless of the thermoperiod day/night or its origin or species. Two experiments were conducted, the experimental design was completely randomized, the results were analyzed with ANOVA and Tukey multiple comparison. First experiment, *A. salmiana* plants were exposed to constant temperature 25 °C day/night (in growth chamber) and under greenhouse conditions (15 d). Constant temperature increased ($P \leq 0.05$) fructose, sucrose and free amino acids in the leaves and affected dry biomass accumulation. Second experiment, *A. salmiana* with three origins and *A. mapisaga* were exposed to the following temperatures: (1) 25/25, (2) 25/15, (3) 45 °C during 4 h under 25/15 \pm 2 °C day/night termoperiod, and (4) under greenhouse conditions. Plants on 25/25 and 45 °C showed significantly free aminoacid accumulation and biomass loss.

Keywords: *Agave*, thermoperiod, stress, free amino acids, sugars.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT y al Colegio de Postgraduados.

A los miembros de mi consejo particular, a la Dra. Cecilia, Dra. Juana, al Dr. Daniel, Dr. Rodolfo y Dr. Eleazar.

Al Dr. Carlos Trejo.

A mi familia.

Sobre todo, **YHWH**

CONTENIDO

1. INTRODUCCION GENERAL.....	1
2. REVISION DE LITERATURA	8
3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS DE PLANTAS JÓVENES DE <i>Agave salmiana</i>	30
3.1 RESUMEN.....	30
3.2 ABSTRACT.....	31
3.3 INTRODUCCIÓN.....	32
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.6 CONCLUSIONES.....	82
3.7 LITERATURA CITADA	82
4. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN ACUMULACION DE BIOMASA Y CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS Y BIOQUÍMICAS DE DOS ESPECIES DE MAGUEY PULQUERO (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>).....	90
4.1 RESUMEN.....	90
4.2 ABSTRACT.....	91
4.3 INTRODUCCIÓN.....	92
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
4.5 RESULTADOS.....	106
4.6 CONCLUSIONES.....	131
4.7 LITERATURA CITADA	132

LISTA DE CUADROS

3.1 Composición de la mezcla de reacción (10 mL) para cuantificar azúcares en tejidos de maguey (<i>Agave salmiana</i>).	40
3.2 Anchura, longitud y biomasa de hojas, en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí (n=72).	45
3.3 Variables morfológicas y biomasa de plantas (n=36) de <i>A. salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días	46
3.4 Contenido de azúcares solubles de hojas (n=72), en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí	51
3.5 Contenido de azúcares solubles (n=24), en plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí	52
3.6 Contenido de azúcares solubles de hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad (n=36), producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días.....	53
3.7 Contenido de aminoácidos libres y fenoles totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de hojas (n=72), en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí.....	64
3.8 Contenido de aminoácidos libres y fenoles totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h (n=24), en plantas de <i>Agave salmiana</i> , de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o a $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días.....	65
3.9 Contenido de aminoácidos libres y fenoles totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad (n=36), producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días	66
3.10 Permeabilidad relativa (%) de las membranas celulares de la raíz y las hojas de la base, del centro y del ápice de la roseta, al amanecer, atardecer y anochecer (n=3), de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=18).....	77
4.1 Características morfológicas (Mora-López <i>et al.</i> , 2011) de las plantas de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) que permiten reconocer el grado de domesticación de las variantes	100

4.2 Composición de la mezcla de reacción (10 mL) para cuantificar azúcares en tejidos de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>)	104
4.3. Efecto de la temperatura en la biomasa y coeficiente de eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en plantas de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) de cinco meses de edad (n=60)	107
4.4. Efecto de la temperatura en la biomasa húmeda y seca acumulada, y coeficiente de eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en plantas, de cinco meses de edad, de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) obtenidas con semillas recolectadas en tres localidades de Hidlago (n=60).....	108
4.5 Efecto de la temperatura en el contenido de fenoles totales y aminoácidos libres en plantas de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) de cinco meses de edad (n=60).....	117
4.6 Efecto de la temperatura en el contenido de fenoles totales y aminoácidos libres en plantas de dos especies de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>), de cinco meses de edad (n=60)	122
4.7 Efecto de la temperatura en contenido de azúcares solubles en plantas de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) de cinco meses de edad (n=60).....	125
4.8 Efecto de la temperatura en el contenido de azúcares solubles en plantas de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) de cinco meses de edad (n=60).	126

LISTA DE FIGURAS

3.1 Temperatura ambiente promedio de 15 d en el invernadero en el que crecieron las plantas de maguey (<i>Agave salmiana</i>) (n=15).....	38
3.2 Anchura (A) y longitud (B) (mm \pm error estándar) de hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche o termoperiodo 45.5/ 14 \pm 2 °C día/noche (n=36) ..	47
3.3 Biomasa húmeda (A) y seca (B) (g \pm error estándar) en hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche o 45.5/ 14 \pm 2 °C día/noche (n=36)	48
3.4 Contenido de glucosa (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, en hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 °C día/noche (A) o 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B)(n=12).....	54
3.5 Contenido de glucosa (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) en hojas en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche o 45.5/ 14 \pm 2 °C día/noche por 15 días (n=36).....	55
3.6 Contenido de fructosa (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) en hojas, a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche (A) o a 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B) (n=12)	57
3.7 Contenido de fructosa (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) en hojas en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche o 45.5/ 14 \pm 2 °C día/noche por 15 días (n=36).....	58
3.8 Contenido de sacarosa (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) en hojas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, a las 7:00, 12:00 y 19:00 del día, mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche (A) o 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B)(n=12)	59
3.9 Contenido de sacarosa (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) en hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche o 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (n=36)	61
3.10 Contenido de aminoácidos libres (μ mol g ⁻¹ \pm error estándar) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, en hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 \pm 2 °C día/noche (A) o 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B) (n=12)	67
3.11 Contenido de aminoácidos libres (μ moles g ⁻¹ \pm error estándar) en hojas, en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla	

recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=36)	69
3.12. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, en hojas de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche (A) o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (B)(n=12)	72
3.13. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas, en sentido acrópeto, de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=36)	73
3.14 Permeabilidad relativa ($\% \pm$ error estándar) de las membranas celulares, a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, de la raíz y las hojas en la roseta de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche (A) o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche (B) (n=3).....	78
3.15 Permeabilidad relativa ($\% \pm$ error estándar) de las membranas celulares en la raíz y las hojas en la roseta de plantas de <i>Agave salmiana</i> de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=18)	79
4.1 Lugares de recolecta de semillas de variantes de maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i> y <i>A. mapisaga</i>) del estado de Hidalgo	99
4.2 Contenido de biomasa húmeda ($\text{g} \pm$ error estándar) en plantas de <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave mapisaga</i> de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: <i>A. mapisaga</i> Metepec; Tlajo: <i>A. salmiana</i> Tlajomulco; MetSalm: <i>A. salmiana</i> Metepec; y Tlaxiaca: <i>A. salmiana</i> Tlaxiaca.....	109
4.3 Contenido de biomasa seca ($\text{g} \pm$ error estándar) en plantas de <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave mapisaga</i> de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: <i>A. mapisaga</i> Metepec; Tlajo: <i>A. salmiana</i> Tlajomulco; MetSalm: <i>A. salmiana</i> Metepec; y Tlaxiaca: <i>A. salmiana</i> Tlaxiaca.....	110
4.4 Coeficiente de eficiencia fotoquímica del Fotosistema II (\pm error estándar) en plantas de <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave mapisaga</i> de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: <i>A. mapisaga</i> Metepec; Tlajo: <i>A. salmiana</i> Tlajomulco; MetSalm: <i>A. salmiana</i> Metepec; y Tlaxiaca: <i>A. salmiana</i> Tlaxiaca.....	115
4.5 Contenido de fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave mapisaga</i> de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada	

en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca 118

4.6 Contenido de aminoácidos libres ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca 123

4.7 Contenido de glucosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca 127

4.8 Contenido de fructosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca 128

4.9 Contenido de sacarosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca 129

1. INTRODUCCION GENERAL

El incremento en la temperatura global alcanzó 0.6 °C entre 1990 y 2000 y se estimó que debido a este incremento hubo pérdida de 17 % en la productividad agrícola (Madhava *et al.*, 2006). Con el aumento de la temperatura la respiración celular en las plantas puede incrementar y la fotosíntesis neta disminuir (Yamori *et al.*, 2014). Pero las plantas de diversas especies poseen mecanismos de respuesta y adaptación al incremento de la temperatura, y su respuesta puede de ajustes para contrarrestar los efectos de las temperaturas extremas sin disminuir su productividad (Atkin, 2003).

El incremento de la temperatura nocturna es un fenómeno asociado al calentamiento global que incluso puede superar las temperaturas diurnas en algunas regiones del planeta, como en el sureste asiático (Shi *et al.*, 2015), lo que puede afectar considerablemente la productividad vegetal. Las temperaturas nocturnas altas disminuyen 10 % la productividad del cultivo de arroz por cada °C que incrementa la temperatura mínima nocturna, las tasas respiratorias incrementan (Song *et al.*, 2015) y ciertos metabolitos nitrogenados también incrementan (Glaubitx *et al.*, 2015).

Temperaturas nocturnas de 28 °C, similares a las diurnas, inducen estrés en *Phalaenopsis aphroide*, una orquídea MAC, como resultado se inhibe la formación de brotes florales y se acumula sacarosa en el tallo; en contraste, la floración se induce cuando la temperatura nocturna se reduce a 20 °C (Liu *et al.*, 2013).

Diversos metabolitos participan en el alivio del estrés de la planta, la acumulación de carbohidratos en tejidos específicos pueden señalar reacciones del estrés y se relacionan con el metabolismo del N (Farrar *et al.*, 2000). Es el caso de la

prolina, que es un aminoácido que se acumula en la mayoría de las plantas en condiciones de estrés, funciona como osmoprotector, estabiliza las estructuras subcelulares, neutraliza radicales libres y permite mantener la capacidad redox del NADP-NADPH (Hare y Cress, 1997). Los flavonoides son otro tipo de metabolitos, son compuestos polifenólicos que reflejan la luz UV, protegen contra patógenos y tienen funciones antioxidantes (Gill y Tuteja, 2010).

El incremento descontrolado del flujo de iones, al interior o al exterior, a través de las membranas celulares de las plantas se interpreta como pérdida de la integridad de esas estructuras lipídicas y puede deberse al envejecimiento de los tejidos o alteraciones por estrés biótico y abiótico (De Weerd *et al.*, 1995). Las alteraciones biofísicas de las membranas celulares se relacionan con la respuesta bioquímica y fisiológica de la planta a las condiciones ambientales, por lo que su estudio es criterio de identificación de cultivares sensibles y tolerantes a factores generadores de estrés (Bajji *et al.*, 2002).

Diversos tipos de estrés pueden generar desbalance en el transporte de electrones durante la fase fotoquímica de la fotosíntesis, debido a que el receptor final, el NADP, permanece reducido (NADPH) y no acepta más electrones, el exceso de electrones generan especies reactivas del oxígeno que son altamente dañinas para las membranas del tilacoide (Mathur *et al.*, 2014), la evaluación de la fluorescencia de la clorofila es una técnica no destructiva que permite conocer la eficiencia fotoquímica del Fotosistema II (Lambers *et al.*, 2008).

Las plantas con metabolismo ácido crasuláceo (MAC) presentan modificaciones biofísicas, fisiológicas y bioquímicas que optimizan el uso del agua en ambientes

limitantes (Luttge *et al.* 2007). Los magueyes pulqueros *Agave salmiana* y *A. mapisaga* son plantas MAC altamente productivas en ambientes adversos, con rendimientos de 40 t de materia seca ha⁻¹ año⁻¹ (García-Moya *et al.*, 2011). Parte de la importancia del género *Agave* se debe a sus azúcares con índice glucémico bajo (Arrizon *et al.*, 2010), potencial para la producción de biocombustibles (Li *et al.*, 2014; Escamilla-Treviño, 2012) y sus metabolitos secundarios, como saponinas y compuestos fenólicos, tienen importancia económica (Ben Hamissa *et al.*, 2012).

En el centro del país los magueyes pulqueros, *Agave salmiana* y *A. mapisaga*, han sido de gran importancia desde la época precolombina, los vestigios antropológicos de su uso datan de más de 3500 años y el contacto de los humanos con estas especies ha generado grados diversos de humanización, desde el norte hasta el sur de México (Mora-López *et al.*, 2011).

La domesticación del género *Agave* ha generado divergencia morfológica entre las especies silvestres y cultivadas, entre los caracteres seleccionados por el hombre se distinguen: plantas más grandes, que produzcan más savia, contenidos altos de azúcares, contenido y tamaño menores de dientes y púas, además contenido menor de agentes irritantes a la piel que están en sus hojas, como ciertos metabolitos secundarios (Figueredo *et al.*, 2014).

Dada la importancia del género *Agave* por los múltiples productos obtenidos a partir de su biomasa y su adaptabilidad a ambientes limitantes, tomando en cuenta el panorama climático actual y su influencia en la disminución de la productividad de especies vegetales, el presente estudio tuvo como objetivo conocer el efecto de la respuesta en el crecimiento, variables biofísicas y bioquímico-fisiológicas de

temperatura en plantas jóvenes de maguey. Los mecanismos de tolerancia a condiciones que generan estrés se deben en gran parte a respuestas biofísicas y bioquímicas que permiten a la planta desarrollarse y establecerse, por lo cual puede analizarse el contenido de metabolitos específicos que señalizan la condición de estrés o se sobreexpresan para el alivio de ese estrés. Los objetivos fueron:

Evaluar el efecto de temperaturas contrastantes en variables morfológicas, como acumulación de biomasa, azúcares solubles, aminoácidos libres, fenoles totales y permeabilidad relativa de membranas celulares en hojas de plantas jóvenes de *A. salmiana*. La hipótesis fue que estas plantas ajustan los procesos bioquímicos-fisiológicos independientemente del termoperiodo diurno/nocturno.

Evaluar el efecto de la temperatura en la biomasa, el coeficiente de eficiencia fotosintética y el contenido de azúcares solubles, aminoácidos libres y fenoles totales de plantas jóvenes de *A. salmiana* y *A. mapisaga* obtenidas a partir de semillas provenientes de diferentes localidades del Estado de Hidalgo, probablemente con diferente grado de domesticación. La hipótesis fue que estas plantas ajustan los procesos bioquímicos-fisiológicos independientemente del termoperiodo diurno/nocturno, la procedencia y la especie.

1.1 LITERATURA CITADA

ARRIZON, J., MOREL, S., GSCHAEDLER, A. y MONSAN, P. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* 122: 123-130.

- ATKIN, O. 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* 8: 343-351.
- BAJJI, M., KINET, J.-M. y LUTTS, S., 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 36: 61–70.
- BEN HAMISSA, A.M., SEFFEN, M., ALIAKBARIAN, B., CASAZZA, A.A., PEREGO, P. y CONVERTI, A. 2012. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and Bioproducts Processing* 90: 17-21.
- DE WEERD, J.W., HILLER, L.K. y THORNTON, R.E., 1995. Electrolyte leakage of aging potato tubers and its relationship with sprouting capacity. *Potato Research* 38: 257–270.
- ESCAMILLA-TREVIÑO, L.L. 2012. Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops. *BioEnergy Research* 5: 1-9.
- FARRAR, J., POLLOCK, C. y GALLAGHER, J., 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154: 1–11.
- FIGUEREDO, C.J., CASAS, A., COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P. NASSAR, J.M., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., 2014. Morphological variation, management and domestication of maguey alto (*Agave inaequidens*) and maguey manso (*A. hookeri*) in Michoacan, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 10, no. 66.
- GARCIA-MOYA, E., ROMERO-MANZANARES, A. y NOBEL, P.S., 2011. Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy* 3: 4-14.

- GILL, S.S. y TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- GLAUBITZ, U., ERBAN, A., KOPKA, J., HINCHA, D.K. y ZUTHER, E., 2015. Metabolite profiling reveals sensitivity-dependent metabolic shifts in rice (*Oryza Sativa* L.) cultivars under high night temperature stress. *Procedia Environmental Sciences* 29: 72.
- HARE, P.D. and CRESS, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79–102.
- LAMBERS, H., CHAPIN, F., PONS L., 2008. *Plant physiological ecology*. Second Edition Springer. Cheddar, U.K. 604.
- LIU, Y.C., TSENG, K.M., CHEN, C.C., TSAI, Y.T., LIU, C.H., CHEN, W.H. y WANG, H.L., 2013. Warm-night temperature delays spike emergence and alters carbon pool metabolism in the stem and leaves of *Phalaenopsis aphroide*. *Scientia Horticulturae* 161: 198-203.
- LÜTTGE, U. 2007. Photosynthesis. In: Lüttge U. ed. *Clusia* a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity. *Ecological Studies, Vol. 194*, pp. 135-186.
- MADHAVA RAO, K.V., RAGHAVENDRA, A.S. y REDDY, K.J. (eds.), 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Dordrecht: Springer.
- MATHUR, S., AGRAWAL, D. y JAJOO, A. 2014. Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137: 116-126.

- MORA-LÓPEZ, J.L., REYES-AGUERO, J.A., FLORES-FLORES J.L., PEÑA-VALDIVIA C.B., AGUIRRE-RIVERA, J.R., 2011. Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del genero *Agave*. *Agrociencia*, 45, pp. 465-477.
- SHI, W., YIN, X., STRUIK, P.C., XIE, F., SCHMIDT, R.C. y JAGADISH, K.S.V. 2015. Grain yield and quality responses of tropical hybrid rice to high night-time temperature. *Field Crops Research* 190: 18-25.
- SONG, X., DU, Y., ZHAO, Q. y CUI, Y. 2015. Effects of high night temperature during grain filling on formation of physicochemical properties for japonica rice. *Journal of Cereal Science* 66: 74-80.
- YAMORI, W., HIKOSAKA, K. y WAY, D.A. 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research* 119: 101-111

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO PRIMARIO

2.1.1 Metabolismo ácido crasuláceo

Las plantas con metabolismo ácido crasuláceo (CAM) presentan modificaciones fisiológicas, bioquímicas y metabólicas que optimizan el uso del agua en ambientes limitantes. Esas modificaciones les permiten realizar el intercambio de gases y vapor de agua principalmente en la noche, que es el periodo en el que mantienen sus estomas abiertos. El CO₂ es incorporado al fosfoenol piruvato (PEP), que es una molécula de tres carbonos que permite la carboxilación y, con esta, la formación de ácidos orgánicos, como el málico, que es una molécula de cuatro carbonos. Este producto de la incorporación de C es almacenado en la vacuola. En la etapa diurna los estomas de las plantas CAM se cierran y dentro de las células el ácido málico, almacenado durante la noche, se descarboxila e incorpora al ciclo de Calvin-Benson (Luttge *et al.* 2009).

En las plantas CAM los carbohidratos son un factor limitante para la fijación nocturna de C, debido a que la partición de azúcares es necesaria para contar con sustratos como el PEP, es decir, un balance es indispensable. Los azúcares también los demandan los órganos en crecimiento; en este aspecto, los transportadores de azúcares son determinantes para regular el flujo. En muchos casos la inversión en carbohidratos para la carboxilación no reduce la productividad; especies de importancia económica, como la piña (*Ananas comosus*) y varias del género *Agave* pueden competir con la productividad de plantas C₄, como la caña de azúcar (Antony y Borland, 2009).

Las plantas CAM presentan rasgos del metabolismo C₃, como los procesos de carboxilación nocturna y descarboxilación diurna (Antony y Borland, 2009). En general los procesos de las plantas CAM se dividen en cuatro fases;

(a) Fase I: comprende la carboxilación nocturna de la enzima fosfoenolpiruvato-carboxilasa (PEPC) con CO₂ mediante la catálisis y la formación de ácidos orgánicos, como ácido málico, que se almacenan en la vacuola.

(b) Fase II: ocurre en la mañana, e inicia con el cierre estomático. En el género *Clusias* mientras los estomas permanecen abiertos, la PEPC y la enzima ribulosa-3-fosfato-carboxilasa (RubisCO) contribuyen a la fijación de CO₂; en especies con metabolismo intermedio C₃/CAM la RubisCO contribuye mayormente en la fijación de CO₂. En general, la PEPC es desactivada en la fase II y la RubisCO se activa. En *Clusias* una extensión de la Fase II de hasta 4 horas favorece la fijación de CO₂ por PEPC y en *Kalanchoe daigremontiana* la PEPC se inactiva después de 30 minutos; la extensión de la fase II supone mayor eficiencia fotosintética.

(c) Fase III: se realiza durante la etapa diurna del día, incluye la removilización de ácidos orgánicos de la vacuola al citosol, donde se descarboxilan y se produce PEP, parte del C es regenerado a CO₂ y fijado en el Ciclo de Calvin-Benson. El estudio de esta fase por métodos estándar, como intercambio gaseoso es imposible porque los estomas permanecen cerrados, en la fase diurna. Así, esta fase se estudia mediante el análisis de la acumulación de ácidos orgánicos y fluorescencia de la clorofila.

(d) Fase IV: comprende la transición de la III a la I, ocurre al atardecer cuando después del consumo de los ácidos orgánicos inicia la apertura estomática, y la carboxilación ocurre nuevamente. Las fases transicionales II y IV pueden disminuir o

desaparecer su ocurrencia ante estrés hídrico, y en estrés hídrico severo los estomas se mantienen cerrados, incluso durante la noche, por lo que el CO₂ producido en la respiración es reciclado; aunque esta condición no conduce a la ganancia de carbono sí permite sobrellevar periodos de estrés severo (Lüttge 2007).

En condiciones favorables de crecimiento, los tejidos fuente aseguran que los tejidos demanda de la planta utilicen los carbohidratos óptimamente. En general, los niveles bajos de azúcar favorecen la fotosíntesis y la acumulación de azúcares solubles promueve la formación de polisacáridos de reserva. En contraste, el estrés abiótico en muchos casos genera alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, modifica la relación entre los tejidos fuente y demanda, y reducen la acumulación de azúcares en los tejidos fuente. La planta responde a la acumulación de azúcares mediante proteínas sensoras que mediante señales químicas generan respuestas en cascada, como expresión de genes y actividad enzimática; los azúcares y las hormonas actúan como mensajeros y regulan señales para controlar la expresión de genes (Gupta y Kaur, 2005)

2.1.2 Importancia de la sacarosa como molécula de señalización

La sacarosa (Sac) en numerosas especies de plantas es la molécula principal que transporta el C incorporado por la fotosíntesis y el azúcar de almacenamiento breve, también posee funciones reguladoras y de señalización en la planta para modular la fotosíntesis, el almacenamiento de azúcares, la expresión y la supresión de genes. El metabolismo de la Sac está relacionado con el metabolismo del N, en el que los patrones de expresión enzimática se relacionan con el metabolismo de aminoácidos

por exceso o falta de los metabolitos de C. Así, el contenido de Sac de la planta puede representar el balance entre fuente y demanda de fotoasimilados a largo plazo (Farrar *et al.*, 2000).

La glucosa (Glu) también es carbohidrato de señalización. La Glu está asociada al crecimiento de órganos y aporte osmótico que favorece la expansión y división celular. Este azúcar se produce por la degradación de carbohidratos de reserva, como almidón. La Glu forma parte del mecanismo de removilización y señalización en procesos de senescencia; en contraste, la Sac está asociada con la madurez y completa funcionalidad de la planta. Una molécula ejerce su función de señalización cuando se presenta en cierto nivel de concentración, lo que indica que su utilización está más restringida que su producción (Horacio y Martinez-Noel, 2013).

En plantas con estrés abiótico la Sac puede ser la molécula encargada de señalar e inducir la formación de enzimas encargadas de la síntesis de fructanas y almidón, además parece controlar la síntesis de pigmentos, como antocianinas, y está relacionada con la respuesta al daño oxidativo (Van den Ende y El-Esawe, 2014). El estrés por calor y déficit hídrico incrementa la acumulación de Sac en los tubérculos de la papa (Bethke *et al.*, 2009). La acumulación de Sac y la reducción de almidón se observó en arroz (*Oryza sativa* L.) creciendo a temperaturas elevadas de 37°C comparadas con temperaturas de 25 °C y concentraciones altas de CO₂ de 66 Pa en comparación de 33 Pa CO₂ (Hussain *et al.*, 1999).

En contraste, la acumulación de Sac está relacionada con la supresión de la fijación de CO₂, pero es probable que este efecto resulte por limitación de N y P, la Sac también señala el estrés por frío, irradiación alta y concentraciones altas de CO₂; la

Sac juega un papel determinante en la señalización del control y posiblemente en la regulación de la asimilación, transporte y balance de N, mediante la acumulación de la nitrato reductasa (NR; EC 1.1.7.2), la Sac activa la expresión genética y actividad de esta enzima, también estimula la biosíntesis de aminoácidos, ya que promueve la síntesis de enzimas asparaginesintetasa y prolinadeshidrogenasa, estimula la glucolisis de moléculas carbonadas para formar ácidos orgánicos, e incrementa la asimilación de amonio (Horacio y Martinez-Noel, 2013)

2.2 EL CAMBIO CLIMÁTICO Y SUS CONSECUENCIAS EN LA PRODUCTIVIDAD AGRÍCOLA

El cambio climático es una amenaza para la alimentación global. El incremento en la concentración atmosférica de CO₂ observado desde la década de 1960 (Keeling *et al.*, 1976) ha ocasionado incrementos de temperatura, de al menos 0.2 °C por década, en el planeta (Hansen *et al.*, 2006). Las temperaturas elevadas se consideran uno de los factores de estrés abiótico que pueden dañar más la productividad de las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Las enzimas involucradas en la fotosíntesis son altamente sensibles a los incrementos de temperatura y pueden verse afectadas antes que cualquier otro efecto se produzca en la planta (Mathur *et al.*, 2014). Los intervalos de temperatura óptima para la fotosíntesis varían entre las especies y los tipos de metabolismo fotosintético, pero en general los óptimos se ubican entre 20 y 30 °C. Con el aumento de la temperatura la respiración celular también se puede incrementar, esto reduce la fotosíntesis neta por el consumo de carbohidratos en la planta (Yamori *et al.*, 2014).

La respiración además de proveer energía a las células permite la síntesis de sustancias y el crecimiento de las plantas, se realiza en la mitocondria y consiste en la hidrólisis de ciertas moléculas, generalmente productos fotosintéticos, directos o indirectos, con la liberación de energía y CO₂ como subproducto que se libera a la atmósfera. Entre 30 y 80 % del CO₂ fijado fotosintéticamente es liberado nuevamente por la respiración; en conjunto el ciclo de C, en el que participan los componentes bióticos y abióticos, del suelo determina si los ecosistemas son fuente o demanda de CO₂. El aumento en la temperatura global propicia incremento de la respiración celular y de CO₂ liberado a la atmósfera, esto puede causar reducción en la fotosíntesis neta. Las plantas poseen mecanismos de respuesta y adaptación al incremento de la temperatura, según su respuesta pueden ajustarse para contrarrestarlo sin disminuir su productividad (Atkin, 2003).

2.2.1 Temperatura nocturna elevada

El incremento de la temperatura nocturna es un fenómeno que incluso puede superar las temperaturas diurnas en algunas regiones del planeta, como en el sureste asiático (Shi *et al.*, 2015), lo que puede afectar considerablemente la productividad vegetal. En algodón el incremento de la temperatura nocturna desde 24 hasta 27 y 30 °C, en intervalos de 2 horas, incrementaron la respiración foliar y la reducción de ATP, y al aumentar el tiempo a 2 semanas el contenido de azúcares foliares se redujo (Loka y Oosterhuis, 2010). Las temperaturas nocturnas altas también afectan el cultivo de arroz; la productividad se reduce 10 % por cada °C que incrementa la temperatura mínima nocturna; además, la germinación del polen se reduce, la esterilidad de las

espigas y las tasas respiratorias incrementan, la composición del grano se altera, por reducción del contenido de amilosa, modificación la estructura de las amilopectinas y las estructuras cristalinas (Song *et al.*, 2015). También, con las temperaturas nocturnas altas en arroz incrementan ciertos metabolitos, como putrescina, espermina y espermidina, que alteran la biosíntesis de aminoácidos y poliaminas (Glaubitz *et al.*, 2015).

Temperaturas nocturnas de 28 °C, similares a las diurnas, inducen estrés en la orquídea *Phalaenopsis aphroide*, que es una especie MAC. Los productores asiáticos aplican empíricamente tratamientos de temperatura constante (28 °C día/noche) para inhibir la formación de brotes florales, y para inducir la floración reducen la temperatura nocturna, aproximadamente a 20 °C.

La latencia del brote floral también puede alterarse cuando la temperatura es constante en el ciclo diurno/nocturno, el estrés en la planta por la falta de temperaturas nocturnas frías inhibe la floración. En orquídea (*P. aphroide*) se demostraron cambios en el contenido de los metabolitos del C cuando las plantas permanecieron en temperatura diurna/nocturna constante de 28 °C. La acumulación de Sac en los tallos de *P. aphroide* estuvo relacionada con la inhibición de los brotes florales en 60 % en comparación con las plantas testigo que permanecieron con termoperiodo de 28/20 °C día/noche y presentaron 100 % de emergencia del brote y acumularon menos Sac (Liu *et al.*, 2013)

Entre las consecuencias del calentamiento global está la caída de la productividad agrícola. Éste es el caso de algunas especies, como la soya, con incrementos atmosféricos en la concentración de CO₂ e irradiación alta del medio día

pueden reducir la actividad fotosintética debido a disminución en la actividad enzimática (Bunce, 2014).

Por lo anterior y ante el panorama de ambientes climáticos adversos debidos al cambio climático, es indispensable conocer los mecanismos de respuesta de especies vegetales de importancia económica, que toleran temperaturas extremas, déficit de humedad y otros factores ambientales extremos, y permitan identificar la selección y mejoramiento de los recursos vegetales.

2.3 RESPUESTA VEGETAL AL ESTRÉS POR TEMPERATURAS ALTAS

Las plantas poseen mecanismos que les permiten superar el estrés por diferentes factores, entre estos la temperatura extrema y se han clasificado como: escape, tolerancia, aclimatación y adaptación al estrés. La supervivencia de las plantas depende de la habilidad de percibir el estímulo y desencadenar una cascada de señalización y reacciones bioquímicas y fisiológicas que le permitan tolerarlo.

Las temperaturas altas pueden generar estrés oxidativo por incremento en la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). ROS en las plantas son producto del metabolismo celular, su presencia constante puede dañar las funciones y estructuras celulares, por daño en el ADN, proteínas y lípidos. ROS se producen en cloroplasto, mitocondria y peroxisomas. El efecto dañino pueden contrarrestarlo los compuestos antioxidantes producidos por la planta; entre estos, están los compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, los primeros son enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato

peroxidasa, y otras, en el grupo de los no enzimáticos están: ácido ascórbico, tocoferol, flavonoides, prolina y otros (Gill y Tuteja, 2010).

2.3.1 Prolina

La prolina es un aminoácido derivado de la ruta biosintética del glutamato, su estructura le evita reaccionar como los otros aminoácidos, se acumula en la mayoría de las plantas en condiciones de estrés biótico y abiótico, funciona como osmoprotector, estabiliza las estructuras subcelulares, neutraliza radicales libres y permite mantener la capacidad redox del NADP-NADPH. Esto último puede aumentar la actividad oxidativa de la ruta pentosa fosfato, con el aumento de precursores para la síntesis de metabolitos secundarios y de nucleótidos; también, su acumulación representa reservas energéticas disponibles durante la recuperación del estrés, ya que una molécula de prolina puede generar 30 moléculas de ATP (Hare y Cress, 1997). La prolina exógena induce tolerancia a temperaturas elevadas en plantas de *Cicer arietinum* L., reduce el daño celular y aumenta la protección de enzimas (Kaushal *et al.* 2011).

2.3.2 Permeabilidad de las membranas celulares

El flujo iónico y de otras sustancias como azúcares y aminoácidos a través de las membranas celulares es un proceso asociado a su permeabilidad, el incremento descontrolado del flujo de iones a través de las membranas, ya sea hacia el interior o el exterior de la célula se interpreta como pérdida de la integridad de las membranas debida al envejecimiento de tejidos o alteraciones por estrés biótico y abiótico. En

tubérculos de papa (almacenados, la liberación de iones incrementa por daño en las membranas celulares debido al deterioro de los tejidos del tubérculo envejecido (De Weerd *et al.*, 1995). Entre los factores que generan estrés en las membranas están las temperaturas extremas, la sequía, la salinidad y los metales pesados. Las alteraciones en las membranas celulares se relacionan con las respuestas bioquímica y fisiológica de la planta a las condiciones ambientales, por lo que se han considerado criterios de identificación de cultivares sensibles y tolerantes a factores generadores de estrés (Bajji *et al.*, 2002).

2.4 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por las células, que pueden no ser esenciales para el crecimiento y desarrollo, pueden estar presentes en ciertas fases del desarrollo y no detectarse en otras. En las plantas su presencia es esencial para la supervivencia en su medio, y coadyuva a la adaptación y evolución (Viladomat y Bastida, 2015).

Los metabolitos secundarios pueden ser marcadores químicos de las plantas, con aplicación taxonómica, ya que la presencia de algunos de ellos se relaciona con las especies. Además, tienen funciones alelopáticas, permite interacciones simbióticas con microorganismos, de protección contra herbívoros y patógenos, como atrayentes para polinizadores y dispersores de semillas. En dependencia de sus caminos biosintéticos los metabolitos secundarios se clasifican en tres grupos, los glucósidos, lípidos y compuestos nitrogenados; esos caminos metabólicos frecuentemente originan

metabolitos primarios y algunos secundarios, que pueden formarse por combinación de más de una ruta biosintética (Viladomat y Bastida, 2015).

2.4.1 Fenoles

Los grupos estructurales más abundantes de metabolitos secundarios son los fenoles, terpenoides y alcaloides. Los fenoles se caracterizan por tener en su estructura química al menos un anillo aromático con grupos hidroxilo, son originados por diferentes rutas biosintéticas y cumplen con funciones diversas de protección contra patógenos, alelopáticas, antioxidantes (Sonnewald, 2013). Los flavonoides son compuestos polifenólicos que reflejan la luz UV, están involucrados en la fertilidad, protección contra patógenos y son antioxidantes por su potencial de reducción de los radicales hidroxilo en su estructura (Gill y Tuteja, 2010). En *A. durangensis* se han identificado flavonoides como los flavonoles kaempferol y quercitina. En *A. americana* la mayor parte de los polifenoles corresponden a kaempferol (Ben Hamissa *et al.*, 2012).

2.4.2 Saponinas

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, parte del grupo de los metabolitos secundarios, distribuidas ampliamente en el reino vegetal y en algunos organismos marinos, tienen propiedades surfactantes y forman soluciones acuosas jabonosas, sus funciones biológicas parecen relacionarse con estímulos ambientales, y se han identificado como fungicidas, insecticidas, protectores o disuasores de herbívoros y alelopáticas. Los intermediarios químicos, o formas inactivas de saponinas, pueden almacenarse en la célula y en el proceso de infección pueden

sintetizarse o activarse y proteger a la planta. Las saponinas participan indirectamente en el desarrollo de las plantas, ayudan a la cutícula a mantener su flexibilidad y evitar daños mecánicos o invasión de patógenos, también interactúan con reguladores del crecimiento en la modulación del crecimiento de la raíz e indirectamente en la formación de su epidermis (Faizal y Geelen, 2013). Algunos compuestos esteroideos pueden sintetizarse como respuesta al estrés por temperaturas altas (Mathur *et al.*, 2014).

En los humanos algunas saponinas esteroideas, como la diosgenina, tienen actividad antidiabética, antioxidante, estrogenica y antiinflamatoria (Saha *et al.*, 2014). En *A. americana* se han identificado saponinas esteroidales, como agavosidos y agamenosidos, a las que se les atribuyen propiedades farmacológicas, como antiinflamatorios, antihipertensivos y anticancerígenos. La hecogenina, la parte esteroidea en proporción mayor, y es uno de los precursores más importantes para la síntesis de hormonas esteroideas para uso humano, como corticoides, anabólicas y sexuales (Ghoghari y Rajani, 2006).

2.5 IMPORTANCIA DEL GENERO *Agave*

La productividad del genero *Agave* en climas áridos y semiáridos es alta considerando los factores abióticos limitantes, como temperaturas extremas y escasez de agua, de los sitios donde crece naturalmente; la adaptación del genero a esos ecosistemas es una ventaja respecto a otros que no podrían prosperar en las mismas condiciones. En el género hay especies productivas como *A. salmiana* y *A. mapisaga*, con rendimientos de 40 t de materia seca ha⁻¹ año⁻¹ (Garcia-Moya *et al.*, 2011). Parte de la importancia

del género *Agave* se debe a sus azúcares de índice glucémico bajo, utilizados en la industria alimentaria (Arrizon *et al.*, 2010); también es materia prima potencial para la producción de biocombustibles (Li *et al.*, 2014; Escamilla-Treviño, 2012) y algunos de sus metabolitos secundarios, como saponinas y compuestos fenólicos, tienen importancia económica (Ben Hamissa *et al.*, 2012).

El sisal es la fibra natural más importante en el mundo, se obtiene de *A. sisalana*, que puede alcanzar producción mundial de 400 mil t, la fibra representa entre 3 y 5 % del peso total de la planta, y entre 95 y 97 % del peso corresponde a la pulpa, que es considerada un subproducto; de éste 0.21 a 1.25 % corresponde a saponinas, además contiene flavonoides y azúcares estructurales (Ribeiro *et al.*, 2014).

Agave tequilana es una de las especies del género con importancia económica mayor, porque es materia prima para la producción de tequila, posterior a la fermentación de sus azúcares. Las especies de *Agave* son ricas en fructanas; estas moléculas son polisacáridos complejos formados por unidades de fructosa. Aunque las fructanas no son hidrolizadas por las enzimas digestivas humanas, en el colon son fermentadas por la microflora y producen ácidos grasos de cadena corta; esos polisacáridos se emplean en la industria de los alimentos (Narváez-Flores *et al.*, 2015). Las fructanas de *A. angustifolia* mostraron un efecto asociado a la prevención del cáncer en colon humano, por su carácter prebiótico y la disminución de amoníaco (Allsopp *et al.*, 2013).

En el centro del país los magueyes pulqueros, *A. salmiana* y *A. mapisaga*, han sido de gran importancia desde la época precolombina, los vestigios antropológicos de su uso datan de más de 3500 años y el contacto de los humanos con estas especies ha

generado grados diversos de humanización, desde el norte hasta el sur de México (Mora-López *et al.*, 2011). El pulque y el aguamiel son fuente de nutrientes esenciales, como aminoácidos, azúcares y minerales, en zonas rurales (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008; Tovaret *et al.*, 2008).

2.5.1 Adaptaciones fisiológicas y bioquímicas del género *Agave* a ambientes extremos

Entre los mecanismos de adaptación del género *Agave* a ciertas condiciones ambientales está la capacidad de reflejar la luz por las hojas de *A. striata*, debido a la presencia de compuestos polifenólicos, como antocianinas y ceras foliares; estos compuestos dispersan el calor y permiten el alivio no fotoquímico de los complejos cosechadores de fotones (Fondom *et al.*, 2009). Además, debido al incremento atmosférico gradual del CO₂, *A. salmiana* ha incrementado 36 % su asimilación en concentraciones simuladas de 720 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Nobel 1996).

Plantas variegadas de *A. americana* mostraron el efecto antioxidante de diversas enzimas y metabolitos que previenen el daño oxidativo por irradiación intensa (Deng, 2012). En *A. americana* como resultado del estrés por calor, con temperaturas de 45 a 65 °C, se observó la expresión de proteínas específicas del estrés en los estromas, esas proteínas pueden intervenir en funciones metabólicas y responder por la regulación de determinados genes en el núcleo o en el cloroplasto, y a la vez, por el aumento del número de proteínas como resultado del estrés térmico (Shakeel *et al.*, 2013). La expresión de proteínas específicas por efecto de calor se identificó en plantas

de *A. tequilana* y las hojas centrales de la roseta se señalaron como las más termotolerantes (Lujan *et al.*, 2009).

2.6 LITERATURA CITADA

- ALLSOPP, P., POSSEMIERS S., CAMPBELL D., OYARZÁBAL I.S., GILL C. y ROWLAND I. 2013. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22: 38-44.
- ANTONY, E. y BORLAND, A.M. 2009. The role and regulation of sugar transport in plants with Crassulacean acid metabolism. In LÜTTGE, U., BEYSCHLAG, W., BÜDEL, B. y FRANCIS, D. (eds.), 2009. *Progress in Botany* [en línea]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp: 217-146.
- ARRIZON, J., MOREL, S., GSCHAEDLER, A. y MONSAN, P. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* 122: 123-130.
- ATKIN, O. 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* 8: 343-351.
- BAJJI, M., KINET, J.-M. y LUTTS, S., 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 36: 61–70.
- BEN HAMISSA, A.M., SEFFEN, M., ALIAKBARIAN, B., CASAZZA, A.A., PEREGO, P. y CONVERTI, A. 2012. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves

- using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and Bioproducts Processing* 90: 17-21.
- BETHKE, P.C., SABBA, R. y BUSSAN, A.J. 2009. Tuber water and pressure potentials decrease and sucrose contents increase in response to moderate drought and heat stress. *American Journal of Potato Research* 86: 519-532.
- BUNCE, J.A. 2014. Limitations to soybean photosynthesis at elevated carbon dioxide in free-air enrichment and open top chamber systems. *Plant Science* 226: 131-135
- DE WEERD, J.W., HILLER, L.K. y THORNTON, R.E., 1995. Electrolyte leakage of aging potato tubers and its relationship with sprouting capacity. *Potato Research* 38: 257–270.
- DENG, B. 2012. Antioxidative response of Golden Agave leaves with different degrees of variegation under high light exposure. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1925-1933.
- ESCAMILLA-TREVIÑO, L.L. 2012. Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. *BioEnergy Research* 5: 1-9.
- FAIZAL, A. y GEELLEN, D. 2013. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews* 12: 877-893.
- FARRAR, J., POLLOCK, C. y GALLAGHER, J., 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154: 1–11.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A. y CHARLET, L. 2009. Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 8: 81-110.

- FONDOM, N.Y., CASTRO-NAVA, S. y HUERTA, A.J. 2009. Photoprotective mechanisms during leaf ontogeny: cuticular development and anthocyanin deposition in two morphs of *Agave striata* that differ in leaf coloration. *Botany* 87: 1186-1197.
- GARCIA-MOYA, E., ROMERO-MANZANARES, A. y NOBEL, P.S., 2011. Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy* 3: 4-14.
- GILL, S.S. y TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- GLAUBITZ, U., ERBAN, A., KOPKA, J., HINCHA, D.K. y ZUTHER, E., 2015. Metabolite profiling reveals sensitivity-dependent metabolic shifts in rice (*Oryza Sativa* L.) cultivars under high night temperature stress. *Procedia Environmental Sciences* 29: 72.
- GHOGHARI, A.M. y RAJANI, M. 2006. Densitometric determination of hecogenin from *Agave americana* leaf using HPTLC. *Chromatographia* 64: 113–116.
- GUPTA, A.K., KAUR, N., 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.
- HANSEN, J., SATO, M., RUEDY, R., LO, K., LEA, D.W. y MEDINA-ELIZADE, M. 2006. Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14288–14293.

- HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M., ROYCHOWDHURY, R. y FUJITA, M., 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 9643-9684.
- HARE, P.D. and CRESS, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79–102.
- HORACIO, P. y MARTINEZ-NOEL, G. 2013. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior* 10: 12-20.
- HUSSAIN, M.W., ALLEN JR, L.H. y BOWES, G., 1999. Up-regulation of sucrose phosphate synthase in rice grown under elevated CO₂ and temperature. *Photosynthesis Research* 60: 199–208.
- HUXMAN, T.E., HAMERLYNCK, E.P., LOIK, M.E. y SMITH, S.D. 1998. Gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of three south-western *Yucca* species to elevated CO₂ and high temperature. *Plant, Cell & Environment* 21: 1275–1283.
- KAUSHAL, N., GUPTA, K., BHANDHARI, K., KUMAR, S., THAKUR, P. y NAYYAR, H., 2011. Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17: 203-213.
- KEELING, C.D., BACASTOW, R.B., BAINBRIDGE, A.E., EKDAHL, C.A., GUENTHER, P.R., WATERMAN, L.S. y CHIN, J.F. 1976. Atmospheric carbon dioxide variations at Mauna Loa observatory, Hawaii. *Tellus* 28: 538–551.
- LI, H., PATTATHIL, S., FOSTON, M.B., DING, S.-Y., KUMAR, R., GAO, X., MITTAL, A., YARBROUGH, J.M., HIMMEL, M.E., RAGAUSKAS, A.J. y OTHERS 2014. *Agave*

- proves to be a low recalcitrant lignocellulosic feedstock for biofuels production on semi-arid lands. *Biotechnology for Biofuels* 7: 50-61.
- LIU, Y.C., TSENG, K.M., CHEN, C.C., TSAI, Y.T., LIU, C.H., CHEN, W.H. y WANG, H.L., 2013. Warm-night temperature delays spike emergence and alters carbon pool metabolism in the stem and leaves of *Phalaenopsis aphroide*. *Scientia Horticulturae* 161: 198-203.
- LOKA, D.A. y OOSTERHUIS, D.M. 2010. Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. *Environmental and Experimental Botany* 68: 258-263.
- LUJÁN, R., LLEDÍAS, F., MARTÍNEZ, L.M., BARRETO, R., CASSAB, G.I. y NIETO-SOTELO, J. 2009. Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant, Cell & Environment* 32: 1791-1803.
- LÜTTGE, U. 2007. Photosynthesis. In: Lüttge U. ed. *Clusia* a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity. *Ecological Studies*, 194: 135-186.
- MAKKAR, H.P., SIDDHURAJU, P. y BECKER, K. 2007. Saponins. *Plant Secondary Metabolites* [en línea]. S.l. Springer, pp. 93–100.
- MATHUR, S., AGRAWAL, D. y JAJOO, A. 2014. Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137: 116-126.
- MORA-LÓPEZ, J.L., REYES-AGÜERO, J.A., FLORES-FLORES, J.L., PEÑA-VALDIVIA, C.B. y AGUIRRE-RIVERA, J.R. 2011. Variación morfológica y

- humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. *Agrociencia* 45: 465–477.
- NARVÁEZ-FLORES, M., SÁNCHEZ-MADRIGAL, M.Á., QUINTERO-RAMOS, A., PAREDES-LIZÁRRAGA, M.A., GONZÁLEZ-LAREDO, R.F., RUIZ-GUTIÉRREZ, M.G., PIÑÓN-CASTILLO, H.A. y MELÉNDEZ-PIZARRO, C.O. 2015. Ultrasound assisted extraction modeling of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) at different temperatures and ultrasound powers. *Food and Bioprocess Processing* 96: 232-239.
- NOBEL, P.S. 1990. Environmental influences on CO₂ uptake by agaves, CAM plants with high productivities. *Economic Botany* 44: 488–502.
- NOBEL, P.S. 1996. Responses of some North American CAM plants to freezing temperatures and doubled CO₂ concentrations: implications of global climate change for extending cultivation. *Journal of Arid Environments* 34: 187–196.
- ORTIZ-BASURTO, R.I., POURCELLY, G., DOCO, T., WILLIAMS, P., DORNIER, M. y BELLEVILLE, M.-P. 2008. Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3682-3687.
- PETRIDIS, A., THERIOS, I., SAMOURIS, G., KOUNDOURAS, S. y GIANNAKOULA, A. 2012. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 1-11.

- RIBEIRO, B.D., BARRETO, D.W. y COELHO, M.A.Z. 2014. Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization of saponins from sisal (*Agave sisalana*) waste. *Food and Bioproducts Processing* 94: 601-609.
- SAHA, S., GOSWAMI, G. y PANDRANGI, A. 2014. Isolation and prevention of calcium oxalate-induced apoptotic death and oxidative stress in MDCK cells by diosgenin. *Chemico-Biological Interactions* 224: 51-57.
- SHAKEEL, S.N., AMAN, S., HAQ, N.U., HECKATHORN, S.A. y LUTHE, D. 2013. Proteomic and Transcriptomic Analyses of *Agave americana* in Response to Heat Stress. *Plant Molecular Biology Reporter* 31: 840-851.
- SHI, W., YIN, X., STRUIK, P.C., XIE, F., SCHMIDT, R.C. y JAGADISH, K.S.V. 2015. Grain yield and quality responses of tropical hybrid rice to high night-time temperature. *Field Crops Research* 190: 18-25.
- SONG, X., DU, Y., ZHAO, Q. y CUI, Y. 2015. Effects of high night temperature during grain filling on formation of physicochemical properties for japonica rice. *Journal of Cereal Science* 66: 74-80.
- SONNEWALD, U. 2013. Physiology of Metabolism. En: A. BRESINSKY, C. KÖRNER, J.W. KADEREIT, G. NEUHAUS y U. SONNEWALD, *Strasburger's Plant Sciences* [en línea]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 239-409.
- TOVAR, L.R., OLIVOS, M. y GUTIERREZ, M.E. 2008. Pulque, an alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase. Its *in vitro* effects on corn tortilla. *Plant Foods for Human Nutrition* 63: 189-194.

- VAN DEN ENDE, W. y EL-ESAWI, S.K. 2014. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany* 108: 4-13.
- VILADOMAT, F. y BASTIDA, J. 2015. General overview of plant secondary metabolism. En: B. BAHADUR, M. VENKAT RAJAM, L. SAHIJRAM y K.V. KRISHNAMURTHY (eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. New Delhi: Springer India, pp. 539-568.
- YAMORI, W., HIKOSAKA, K. y WAY, D.A. 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research* 119: 101-111.

3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS DE PLANTAS JÓVENES DE *Agave salmiana*

3.1 RESUMEN

El incremento de las temperaturas diurnas, nocturnas o ambas, como resultado del cambio climático global, altera la acumulación de metabolitos y afecta el desarrollo de las plantas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la temperatura en procesos bioquímico-fisiológicos de plantas jóvenes de *A. salmiana*. La hipótesis fue que estas plantas ajustan los procesos bioquímicos-fisiológicos independientemente del termoperiodo diurno/nocturno. Las plantas se obtuvieron de semillas recolectadas en San Luis Potosí, en cámara con ambiente controlado, temperatura 25°C día/noche y fotoperiodo 12:12 h. Después de 6.5 meses un grupo permaneció en la cámara y otro se trasladó al invernadero por 15 días con fotoperiodo y termoperiodo natural. El diseño experimental fue factorial completamente al azar ($n=15$), con los factores (niveles): hoja (5), hora de muestreo (7:00, 12:00 y 19:00) y temperatura (25/25°C y 45.5/14 °C). Los resultados se analizaron con ANDEVA, y comparación múltiple de medias de Tukey. Las plantas en 25/25 °C mostraron mayor longitud, anchura, biomasa fresca y contenido de Fru, Sac y AminoácL que las plantas en 45.5/14 °C, pero estas acumularon más biomasa seca y FenolT ($P \leq 0.05$). En ambos regímenes térmicos los procesos bioquímicos-fisiológicos, relacionados con la concentración de osmolitos se ajustan en las hojas en forma variada.

Palabras clave: maguey, termoperiodo, azúcares solubles, aminoácidos libres, estrés.

3. EFFECT OF THE TEMPERATURE ON THE GROWTH AND BIOCHEMICAL-PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS IN YOUNG *Agave salmiana* PLANTS

3.2 ABSTRACT

The increase of temperatures during the day, night or both, as a result of global climate change, alters accumulation of metabolites and affects the development of the plants. The objective of the study was to evaluate the effect of temperature on biochemical and physiological processes of young plants of *A. salmiana*. The hypothesis was that these plants fit the biochemical and physiological processes regardless of the thermoperiod day/night. Plants produced from seeds collected in San Luis Potosí, in chamber with controlled environment, temperature of 25 °C day/night and fotoperiod 12:12 h. After 6.5 months a group remained at the camera and another moved to the greenhouse for 15 days with photoperiod and natural thermoperiod. The experimental design was factorial completely randomized (n = 15), with factors (levels): blade (5), time of sampling (7:00, 12:00 and 19:00) and temperature (25/25 °C and 45.5/14 °C). The results were analyzed with ANOVA and Tukey multiple comparison. Plants in 25/25 °C showed significantly greater length, width, fresh biomass and contents of Fru, Sac and AminoacL. Plants in 25/25 °C showed significantly greater length, width, fresh biomass and contents of Fru, Sac and AminoacL than plants in 45.5/14 °C, but these accumulated more dry biomass and FenolT. In both thermal regimes biochemical-physiological processes, related to the concentration of osmolytes are adjusted in leaves in varied way.

Keywords: maguey, thermoperiod, soluble sugars, free amino acids, stress.

3.3 INTRODUCCIÓN

Las plantas MAC presentan cuatro fases en su proceso fotosintético; en la fase I, durante la noche y con la apertura de los estomas, el CO₂ se incorpora al fosfoenolpiruvato (PEP) y se forman ácidos orgánicos que se almacenan en la vacuola; la fase II es transicional entre la fase oscura y la diurna, se presenta al amanecer con el cierre estomático, en esta fase la enzima PEPcarboxilasa (EC 4.1.1.2) puede mantenerse activa y continuar carboxilando; durante la fase III, en el día y con los estomas cerrados, los ácidos orgánicos se movilizan de la vacuola al citosol, donde se descarboxilan, el CO₂ de este proceso de descarboxilación se envía a los cloroplastos y forma azúcares con la intervención de la enzima Rubisco (EC 4.1.1.39), en el ciclo de Calvin Benson; en la fase IV que también es transicional, entre la fase luminosa y oscura, la enzima Rubisco puede continuar carboxilando, pero aunque inicia la apertura de estomas su actividad se inhibe por la falta de luz (Lüttge, 2007).

Durante la fase III aproximadamente 75 % del C producto de la descarboxilación del ácido málico es reciclado y se almacena como almidón en el cloroplasto o como azúcares solubles en la vacuola, estos proveen el PEP a la fase I. El 25% de C restante puede emplearse para crecimiento. En las plantas MAC hasta 20 % del peso seco corresponde a azúcares de reserva; la glucólisis, la gluconeogénesis y el transporte de azúcares en las zonas de crecimiento y almacenamiento están reguladas por señalización (Antony y Borland, 2009).

Para que una molécula ejerza su función como señal debe superar cierto nivel de concentración; esto muestra que su utilización está más restringida que su producción. La sacarosa (Sac) es la molécula principal, en numerosas especies, de

transporte de los productos fotosintéticos y el sustrato principal de almacenamiento de azúcares; además, posee funciones reguladoras y de señalización que modulan la fotosíntesis. El contenido de Sac de la planta representa el balance relativo entre oferta y demanda de fotoasimilados (Farrar *et al.*, 2000). En condiciones de estrés abiótico, Sac en las plantas puede inducir señales que activan la síntesis de enzimas encargadas de la formación de fructanas e influye en el control de la síntesis de pigmentos no fotosintéticos, como antocianinas (Van den Ende y El-Esawe, 2014).

Sac además está relacionada con el metabolismo del N, en el que los patrones de expresión enzimática relacionada con el metabolismo de aminoácidos se da en conjunto por exceso o defecto del metabolismo del carbono (Farrar *et al.*, 2000); Sac estimula la biosíntesis de aminoácidos, promueve la síntesis de enzimas asparagina sintetasa (EC 6.3.5.4) y prolina deshidrogenasa (EC 1.5.5.2), e incrementa la asimilación de amonio, con lo que se favorece la acumulación de la nitrato reductasa (EC 1.1.7.2) (Horacio y Martínez-Noel, 2013).

La importancia de Sac como molécula involucrada en la regulación del metabolismo del N toma relevancia al participar en la actividad de enzimas antioxidantes en condiciones de estrés abiótico. La aplicación de Sac exógena a plántulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) en temperaturas bajas incrementó la actividad enzimática antioxidante y la concentración de prolina (Cao *et al.*, 2014). Un efecto similar se observó en plantas de la misma especie en estrés por déficit de humedad (Cao *et al.*, 2015). Lo anterior demostró que Sac tiene un papel en la señalización para la regulación de la asimilación, transporte y balance de N y los compuestos nitrogenados (Horacio y Martínez-Noel, 2013).

En general, las especies del género *Agave*, como *Agave salmiana* y *A. mapisaga*, son altamente productivas; obtienen rendimientos de 40 t de materia seca ha⁻¹ año⁻¹. Debido a que son plantas MAC y por sus características morfológicas, anatómicas y fisiológicas son un cultivo idóneo en regiones áridas y semiáridas, donde otros cultivos no prosperan (García *et al.*, 2011). Actualmente la importancia del género *Agave* se concentra en el uso de sus azúcares con índice glucémico bajo, que se utilizan en la industria de los alimentos (Arrizon *et al.*, 2010); también, son materia prima para la producción de biocombustibles (Escamilla-Treviño, 2012), de metabolitos secundarios de importancia económica, como saponinas y compuestos fenólicos (Ben Hamissa *et al.*, 2012).

El incremento en la temperatura global alcanzó 0.6 °C entre 1990 y 2000; y se estimó una pérdida de 17 % en la productividad agrícola debido a este incremento (Madhava *et al.*, 2006). Las plantas, por ser organismos sésiles, poseen mecanismos de adaptación a temperaturas elevadas. Entre estos están los mecanismos de escape y tolerancia, que permiten completar el desarrollo de la planta. Como parte de esos mecanismos se ha observado la sobreexpresión de osmoprotectores, como la prolina, acumulación de metabolitos secundarios antioxidantes y otras respuestas metabólicas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

La prolina es un aminoácido que forma parte de las proteínas, cuando está libre en las células tiene un papel osmoprotector y antioxidante; este aminoácido está presente en la mayoría de las plantas y su concentración incrementa en respuesta al estrés biótico y abiótico; con el incremento estabiliza las funciones celulares y favorecer

la recuperación del estrés (Hare y Cress, 1997). La aplicación exógena de prolina protege a la planta del estrés por temperaturas elevadas (Kaushal *et al.*, 2011).

El estrés abiótico es la expresión de algunas alteraciones en el metabolismo, generalizado o particular, como el de los carbohidratos. En dependencia del tipo de estrés y la especie puede modificarse la relación de azúcares entre los tejidos fuente y demanda. La acumulación de azúcares en tejidos fuente disminuye la actividad fotosintética. En este proceso se generan señales y respuestas en cascada, en las que participan proteínas sensoras, expresión de genes y actividad enzimática (Gupta y Kaur, 2005).

El incremento de la temperatura nocturna, que en ocasiones puede ser mayor a las diurnas, es un fenómeno que afecta el metabolismo de las plantas (Glaubitz *et al.*, 2015). Temperaturas nocturnas similares a las diurnas, de 28 °C, propician estrés en orquídea (*Phalaenopsis aphroide*), que es una planta MAC. En este caso, los productores asiáticos mantienen constante la temperatura, 28 °C día y noche, con lo que se inhiben la inducción de brotes florales; luego, para inducir la floración la temperatura nocturna se reduce, alrededor de 20 °C. El cambio sucede porque la latencia del brote floral se interrumpe con la temperatura nocturna fresca. Con la temperatura constante día/noche, e inhibición de 60 % de los brotes florales, Sac se acumula en los tallos, en contraste con el control en termoperiodo de 28/20 °C día/noche, con 100 % de emergencia de los brotes florales y concentración de Sac menor (Liu *et al.*, 2013).

En arroz (*Oryza sativa* L.) la acumulación de Sac y la disminución de almidón se observó cuando la temperatura y la concentración de CO₂ aumentaron (Hussain *et al.*,

1999); además, con las temperaturas nocturnas altas la productividad se reduce (Shi *et al.*, 2015) e incrementa la biosíntesis de aminoácidos y poliaminas en cultivares sensibles (Glaubitz *et al.*, 2015).

En algodón las temperaturas altas nocturnas incrementan la respiración (Loka y Oosterhuis, 2010) y en papa (*Solanum tuberosum* L.) las temperaturas altas diurnas en combinación con déficit hídrico incrementa la acumulación de Sac en los tubérculos (Bethke *et al.*, 2009).

El incremento en el flujo de iones a través de las membranas celulares se interpreta como pérdida de la integridad de las membranas. El incremento se ha cuantificado en plántulas y plantas de frijol, maíz, nopal, maguey y *Antirrhinum majus* L. mantenidas en condiciones de estrés por déficit de humedad, envejecimiento de los tejidos, y temperaturas extremas (García *et al.*, 2007 y 2008; Maki *et al.*, 2010; Morales, 2015; Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2003 y 2005; Tsougkrianis *et al.*, 2007).

El flujo de iones a través de las membranas celulares se relaciona con la actividad bioquímica y fisiológica de las plantas; por lo que, su estabilidad puede ser un criterio para identificar cultivares y tipos silvestres resistentes y sensibles al estrés (Bajji *et al.*, 2002). El flujo de iones a través de las membranas celulares también se relaciona con el envejecimiento de tejidos, como se observó en tubérculos de papa (De Weerd *et al.* 1995) y tallos florales de *Antirrhinum majus* L. (Maki *et al.*, 2010). Específicamente, el incremento de la temperatura ambiental aumenta el flujo iónico de la membrana tilacoidal, que no se asocia con la reducción del gradiente energético pero sí con el incremento del gradiente del pH (Madhava *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura en variables morfológicas, acumulación de biomasa, azúcares solubles, aminoácidos libres, fenoles totales y permeabilidad relativa de membranas celulares de plantas jóvenes de *A. salmiana*. La hipótesis fue que estas plantas ajustan los procesos bioquímicos-fisiológicos independientemente del termoperiodo diurno/nocturno.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal

Semillas de *A. salmiana* se cosecharon de infrutescencias de plantas del Estado de San Luis Potosí. Las semillas se germinaron en cámara con ambiente controlado, a 25 ± 2 °C día/noche y fotoperiodo de 12/12 h con intensidad luminosa de $30 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se mantuvieron durante tres meses en charola de germinación con sustrato comercial (peat moss/agrolita/vermiculita), posteriormente cada planta se trasplantó a macetas de 375 mL con tierra agrícola proveniente de los campos del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. Las plantas permanecieron hasta la edad de 6.5 meses en esta condición hasta que se desarrolló el estudio.

3.4.2 Establecimiento del experimento

Las plantas se separaron en dos grupos, uno permaneció en la cámara de crecimiento y otro se mantuvo 15 d en un invernadero sin control de temperatura ambiente. En la cámara la temperatura se mantuvo constante a 25 ± 2 °C en las condiciones ya descritas anteriormente también durante 15 días. En el invernadero, el termoperiodo

medio fue 32.5/14 °C, diurno/nocturno; con temperatura máximas de 47 °C durante 2 h en la tarde (1 a 2 pm) y una media máxima de 45.5 ± 2 °C (Figura 3.1), la intensidad luminosa promedio al medio día fue 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se colocó malla sombra (antiafidos color blanca) encima de las plantas, que disminuyó la irradiación a 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al nivel de las plantas.

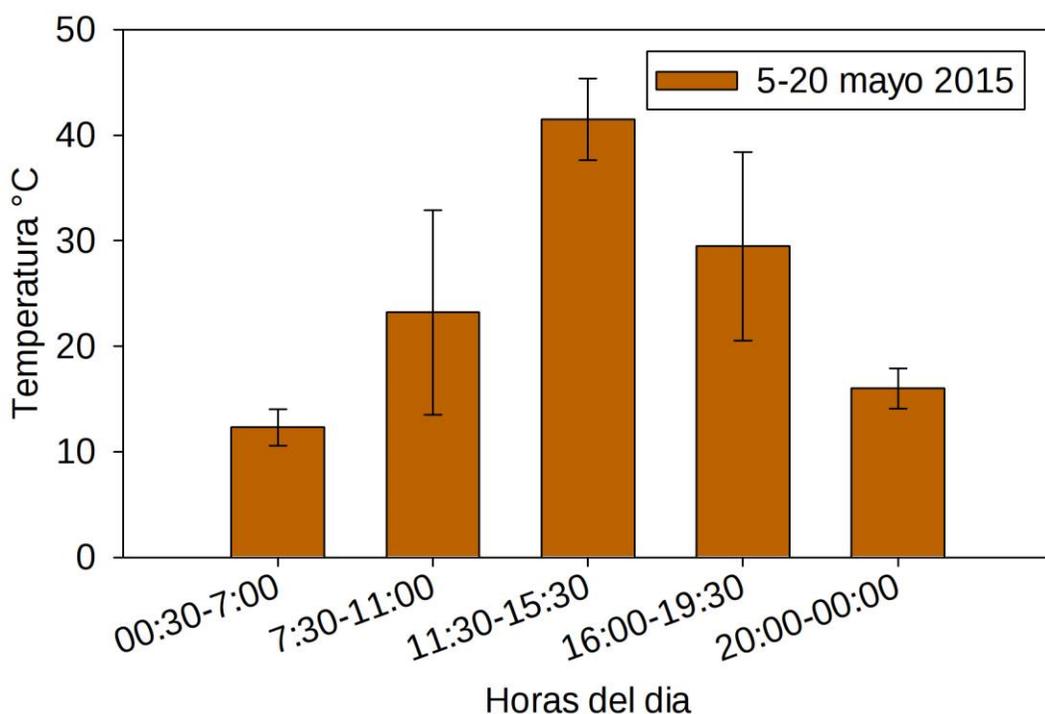


Figura 3.1 Temperatura ambiente promedio de 15 d en el invernadero en el que crecieron las plantas de maguey (*Agave salmiana*) (n=15).

3.4.3 Variables evaluadas

Las variables de la planta fueron altura, diámetro y biomasa húmeda y seca; en las hojas se midió longitud y anchura, biomasa húmeda y seca, contenido de glucosa

(Gluc), fructosa (Fruc), sacarosa (Sac), aminoácidos libres (AminoácL) y fenoles totales (FenoIT), y permeabilidad relativa de las membranas celulares (PRMC).

3.4.4 Determinación de variables

La altura y diámetro de la base de la planta y longitud y anchura de las hojas se midieron con un vernier digital (Mitutoyo, Digimatic SR44, Japón, precisión ± 0.01 mm). La biomasa se evaluó en una balanza analítica (Marca Scintech Modelo No: SA120, precisión ± 0.0001 g). Para obtener la biomasa húmeda y seca de las hojas se pesaron individualmente antes de congelarlas en nitrógeno líquido, se almacenaron a -20 °C hasta el momento en que se deshidrataron por liofilización (Labconco® modelo Free Zone 6, Kansas City, MO, EE.UU. Las hojas deshidratadas se trituraron en mortero y se mantuvieron en un desecador a temperatura ambiente (una a dos semanas) hasta la evaluación de su composición química parcial.

3.4.5 Determinación enzimática de azúcares solubles

Para cuantificar el contenido de Gluc, Fruc y Sac se obtuvo el extracto etanólico de 20 a 30 mg de los tejidos foliares, deshidratados y triturados. El tejido se colocó en viales plásticos de 2 mL, se añadieron 800 μ L de etanol al 80 % en agua (v:v). Los viales se calentaron en baño maría a 80 °C, por 30 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 32,200 *g* por 10 min. El sobrenadante se cuantificó y separó con micropipeta y se colocó en un vial plástico de 2 mL, se clarificó con una pizca de carbón activado, se agitó en vortex, y el carbón activado se asentó por centrifugación a 32,200 *g* por 10 min.

Los azúcares se cuantificaron por el método descrito por Viola y Davies (1992) modificado. En cada pozo de una microplaca NUNC-F (de 96 pozos) se agregaron 150 μL de la mezcla de reacción (Cuadro 3.1) y 10 μL de alícuota del extracto etanólico de la muestra, luego se agregaron 0.15 U de enzima hexoquinasa (EC 2.7.1.1), disuelta en 10 μL de mezcla de reacción, la microplaca se mantuvo a 37 °C por 10 min, se agitó por 3 min y se realizó una lectura a 340 nm en el espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo UV-Vis, modelo Multiskan FC).

Cuadro 3.1 Composición de la mezcla de reacción (10 mL) para cuantificar azúcares en tejidos de maguey (*Agave salmiana*).

Compuesto	Concentración	Volumen
HEPES pH 8.0	500mM	2.00 MI
KCl	200mM	2.50 MI
MgCl ₂	200mM	150.00 μL
ATP		0.0085 g
NAD		0.00283 g
H ₂ O		5.40 MI

Enseguida, 0.12 U (10 μL^{-1}) de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (g6pdh; EC 1.1.1.49) se agregaron a la mezcla y se mantuvo en la microplaca a 37 °C por 30 min después de agitar se leyó a 340 nm. El procedimiento se repitió con 0.12 U (10 μL^{-1}) de

glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9) y con invertasa (β -fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26), en el último caso se mantuvieron a 30 °C por 45 min.

Así, se obtuvieron cuatro lecturas espectrofotométricas, con ellas se calcularon las concentraciones de Gluc, Fruc y Sac, por diferencia y con la curva de calibración de Glu (10 mM).

3.4.6 Determinación colorimétrica de aminoácidos libres en microplaca

El contenido de AminoácL se cuantificó con el método descrito por Jones *et al.* (2002) modificado. Setenta y cinco μ L de los mismos extractos etanólicos que se utilizaron para cuantificar los azúcares se colocaron en los pozos de la microplaca, se mezclaron con 25 μ L de etanol al 80 % (en agua v:v) y 75 μ L de solución de ninhidrina (2 % en etanol, p:v), la microplaca se mantuvo a 80 °C por 30 min, se dejó enfriar y se añadieron 100 μ L de mezcla estabilizadora de etanol al 50 % (en agua v:v), se agitó por 30 s y se leyó la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro (Thermo UV-Vis Multiskan FC). La concentración se determinó con la curva estándar glicina (1 mM).

3.4.7 Determinación colorimétrica de fenoles totales en microplacas

Los FenolT se evaluaron con el método descrito por Magalhães *et al.* (2010) con modificaciones. En los pozos de una microplaca se añadieron 50 μ L del extracto etanólico, se les añadieron 50 μ L del reactivo Folin Ciocalteu, disuelto 1:20 en agua destilada (v:v), se agregaron 100 μ L de NaOH 175 mM, para iniciar la reacción. La mezcla se mantuvo 3 min a 30 °C, enseguida se agitó y la absorbancia se determinó a

620 nm en el espectrofotómetro (Thermo UV-Vis, Multiskan FC). El contenido de fenoles se expresó como μ moles de ácido gálico por g de tejido seco, para esto se utilizaron curvas de calibración de ácido gálico (10 mM). De acuerdo con Magalhaes *et al.* (2010) el reactivo Folin-Ciocalteu puede reaccionar con ácidos orgánicos y azúcares solubles, por lo que el contenido de fenoles se determinó con curvas estándar de ácido málico 5 mM, Gluc 10 mM, glicina 1 mM y como control negativo ácido cinámico 5 mM.

3.4.8 Determinación de permeabilidad de membranas celulares en hojas y raíz

La permeabilidad de las membranas celulares se cuantificó en las hojas y la raíz frescas con el método descrito por Huang (2006), con algunas modificaciones. Las plantas se dividieron e hojas y raíz e inmediatamente se determinó su biomasa en una balanza analítica (Scentiech, No: SA120, precisión ± 0.0001 g). Luego cada hoja se seccionó transversalmente, los tejidos se lavaron brevemente con agua destilada, se eliminó el exceso de agua, y se colocaron en recipiente plásticos con 50 mL de agua destilada. Los recipientes se mantuvieron en un agitador orbital, con agitación (a 120 rpm), a temperatura ambiente (25 ± 2 °C); la conductividad eléctrica, en 100 μ L del medio acuoso, se midió con un conductímetro (Horiba B-173), cada 30 min por 3 h. En este tiempo la conductividad del medio se estabilizó. Después, los tejidos se recolectaron, se congelaron a -20 °C para lisar las células, se colocaron en 50 mL de agua destilada y se midió la conductividad eléctrica como se describió antes. La conductividad eléctrica del agua destilada se midió inicialmente para asegurar que fuera cero.

La integridad de las membranas se cuantificó indirectamente mediante los cambios en la conductividad eléctrica del medio acuoso con la siguiente relación:

$$\text{Permeabilidad relativa (\%)} = \frac{\text{Conductividad eléctrica inicial (tejido fresco)}}{\text{Conductividad eléctrica final (tejido congelado)}} \times 100$$

El análisis del porcentaje de permeabilidad de las membranas celulares se realizó a los 15 días del tratamiento durante las tres horas del día ya mencionadas, las evaluaciones se hicieron en las hojas, que se agruparon en ápicales, centrales y basales, y en la raíz.

3.4.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Las evaluaciones se hicieron en las hojas (nomófilos) dos a seis de la roseta, que son las que estaban expuestas durante las evaluaciones. El cotiledón y primer nomófilo no se evaluaron porque no estaba en todas las plantas o parecían senescentes.

El diseño experimental fue factorial completamente al azar, con tres factores de niveles variables: hoja (5), hora de muestreo (7:00, 12:00 y 19:00) y temperatura (25/25°C y 45.5/14 °C). La unidad experimental fue una planta (n=15). Los resultados se analizaron con ANDEVA y comparación múltiple de medias, entre las hojas, los tiempos de muestreo y los niveles de temperatura, con la prueba de Tukey, con el programa estadístico SAS 9.4. Se empleó el programa Sigma Plot (Ver 10) para graficar los datos donde fue pertinente.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Morfología y biomasa

En promedio las plantas al inicio del estudio mostraban 88.522 mm de altura y la roseta tenía 11.953 mm de diámetro; además, habían acumulado 6.240 g de materia húmeda y sus tejidos contenían únicamente 7.70 % de materia seca (0.480 g por planta).

Cuando las evaluaciones se hicieron las plantas tenían 7 meses de edad, varias unidades experimentales ya no tenían el cotiledón ni la primera hoja en la roseta, estaban dañados o parecía senescente; por esto, las evaluaciones se hicieron en las hojas (nomófilos) Núm. 2 a 6, en sentido acrópeto.

Se observó un efecto significativo ($P \leq 0.05$) de los factores temperatura y número de hoja con respecto a las variables anchura, longitud, biomasa fresca y seca, sin embargo, ninguna de las interacciones mostraron diferencias significativas, el factor hora no mostró diferencia estadística en las variables evaluadas.

En las plantas de maguey las hojas en la roseta se exponen en sentido acrópeto. En este estudio, en promedio las hojas en la roseta mostraron un gradiente de crecimiento opuesto a su edad, la excepción fue la hoja Núm. 6, la más joven. Así, en promedio la anchura de la hoja Núm. 2, en la base de la roseta y con la edad mayor de las que se evaluaron, tenía la mitad de la anchura y longitud que la hoja Núm. 5. Además, las hojas en la base mostraban entre 17 y 21 % de biomasa seca y húmeda comparadas con la hoja Núm. 5. La hoja Núm. 6 presentó crecimiento menor debido a que era la hoja más joven y en el momento de las evaluaciones estaba recientemente expuesta (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2 Anchura, longitud y biomasa de hojas, en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí (n=72).

Hoja (Núm.)	Anchura (mm)	Longitud (mm)	Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)
2	7.242 d	44.604 d	0.391 e	0.024 d
3	9.669 c	57.836 c	0.767 d	0.049 c
4	12.996 b	73.447 b	1.411 b	0.095 b
5	15.630 a	80.387 a	1.902 a	0.140 a
6	12.550 b	61.524 c	1.152 c	0.096 b
DMS	1.1638	4.7157	0.1857	0.0125

DMS: diferencia mínima significativa, medias con letras diferentes en las columnas son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$)

Estos resultados indicaron que las plantas de *A. salmiana* de 7 meses de edad asignaron cantidad mayor de recursos para el desarrollo de las hojas más jóvenes en la roseta que para las de más edad (Cuadro 3.2).

La temperatura constante (25 °C día/noche) promovió el crecimiento mayor de la planta, en altura (13 %) y diámetro máximo de la roseta (8 %), y en biomasa húmeda total acumulada (17 %) por planta en comparación con la condición 45.5/14 °C. En

contraste, ésta última incrementó (32 %) la biomasa seca acumulada por planta (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3 Variables morfológicas y biomasa de plantas (n=36) de *A. salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días.

Temperatura (°C)	Altura (mm)	Diámetro máximo de la roseta (mm)	Biomasa	
			Húmeda	Seca
25.0 ± 2	93.881 a	12.413 a	6.724 a	0.414 b
45.5 ± 2	83.162 b	11.493 b	5.755 b	0.547 a
DMS	7.2625	0.6173	0.7266	0.0529

DMS: diferencia mínima significativa, valores seguidos con letras diferentes en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)

Entre y dentro de los tratamientos hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el crecimiento foliar. Independientemente del régimen de temperatura la hoja Núm. 5 tuvo anchura y longitud mayor que el resto. La diferencia más amplia se observó entre las

hojas Núm. 2 y 5. Aunque esta última era más joven, también fue 2.2 veces más ancha y 1.8 veces más larga que la Núm. 2 (Figura 3.2 A-B).

Con el régimen de temperatura constante las hojas fueron más anchas y largas que aquellas con el régimen de 45.5/14 °C. Las diferencias mayores (30 % o más) se observaron entre las hojas más jóvenes (Núm. 6) de la roseta (Figura 2 A-B).

En relación con la expansión foliar, Nobel (1999) indicó que las hojas expuestas a la luz solar directa tienen entre 20 y 80 % menos área que las que crecen con poca luz (sombra). Los resultados del presente estudio coinciden con lo anterior, pues la intensidad luminosa en la cámara con ambiente controlado fue menor que en el invernadero.

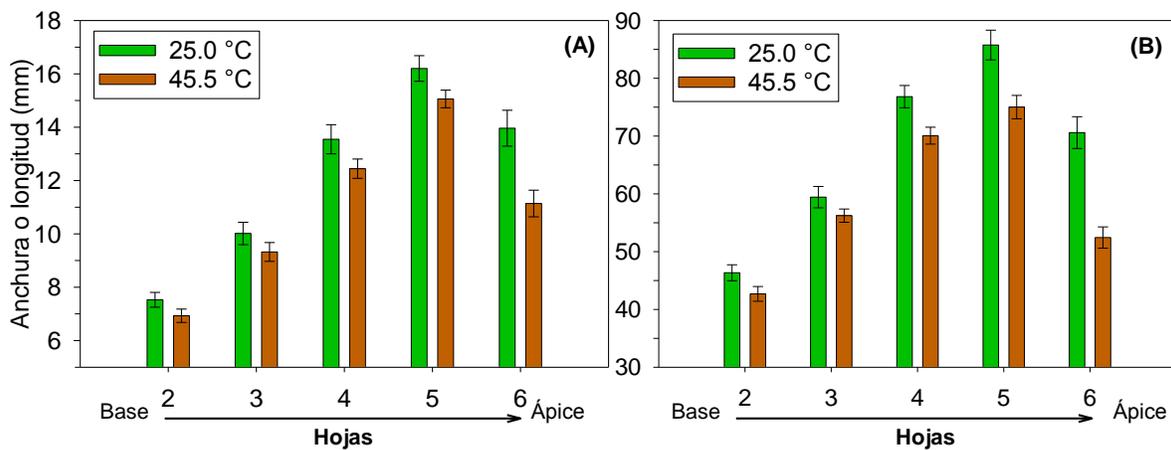


Figura 3.2 Anchura (A) y longitud (B) (mm \pm error estándar) de hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o termoperiodo 45.5/ 14 ± 2 °C día/noche (n=36).

Entre y dentro de los tratamientos las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) también se presentaron en la biomasa foliar. Como en la anchura y longitud, un gradiente de acumulación de biomasa se observó en sentido acrópeto, con excepción de la hoja Núm. 6, y los valores máximos se presentaron en la hoja Núm. 5, en ambos regímenes de temperatura (Figura 3.3).

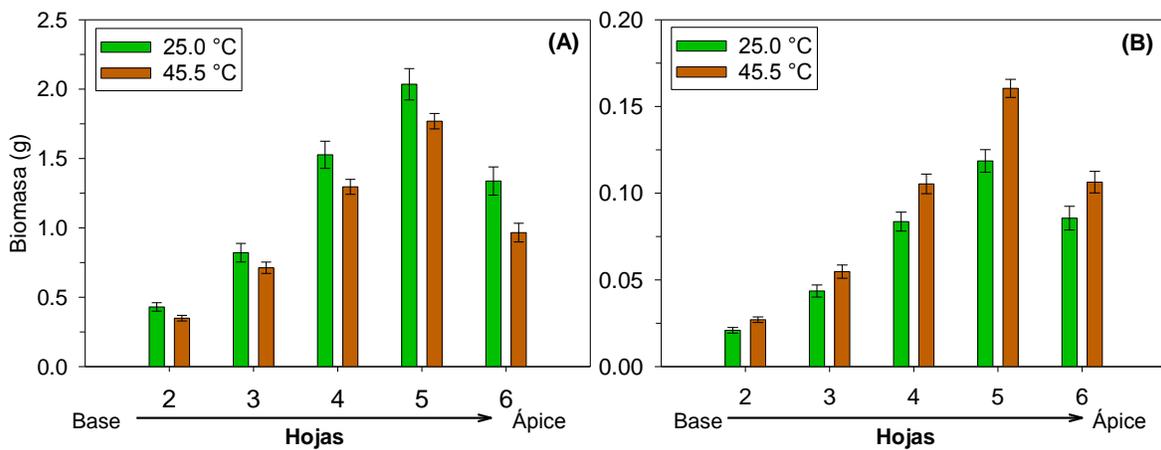


Figura 3.3 Biomasa húmeda (A) y seca (B) (g \pm error estándar) en hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche (n=36).

La diferencia mayor en biomasa húmeda se observó en la hoja Núm. 6, en la que el régimen de temperatura constante acumuló en promedio 30 % más (Figura 3.3 A). En contraste, con $45.5/14$ °C las hojas acumularon más biomasa seca que con

temperatura constante; la diferencia entre tratamientos también mostró un gradiente acrópeto y la hoja Núm. 5 presentó la diferencia mayor, y alcanzó cerca de 30 % más que la de las plantas que se mantuvieron a 25 °C (Figura 3.3 B).

En plantas MAC la carboxilación nocturna disminuye con temperaturas nocturnas similares a las diurnas; además, temperaturas diurnas altas favorecen la descarboxilación y podría favorecerse el incremento en la actividad del ciclo Calvin-Benson (Lüttge, 2007). En el presente estudio las plantas con temperatura constante día/noche acumularon menos biomasa probablemente porque disminuyeron la carboxilación nocturna, aumentó la tasa respiratoria o ambas. Esta reacción se considera una condición de estrés por la temperatura constante, en la que los polisacáridos de reserva se hidrolizan y los azúcares solubles participan en el alivio del estrés (Bethke *et al.*, 2009). En contraste, la fluctuación de la temperatura diurna/nocturna, en el invernadero, parece que favoreció la síntesis de azúcares, la síntesis de polisacáridos de pared celular y otros materiales que se acumulan en el tejido foliar (Figura 3.3 B).

La irradiación es otro factor que puede afectar el crecimiento de las plantas. En este estudio, la intensidad luminosa de la cámara con ambiente controlado fue el doble del punto de compensación ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) reportado para especies C3 y C4 entre 8-16 y 6-14 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente (Nobel, 1999), en el presente estudio la intensidad luminosa en invernadero fue 10 veces más que en la cámara de ambiente controlado, al parecer la intensidad luminosa afectó el crecimiento de las plantas, se observó mayor crecimiento de la planta, elongación y anchura de las hojas a

intensidades luminosas bajas (cámara de ambiente controlado), pero mayor acumulación de biomasa seca a mayores intensidades luminosas (invernadero) .

3.5.2 Azúcares solubles

Se observó un efecto significativo ($P \leq 0.05$) del factor número de hoja con respecto al contenido de Glu, mientras que Fru y Sac mostraron un efecto significativo del factor de temperatura ($P \leq 0.05$), sin embargo, en ninguna variable respuesta se observó el efecto significativo de las interacciones de los factores, el factor hora no mostró diferencia estadística en las variables evaluadas.

Independientemente del régimen térmico las hojas mostraron en promedio 72.528, 12.599 y 5.297 μ moles de Gluc, Fruc y Sac por g de tejido foliar seco. También, independientemente del régimen de temperatura el contenido de los azúcares varió significativamente entre las hojas, a lo largo del día y en relación con su edad. El contenido mayor de cada azúcar se presentó en la hoja Núm. 2, la que se expuso primero del grupo evaluado, y por lo tanto la de más edad. Las hojas más jóvenes, Núm. 5 y 6, presentaron sólo 72.53 % de Gluc, 12.60 % de Fruc y 5.30 % de sacarosa respecto a la Núm. 2 (Cuadro 3.4).

Independientemente del del número de hoja y régimen de temperatura, el contenido de los monosacáridos Gluc y Fruc en las hojas cambió significativamente durante el día. Ambos azúcares se acumularon al medio día. En contraste, la Sac no cambió significativamente a lo largo del día. La Gluc fue el azúcar más abundante de

los tres y en promedio representó seis y 14 veces la concentración de Fruc y Sac durante el día (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.4 Contenido de azúcares solubles de hojas (n=72), en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí.

Hoja (Núm.)	Azúcar ($\mu\text{moles g}^{-1}$)		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
2	91.003 a	15.661 a	6.294 a
3	76.714 b	13.536 ab	5.915 ab
4	70.282 bc	12.779 abc	5.411 ab
5	59.251 c	11.139 bc	4.868 ab
6	65.39 bc	9.878 c	3.998 b
DMS	12.227	3.631	2.058

DMS: diferencia mínima significativa, medias por columna con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Independientemente del régimen térmico (Cuadro 3.5) la gluconeogénesis en la fase III, en las plantas MAC, se confirmó con la acumulación de Gluc y Fruc a las 12:00 h; además, la concentración menor de ambos azúcares a las 7:00 h mostró el final de

la fase nocturna, fase I, como resultado de la glucólisis, con la síntesis de PEP, su carboxilación y síntesis de ácidos orgánicos en la fase nocturna previa (Antony y Borland, 2009). Estos resultados mostraron que, independientemente del régimen térmico y número de hoja, las plantas jóvenes de maguey, de sólo 7 meses de edad, presentaron las etapas descritas para plantas MAC. La excepción fue el contenido de Sac que no mostró los cambios relacionados con las fases descritas (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5 Contenido de azúcares solubles durante el día (n=24), en plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí

Hora de muestreo	Azúcar ($\mu\text{moles g}^{-1}$)		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
7:00	63.52 b	10.33 b	4.43 a
12:00	73.91 a	13.97 a	5.53 a
19:00	67.74 ab	11.37 b	5.22 a
DMS	6.6814	1.9841	1.1253

DMS diferencia mínima significativa, medias por columna con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$)

Independientemente del número de hoja, el contenido foliar promedio de azúcares fue estadísticamente mayor ($p \leq 0.05$) en las plantas que permanecieron con temperatura constante (25 °C día/noche), en comparación con las que estuvieron 15 días en el régimen de temperatura diurna alta. En estas la Gluc representó 6.6 % menos que en aquellas, y la Sac y la Fruc representaron menos de dos tercios (34.4 y 36.1 %) (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6 Contenido de azúcares solubles de hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad (n=36), producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días.

Temperatura (°C)	Azúcar ($\mu\text{moles g}^{-1}$)		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
25 ± 2 °C	70.794 a	14.450 a	6.077 a
45.5 ± 2 °C	66.147 b	9.235 b	3.993 b
DMS	4.555	1.353	0.767

DMS: diferencia mínima significativa, medias por columna con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

El contenido de Gluc foliar fue estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) durante el día en las plantas que permanecieron en la temperatura constante de cámara de

crecimiento (Figura 3.4 A). Aunque entre algunas hojas en la roseta las diferencias no fueron estadísticas ($p > 0.05$), el contenido de este monosacárido fue mayor a medio día respecto al amanecer (7:00 am) y al anochecer (7:00 pm). Además, el contenido promedio de Gluc fue menor en las hojas cercanas al ápice, las más jóvenes; así, las de la base mostraron hasta 31 % más Gluc que aquellas de las plantas en el régimen de temperatura constante (Figura 3.5).

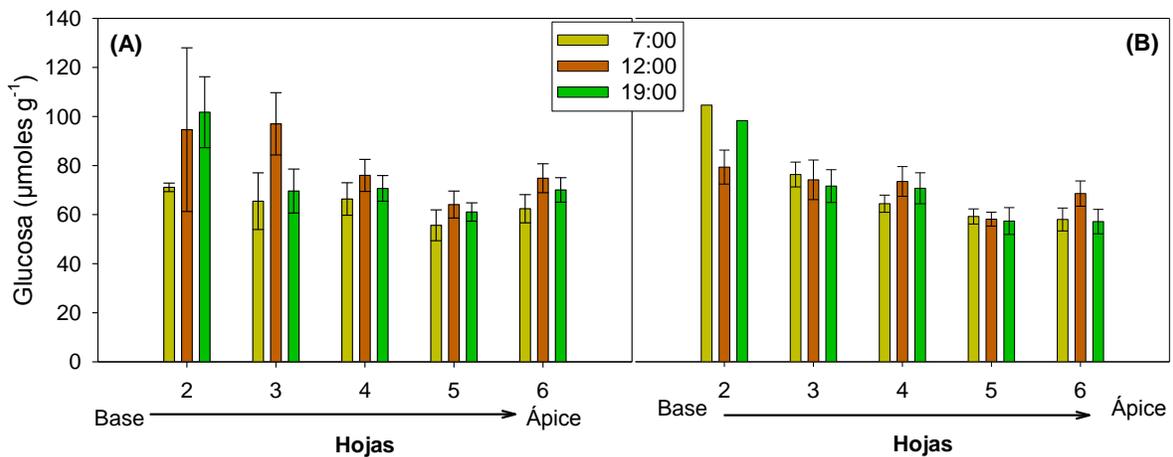


Figura 3.4 Contenido de glucosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, en hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 °C día/noche (A) o 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B)(n=12).

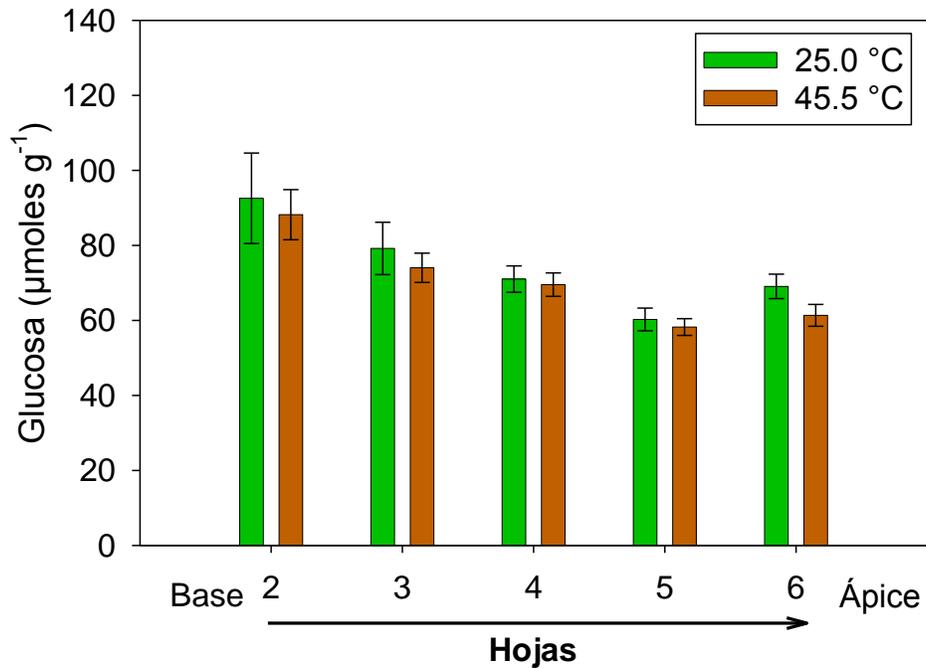


Figura 3.5 Contenido de glucosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días ($n=36$).

En general el contenido de Gluc foliar se mantuvo estable durante el día en el régimen térmico de $45.5/14$ °C. La excepción fue la hoja Núm. 2, la más madura en la roseta, que presentó contenido mayor del monosacárido al amanecer y al anochecer (Figura 3.4 B). Este comportamiento puede ser evidencia de la alteración del ciclo MAC típico, por la temperatura diurna alta, con el consumo acelerado de Gluc al medio día. Las hojas Núm. 3 y 5 no mostraron diferencias significativas en el contenido de este azúcar durante el día (Figura 3.4 B); pero la hoja Núm. 4 al medio día mostró diferencia

respecto al amanecer y la hoja Núm. 6 respecto al amanecer y anochecer; esta condición se identifica como efecto propio del ciclo MAC (Antony y Borland, 2009).

La concentración de Gluc foliar en las plantas del tratamiento con régimen 45.5/14 °C mostró un gradiente inverso a la edad de la hoja, es decir en sentido acrópeto, similar al de la condición térmica constante; por lo que, el contenido promedio de Gluc en las hojas de la base de la roseta mostraron hasta 31 % más Gluc que las más jóvenes, en la zona apical (Figura 3.5).

Independientemente del régimen de temperatura, en promedio la Fruc también mostró un gradiente de concentración inverso a la edad de las hojas. La hoja Núm. 6, que era la más joven, presentó 63.1 % de la Fruc en la hoja Núm. 2 (Cuadro 3.4).

En las hojas de las plantas que permanecieron en el régimen de temperatura constante el contenido foliar de Fruc se modificó significativamente durante el día (Figura 3.6 A). En las hojas maduras, Núm. 2 a 4, el contenido de Fruc fue estadísticamente mayor ($p \leq 0.05$) al medio día en comparación con las concentraciones al amanecer y al anochecer; pero, también en estas diferencias se observó un gradiente, en el que la hoja más antigua (Núm. 2) fue la que presentó las fluctuaciones mayores. Esta hoja contenía 38.5 % de Fruc al amanecer y 53.85 % al anochecer respecto a medio día. Otro aspecto relevante de la concentración de Fruc en las hojas de las plantas que permanecieron en el régimen con temperatura constante fue que su contenido promedio mostró un gradiente en sentido acrópeto, de 17 a 11 $\mu\text{moles g}^{-1}$ en la hoja de la base a la hoja del ápice (Figura 3.7).

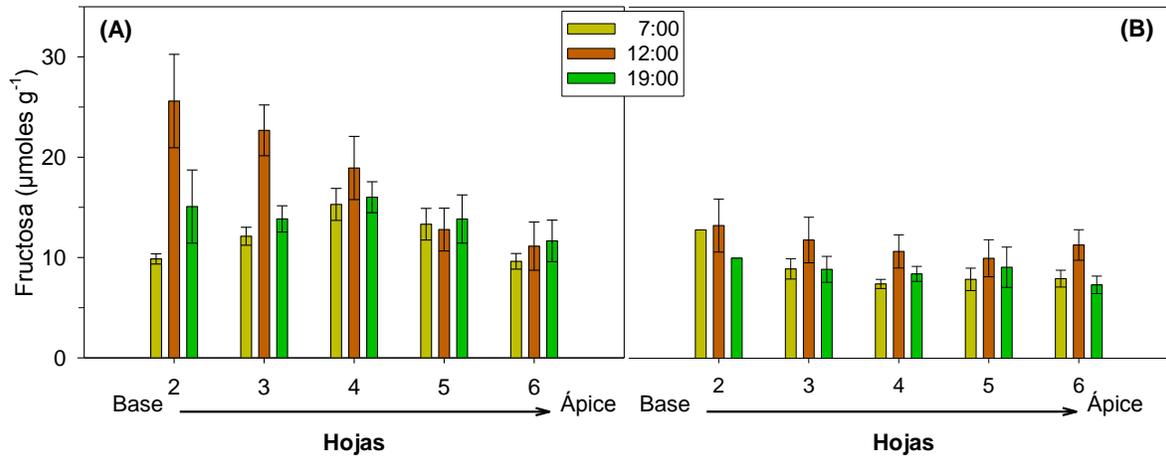


Figura 3.6 Contenido de fructosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas, a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 °C día/noche (A) o a 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B) (n=12).

El contenido de Fruc también varió durante el día en las cinco hojas de las plantas en el régimen con temperatura 45.5/14 °C. La tendencia general fue la acumulación de este azúcar a medio día, respecto al amanecer y al anochecer; es decir la acumulación de Fruc a medio día fue independiente de la edad de la hoja (Figura 3.6 B).

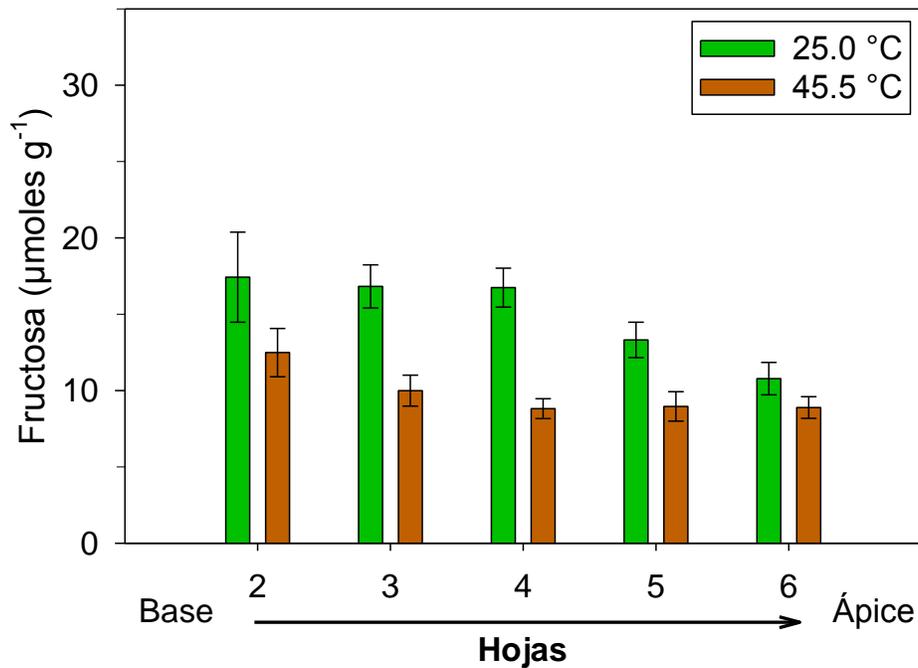


Figura 3.7 Contenido de fructosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días ($n=36$).

La concentración foliar de Fruc en las plantas en el régimen $45.5/14$ °C mostró un gradiente inverso a la edad de la hoja; en él las hojas Núm. 2 y 3 tuvieron entre 25 y 10 % más Fruc que las Núm. 4, 5 y 6 (Figura 3.7).

Independientemente de la hora del día el gradiente del contenido de Fruc también se observó en las hojas de las plantas en el régimen con temperatura constante; en promedio, las hojas de estas plantas mostraron entre 24 y 46 % más Fruc ($p \leq 0.05$) que las de del régimen $45.5/14$ °C en el día (Figura 3.7).

En contraste con el contenido de Gluc y Fruc, las fluctuaciones del contenido de Sac foliar durante el día en las plantas de ninguno de los regímenes térmicos fueron significativas ($P > 0.05$). En 25 °C constantes el contenido de este azúcar tendió a ser menor al amanecer, principalmente en las hojas menos jóvenes; en contraste en las hojas de las plantas mantenidas a 45 °C la sacarosa tendió a acumularse a medio día en las hojas jóvenes ($P > 0.05$) (Figura 3.8 A-B).

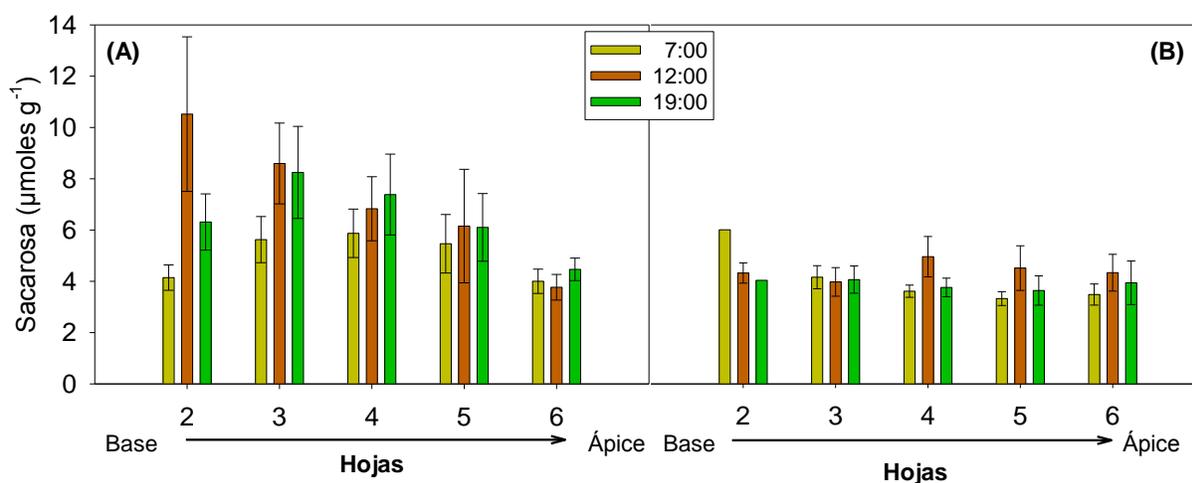


Figura 3.8 Contenido de sacarosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, a las 7:00, 12:00 y 19:00 del día, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche (A) o $45.5 / 14 \pm 2$ °C día/noche (B)($n=12$).

Cerca del final del fotoperiodo, una vez que las reservas de malato se han agotado y la presión parcial interna de CO₂ disminuye, los estomas pueden abrirse, el CO₂ atmosférico ingresa y puede fijarse directamente a través de la Rubisco por varias horas, en el período conocido como fase IV, de acuerdo con Osmond (1978). Los

azúcares sintetizados durante la fase IV podrían exportarse principalmente para el crecimiento (Borland et al. 1994; Borland y Dodd 2002) en términos de flujo neto de C; aunque en proporciones pequeñas, el contenido de los tres azúcares evaluados fue mayor ($P \leq 0.05$) en la fase IV en las plantas que se mantuvieron en temperatura constante (Figura 3.3, 3.5 y 3.7). Con este resultado podría esperarse que las plantas que permanecieron en el régimen de temperatura constante hubieran alcanzado crecimiento mayor que las plantas en el termoperiodo 45.5/14 °C; pero, éstas últimas acumularon la biomasa seca significativamente mayor (Cuadro 3.3 y Figura 3.3 B). Este resultado confirma que la falta de termoperiodo con temperatura nocturna fresca parece indispensable para las plantas jóvenes de maguey, por su tipo de metabolismo MAC.

La diferencia entre ambos regímenes térmicos se observó en el contenido promedio de Sac foliar; en las hojas de las plantas mantenidas a 25 °C el contenido de este disacárido fue entre 35 y más de 47 % mayor ($P \leq 0.05$) que en las hojas de las plantas en el régimen térmico de 45.5/14 °C. La excepción fue la hoja más joven que presentó contenidos similares ($P > 0.05$) en ambos regímenes. Además, en el primer grupo de plantas el contenido promedio de Sac disminuyó en sentido acrópeto, y la hoja más joven contenía cerca de la mitad de este azúcar que las hojas cercanas a la base ($P \leq 0.05$); en contraste el contenido promedio de Sac fue similar ($P > 0.05$) en las seis hojas de las plantas en el régimen 45.5/14 °C, o independiente de la edad de la hoja (Figura 3.9).

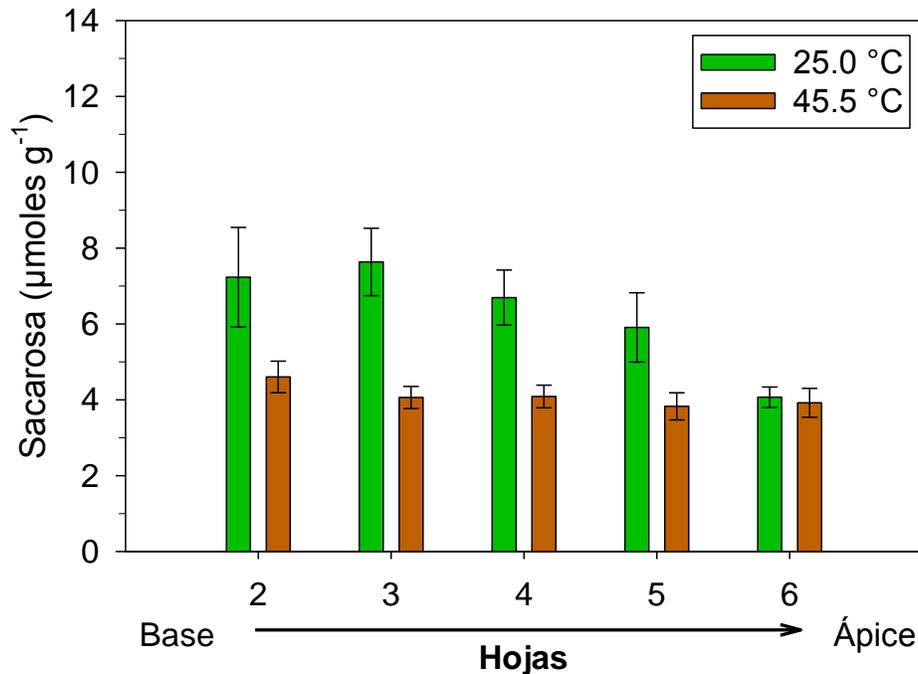


Figura 3.9 Contenido de sacarosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5 / 14 \pm 2$ °C día/noche (n=36).

Incrementos en metabolitos fosforilados de Fruc, como la fructosa-2,6 bifosfato se han observado en plantas en condiciones de estrés. Este azúcar fosforilado puede funcionar como molécula de señalización para inducir la acumulación de almidón o al contrario, para su degradación y acumulación de azúcares solubles en el alivio del estrés. Esto lo demostró el estudio realizado por Banzai *et al.* (2003) en mangle (*Bruguiera gymnorrhiza*); en él demostraron el incremento en el contenido de fructosa-2,6 bifosfato como respuesta al estrés salino, hídrico y osmótico; además, de la

expresión de enzimas que catalizan su síntesis y degradación. En chícharo (*Pisum sativum*) temperaturas bajas propiciaron la acumulación de Fruc y sus metabolitos fosforilados (Bogdanović *et al.*, 2008). Resultados como estos han permitido a los especialistas proponer que los azúcares solubles pueden funcionar como antioxidantes no enzimáticos en condiciones de estrés.

Estos resultados de acumulación de Sac en las plantas de maguey que se mantuvieron con temperatura constante coincidieron con los que obtuvieron Liu *et al.* (2013) en tallos de orquídea (*P. aphroide*), que es una planta MAC. Estos autores observaron que los contenidos de Sac se mantuvieron altos y constantes cuando las plantas permanecían en temperatura de 28 °C, constante día/noche; en contraste, el termoperiodo diurno/nocturno de 28/20 °C mantuvo bajo el contenido de Sac.

El estrés por temperaturas diurnas altas, por déficit hídrico, o ambos factores simultáneos, en tubérculos de papa generan degradación de almidón y la removilización de azúcares solubles hacia los tejidos de la planta que requiere aliviar el estrés; además, se ha observado acumulación de Sac en el tubérculo debido a estrés por temperaturas diurnas altas y estrés hídrico (Bethke *et al.*, 2009).

En el presente estudio, las concentraciones mayores de Fruc y Sac parecen indicar que las plantas que permanecieron en la cámara de ambiente controlado con temperatura constante de 25°C día/noche se encontraron en estrés. En plantas MAC la irradiación recibida durante la fase III determina la cantidad de ácidos orgánicos que se acumularán en la fase I, y su degradación consecuente en la formación de metabolitos primarios (Lüttge, 2007). La intensidad luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de la cámara con ambiente controlado fue 10 veces menor a la del invernadero (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en

términos energéticos del proceso fotosintético podría haber síntesis menor de metabolitos primarios en esas plantas respecto a las del invernadero; por lo que, las concentraciones mayores de Fruc y Sac podrían indicar que se generó un desbalance en la relación fuente y demanda, con disminución en la acumulación de polisacáridos de reserva y menos biomasa acumulada. Al respecto, en las plantas MAC los polisacáridos de reserva pueden representar hasta el 20 % de la biomasa seca (Antony y Borland, 2009).

Los resultados del presente estudio indican que la ausencia de termoperiodo, aunque la temperatura constante no sea extrema, afecta más el desarrollo de las plantas jóvenes de *A. salmiana* que las temperaturas cercanas a los 47 °C registradas varios días durante las 13 y 14 h en el invernadero en el periodo de 15 días de exposición.

3.5.3 Aminoácidos libres

Se observó un efecto significativo individual ($P \leq 0.05$) de los factores temperatura y número de hoja con respecto a la acumulación de AminoácL, el factor hora no mostró diferencia estadística en las variables evaluadas.

Independientemente del régimen térmico, las plantas del estudio presentaron en promedio 72.677 μmol de AminoácL por g de tejido foliar seco en las hojas de la roseta. El contenido de estos compuestos nitrogenados varió estadísticamente ($P \leq 0.05$) entre las hojas, en relación con su edad, y ubicación en la roseta. Además, independientemente del régimen de temperatura, en promedio, las hojas más jóvenes

mostraron el contenido mayor ($P \leq 0.05$) de AminoácL. Así, la hoja Núm. 6 presentó 33 y 49 % más AminoácL que las hojas Núm. 2 y 3 (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7 Contenido de aminoácidos libres y fenoles totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de hojas (n=72), en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí.

Hoja (Núm.)	Aminoácidos libres	Fenoles totales
	($\mu\text{moles g}^{-1}$)	
2	49.318 bc	2.670 a
3	37.239 c	2.660 a
4	39.172 c	2.763 a
5	60.795 ab	2.502 a
6	73.243 a	2.612 a
DMS	19.987	0.451

DMS: diferencia mínima significativa, medias en cada columna con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Independientemente del régimen térmico y del número de la hoja, el contenido de los AminoácL en las hojas cambió significativamente durante el día. Estos

compuestos se acumularon durante la noche y disminuyeron 20 % al medio día y al anochecer ($P \leq 0.05$) respecto al amanecer (Cuadro 3.8).

Cuadro 3.8 Contenido de aminoácidos libres y fenoles totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h ($n=24$), en plantas de *Agave salmiana*, de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o a $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días.

Hora de muestreo	Aminoácidos libres	Fenoles totales
	$\mu\text{moles g}^{-1}$	
7:00	61.504 a	3.130 a
12:00	49.832 b	2.314 b
19:00	49.102 b	2.487 b
DMS	10.555	0.246

DMS diferencia mínima significativa, medias por columna con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$)

Independientemente de la hora del día y del número de hoja, el contenido foliar promedio de AminoácL fue diferente entre los regímenes térmicos ($P \leq 0.05$). En las plantas que permanecieron con termoperiodo constante a 25 °C día/noche el contenido

de estos compuestos nitrogenados fue el doble respecto a aquellas con termoperiodo (45.5/14 °C) (Cuadro 3.9).

Cuadro 3.9 Contenido de aminoácidos libres y fenoles totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad (n=36), producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días.

Temperatura (°C)	Aminoácidos libres	Fenoles totales
	$\mu\text{moles g}^{-1}$	
25 ± 2 °C	72.677 a	2.488 b
45 ± 2 °C	32.892 b	2.793 a
DMS	7.202	0.168

DMS: diferencia mínima significativa, medias por columna con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $\leq P$ 0.05).

El contenido foliar de AminoácL se modificó parcialmente durante el día, en dependencia de edad (Núm.) de hoja, en las plantas que permanecieron en el régimen con temperatura constante (Figura 3.10 A). Los cambios no fueron significativos ($P > 0.05$) en la mayoría de las hojas, la excepción fue la más joven, que mostró contenido significativamente mayor ($P \leq 0.05$) al amanecer respecto al medio día y al anochecer.

Sin embargo, el contenido de AminoácL durante el día no mostró una tendencia única. Las hojas Núm. 2 y 3, las de más edad, mostraron cierta acumulación de AminoácL a medio día; en contraste, las hojas jóvenes, Núm. 4 a 6, mostraron tendencia a acumularlos al amanecer (7:00 am) en este régimen de temperatura constante (Figura 3.10 A).

El contenido promedio de AminoácL fue mayor ($P \leq 0.05$) en las hojas jóvenes, en la roseta, respecto a las de edad mayor de las plantas que permanecieron en el régimen de temperatura constante. La tendencia mostró que la hoja Núm. 6 presentó en promedio poco más del doble de AminoácL que la hoja Núm. 2 (Figura 3.11).

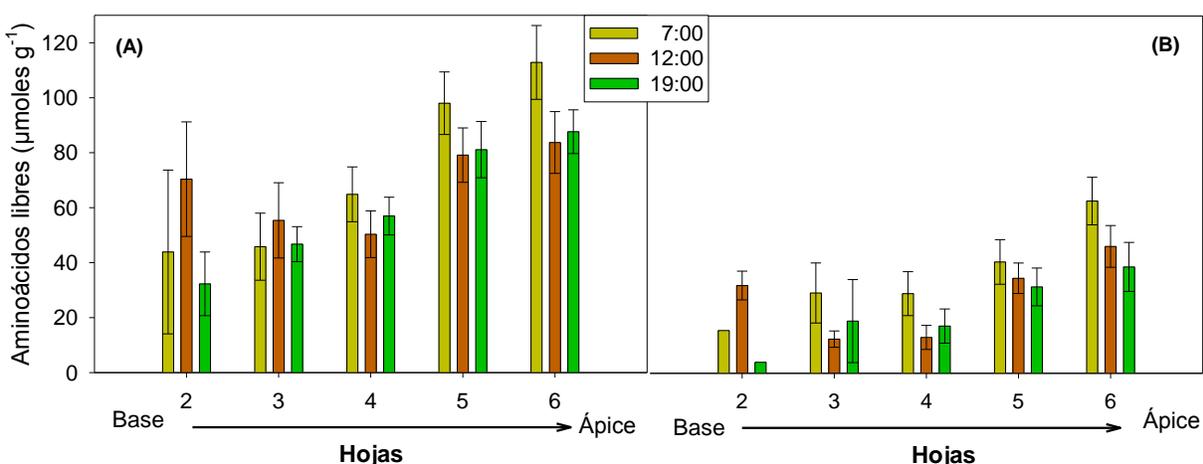


Figura 3.10 Contenido de aminoácidos libres ($\mu\text{mol g}^{-1} \pm$ error estándar) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, en hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25°C día/noche (A) o 45.5 / 14 ± 2 °C día/noche (B) (n=12).

En el régimen con termoperiodo (45.5/14 °C) el contenido foliar de AminoácL fluctuó durante el día solo algunas diferencias fueron significativas (Cuadro 3.9). Como en el caso de las plantas a temperatura constante, en las que estuvieron en 45.5/14 °C se observó cierta tendencia de acumulación de AminoácL al amanecer; pero, la hoja de más edad no concordó con esta tendencia, pues acumuló más AminoácL a medio día respecto al amanecer y anochecer (Figura 3.10 B).

Estos resultados indican que el contenido foliar de AminoácL en las plantas jóvenes de maguey es dependiente de factores diversos, como los fenológicos (edad del tejido), el tipo de metabolismo (MAC típicamente dinámico a lo largo del día), la temperatura durante el día y la interacción de todos ellos.

En promedio, la concentración de AminoácL en las hojas de la roseta, de las plantas del tratamiento 45.5/14 °C, incrementó ($P \leq 0.05$) en las más jóvenes. La diferencia mayor se detectó entre la hoja Núm. 2 y la Núm. 6, la hoja más joven presentó 2.5 veces más contenido que la madura (Figura 3.11). Este incremento fue similar al de la condición térmica constante, pero las concentraciones promedio por hoja fueron menos que la mitad (Figura 3.11).

El contenido de nueve AminoácL fue mayor en plantas de arroz que permanecieron en termoperiodo 30/28 °C día/noche, en comparación con las que se expusieron a temperatura nocturna menor que la diurna; además, el metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos se activó, pero, en los cultivares de tolerantes a las temperaturas nocturnas altas los contenidos de fructosa, glucosa y poliaminas fueron los mayores. El incremento de los aminoácidos libres pudo deberse a la desnaturalización de proteínas; pero, el contenido de proteína fue el mismo que en las

plantas testigo (Glaubitz *et al.*, 2015). Los autores de ese estudio indicaron que hay evidencia de que la absorción de N incrementa como uno de los resultados del estrés.

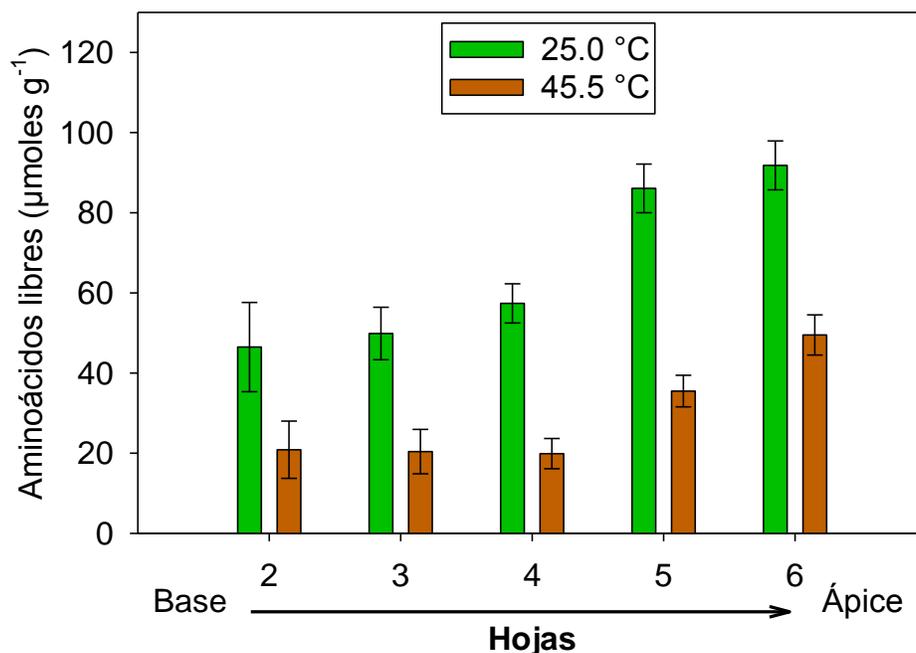


Figura 3.11 Contenido de aminoácidos libres ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas, en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días ($n=36$).

Aunque el aumento de los aminoácidos libres puede incluir varios de ellos, la prolina es el principal en la mayoría de las plantas, porque su metabolismo parece que es uno de los más sensibles al estrés; su biosíntesis es relativamente corta en comparación con la de otros (Hare y Cress 1997). La prolina cumple funciones antioxidantes, como agente

quelante cuando los niveles de metales son altos, también funciona como osmoprotector y estabilizador de proteínas (Gill y Tuteja 2010). Durante el estrés por calor las enzimas encargadas de su síntesis se sobreexpresan, por lo que el aminoácido se acumula y la sensibilidad al estrés aumenta, la síntesis y degradación de prolina se relaciona con el balance redox celular (Glaubitz 2015).

En hojas de mora (*Morus alba* L.) expuestas a 40 °C por 360 min los aminoácidos totales y específicamente la prolina libre aumentaron, en contraste con la reducción de proteínas y ácidos nucleicos; el autor del estudio, como otros, sugirió que ese resultado se debió a la desnaturalización de las proteínas y que los aminoácidos funcionaron como osmoreguladores, pero es posible que la acumulación sea una respuesta a la inhibición de la síntesis de proteínas; similarmente, el balance de carbono se afectó (Chaitanya, 2001).

En condiciones de estrés abiótico, los niveles altos de prolina se asocian generalmente con los niveles de Sac. Esto se considera como evidencia de que la síntesis de prolina depende de la señalización propia de la Sac (Van den Ende y El-Esawe, 2014). En el presente estudio la acumulación de Sac estuvo asociada a la acumulación de AminoácL en la condición térmica constante de 25°C día/noche.

3.5.4 Fenoles totales

Se observó un efecto altamente significativo ($P \leq 0.01$) del factor hora del día y significativo en el factor temperatura ($P \leq 0.05$), en la acumulación de FenolT en las

plantas, sin embargo, ninguna interacción o algún otro factor mostraron diferencias significativas.

En promedio las plantas presentaron en las hojas de la roseta 2.641 μmoles de FenolT por g de tejido seco. El contenido de estos compuestos no varió significativamente ($P > 0.05$) entre las hojas en relación con su edad o ubicación en la roseta. En promedio, independientemente del régimen térmico, el contenido de FenolT en las hojas fue notablemente similar, ya que los contenidos fluctuaron entre 2.502 y 2.763 $\mu\text{moles g}^{-1}$ (Cuadro 3.7).

El contenido de los FenolT en las hojas, independientemente del régimen térmico, cambió significativamente durante el día. El contenido de estos compuestos disminuyó ($P \leq 0.05$) entre 20.01 y 26.07 % al medio día y al anochecer, respecto al amanecer (Cuadro 3.8).

En promedio el contenido foliar de FenolT, independientemente de la hora del día, fue 12.26 % mayor ($P \leq 0.05$) en las plantas con la condición 45.5/14 °C en el día respecto a las que se mantuvieron con termoperiodo constante a 25 °C día/noche (Cuadro 3.9).

El contenido de FenolT se modificó significativamente ($P \leq 0.05$) durante el día en las hojas de las plantas que permanecieron en la temperatura constante (Figura 3.12 A). Independientemente de la posición o edad de las hojas en la roseta, los contenidos menores de esos compuestos, desde 17 hasta 46 %, se observaron al medio día respecto al amanecer y al anochecer y, en general en estos dos últimos momentos del día los contenidos de FenolT fueron similares entre sí ($P > 0.05$) (Figura 3.12 A).

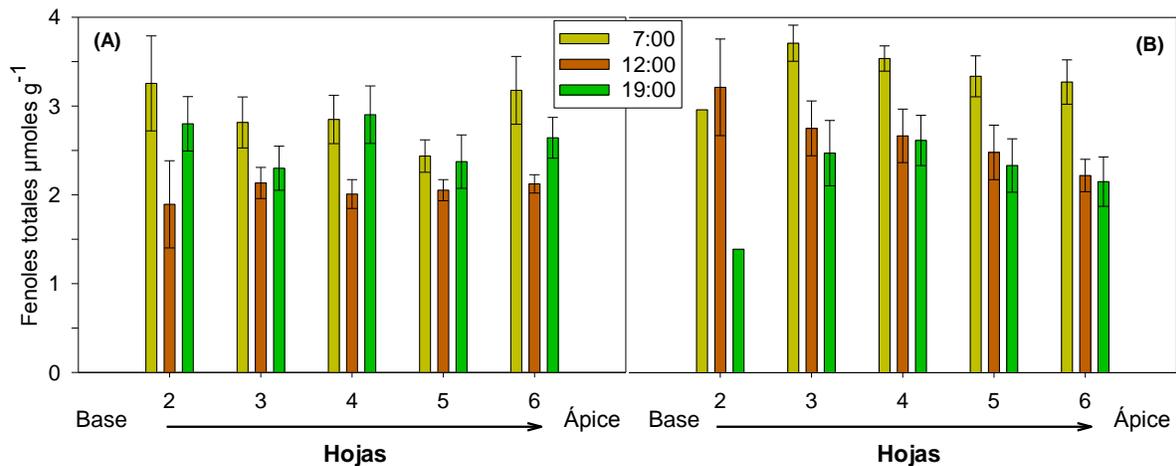


Figura 3.12. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, en hojas de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 °C día/noche (A) o 45.5/14 \pm 2 °C día/noche por 15 días (B)(n=12).

En promedio, independientemente de la hora del día, el contenido de FenolT fluctuó sin una tendencia reconocible, entre las hojas en la roseta de las plantas que permanecieron en la temperatura constante (25 °C día/noche). Los contenidos promedio de FenolT variaron poco entre las hojas, de 2.8 $\mu\text{moles g}^{-1}$ en la hoja Núm. 2, la de más edad, a 2.2 $\mu\text{moles g}^{-1}$ en la Núm. 5, una de las más jóvenes (Figura 3.13).

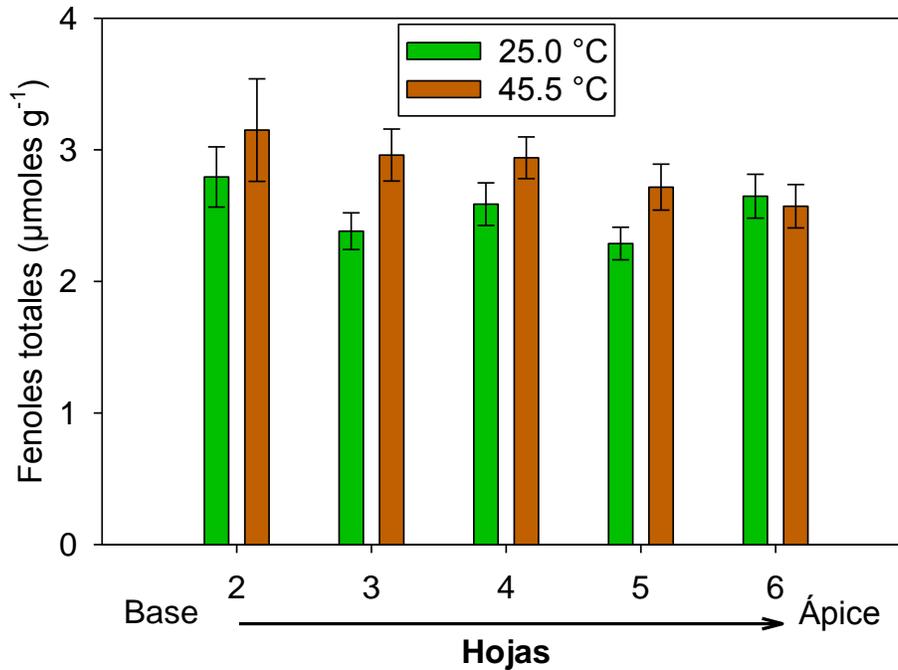


Figura 3.13. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en hojas, en sentido acrópeto, de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25.0 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=36).

El contenido foliar de FenolT, en la condición térmica de $45.5/14$ °C se modificó ($P \leq 0.05$) durante el día, pero solo algunas de las diferencias fueron estadísticas. Como en el caso de las plantas mantenidas con temperatura constante, el contenido de FenolT al amanecer fue significativamente mayor que a medio día; y en contraste el contenido al inicio de noche se mantuvo sin cambio respecto del medio día. La hoja Núm. 2 fue excepcional porque su contenido de FenolT al amanecer fue similar que al medio día.

El contenido de FenolT al amanecer representó desde 30 % hasta más del doble del contenido el inicio de la noche (Figura 3.12 B).

En promedio, la concentración foliar de FenolT en las plantas con el termoperiodo 45.5/14 °C, disminuyó ($P \leq 0.05$) en las más jóvenes. La diferencia mayor se detectó entre la hoja Núm. 2 y la Núm. 6, que presentó 16 % menos contenido (Figura 3.13). Esta tendencia de decremento del contenido de FenolT contrastó con la ausencia de alguna tendencia identificable entre las hojas de las plantas en la condición con temperatura constante (Figura 3.13).

De acuerdo con Magalhães *et al.* (2010) el reactivo de Folin-Ciocalteu puede reaccionar sinérgicamente con azúcares solubles y aditivamente con ácidos orgánicos en la muestra. Aunque desconocemos en cuáles condiciones puede suceder esta reacción es posible que la concentración mayor de FenolT a las 7:00 h fuera un efecto aditivo con los ácidos orgánicos, que presentan su acumulación máxima durante la fase I del ciclo MAC. Tenemos certeza de que los azúcares solubles no interfirieron en la cuantificación de FenolT, pues la concentración máxima en las muestras evaluadas fue cercana a la del testigo preparado, como se señaló en el apartado de materiales y métodos, para este fin.

El contenido de FenolT (en promedio $350 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) al medio día puede ser una respuesta a la intensidad luminosa en la condición del fotoperiodo a 45.5/14°C, en estudios realizados por Deng (2012) en plantas variegadas de *A. americana* de dos años de edad, Deng (2012) observó acumulación de enzimas antioxidantes en las plantas iluminadas con $2500 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en comparación con los controles que se manuvieron en $500 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las plantas poseen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para contrarrestar el efecto de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se producen como resultado de estrés abiótico; los flavonoides son compuestos fenólicos que se acumulan en respuesta a exposición a luz UV-B; estos compuestos absorben la luz UV-B, por lo que se identifican como filtros protectores (Gill y Tuteja 2010). Las antocianinas se clasifican como una parte de los flavonoides, son pigmentos que se acumulan en la vacuola y tiene capacidad de absorber luz UV-B; además, su acumulación se relaciona positivamente con la cosecha de fotones del fotosistema II y la asimilación de carbono. De acuerdo con Fondom *et al.* (2009) la acumulación mayor de antocianinas en hojas de *A. striata* en respuesta a la exposición a la luz, confirmó que la acumulación de este tipo de compuestos fenólicos pueden ser un mecanismo fotoprotectivo, que “filtra” la energía luminosa y disminuye la dependencia del ciclo de las xantofilas como protección de los fotosistemas durante la cosecha de fotones (Fondom *et al.*, 2014).

3.5.5 Permeabilidad relativa de las membranas celulares

Se observó un efecto significativo del factor hora del día ($P \leq 0.05$) y altamente significativo del factor parte de la planta ($P \leq 0.01$) respecto a la permeabilidad relativa de las membranas celulares de la planta, el factor temperatura no mostró diferencia estadística en las variables evaluadas.

Independientemente de la hora de muestreo y del régimen de temperatura de las plantas la permeabilidad relativa promedio de las membranas celulares en la raíz fue

significativamente mayor que en las hojas; además, en estas las de la base de la roseta mostraron cerca del doble de permeabilidad que las del centro y el ápice en la roseta (Cuadro 3.10).

Independientemente del régimen de temperatura, la permeabilidad promedio de las membranas celulares de la planta completa se modificó a lo largo del día ($P \leq 0.05$); a medio día la permeabilidad de las membranas fue 47 y 54 % mayor respecto al amanecer y al anochecer (Cuadro 3.10). Este resultado puede deberse al efecto de las temperaturas altas ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más) varias horas al final del periodo diurno e inicio del vespertino (Figura 3.14); sin embargo, en promedio, independientemente de la hora del día, las plantas completas no mostraron algún efecto de la temperatura en la permeabilidad promedio de las membranas celulares, ya que las diferencia en los valores de las plantas mantenidas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las que se expusieron 15 días al termoperiodo de $45.5/14\text{ }^{\circ}\text{C}$ no fueron estadísticas ($P > 0.05$) (Cuadro 3.10).

El incremento en el flujo de iones a través de las membranas celulares en ambos sentidos, debido al efecto de factores generadores de estrés, se ha interpretado como pérdida de la integridad y funcionalidad de esas estructuras lipídicas y de las proteínas inmersas en ellas (Bajji *et al.* 2002). Sin embargo, en plantas MAC, los cambios el flujo molecular de las membranas de los cloroplastos (Madhava *et al.*, 2006) y el tonoplasto son notablemente dinámicos. Por lo anterior, los factores ambientales que fluctúen más allá de ciertos niveles afectarán las tasas de transporte de los metabolitos y las actividades fisiológicas propias de los tejidos.

Cuadro 3.10 Permeabilidad relativa (%) de las membranas celulares de la raíz y las hojas de la base, del centro y del ápice de la roseta, al amanecer, atardecer y anochecer (n=3), de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=18).

Factor	PRMC [§]	Factor	PRMC	Factor	PRMC
	(%)		(%)		(%)
Tejido		Hora		Temperatura	
				(°C)	
Raíz	52.31 a	07:00	26.07 b	25.0	29.12 a
Hojas base	34.24 b	12:00	38.34 a	45.5	30.38 a
Hojas centrales	16.28 c	19:00	24.84 b		
Hojas ápice	16.17 c				
DMS [§]	11.45		9.02		6.13

§ PRMC: permeabilidad relativa de las membranas celulares; DMS: diferencia mínima significativa, medias en cada columna de valores con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

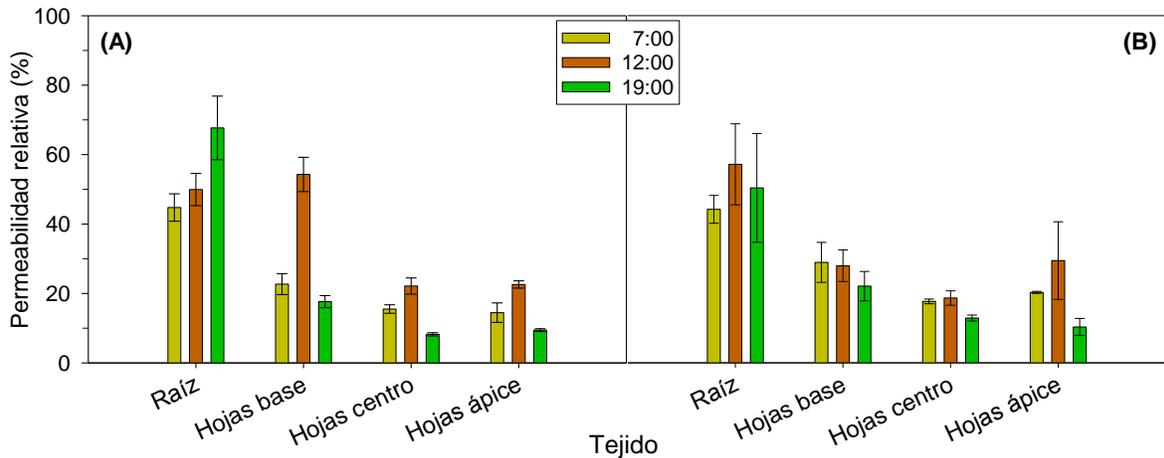


Figura 3.14 Permeabilidad relativa (% \pm error estándar) de las membranas celulares, a las 7:00, 12:00 y 19:00 h del día, de la raíz y las hojas en la roseta de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, mantenidas a 25 °C día/noche (A) o 45.5 / 14 \pm 2 °C día/noche (B) (n=3).

La permeabilidad relativa promedio de las membranas celulares de la raíz en las plantas que permanecieron a 25 °C incrementó significativamente ($P \leq 0.05$) durante el día, al amanecer inició con 45 % y al anochecer alcanzó cerca de 70 % (Figura 3.14 A). Estos cambios parecen relacionarse con la actividad metabólica alta durante la noche, que es propia de las plantas MAC.

Como en la raíz, la permeabilidad promedio de las membranas celulares en las hojas de las plantas que permanecieron a 25 °C se modificó estadísticamente ($P \leq 0.05$) durante el día; pero en contraste con los tejidos de la raíz, la permeabilidad relativa de las membranas en las hojas del mismo grupo de plantas, que se mantuvo a

25 °C, se activó ($P \leq 0.05$) al medio día, y en dependencia de la edad, o ubicación de las hojas, fluctuó entre 24 %, en las más jóvenes (apicales), y 58 %, en de edad mayor (basales); además, independientemente de la edad de la hoja la permeabilidad relativa fue menor al anochecer. Asimismo, en la misma condición térmica las hojas en la base de la roseta mostraron doble permeabilidad membranar relativa que las del centro y ápice de la roseta (Figura 3.15).

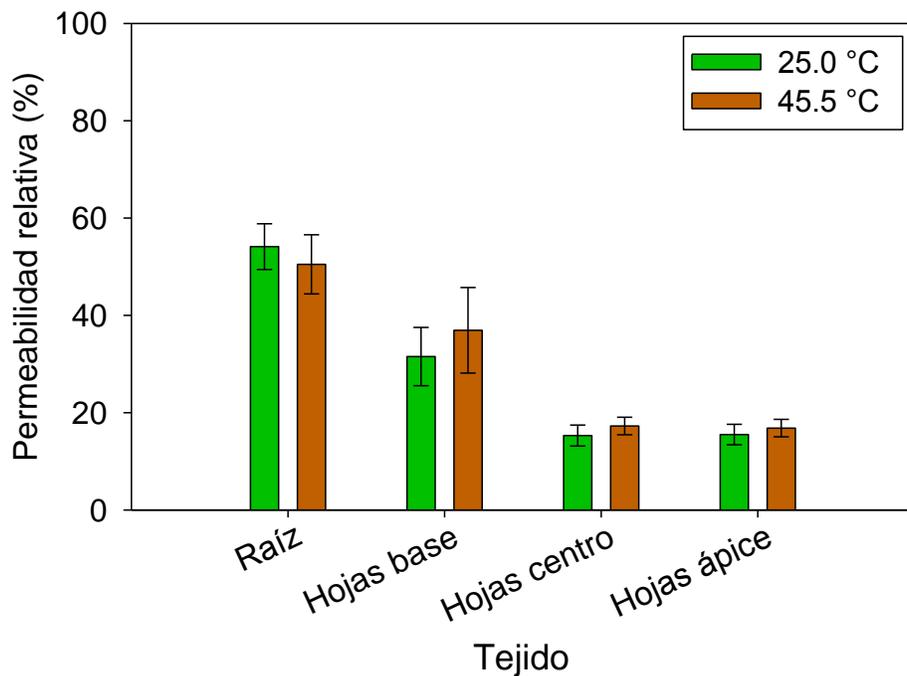


Figura 3.15 Permeabilidad relativa (% \pm error estándar) de las membranas celulares en la raíz y las hojas en la roseta de plantas de *Agave salmiana* de 7 meses de edad, producidas por semilla recolectada en San Luis Potosí, y mantenidas a 25 ± 2 °C día/noche o $45.5/ 14 \pm 2$ °C día/noche por 15 días (n=18).

En promedio, la permeabilidad de las membranas celulares de la raíz de las plantas que permanecieron en el termoperiodo 45/14 °C no mostró diferencias ($P > 0.05$) durante el día, y sus valores fueron alrededor de 60 % desde el amanecer hasta el anochecer (Figura 3.14 B). Los tejidos radicales en este tratamiento térmico mostraron porcentaje de permeabilidad relativa similar ($P > 0.05$) a la del tratamiento con temperatura constante (Figura 3.15).

La permeabilidad de las membranas celulares en las hojas de las plantas que se mantuvieron en el termoperiodo 45/14 °C fue estable durante el día, con excepción de las hojas en el ápice, que presentaron permeabilidad relativa mayor ($P \leq 0.05$) de sus membranas a medio día respecto al amanecer y anochecer (Figura 3.14 B). Independientemente de la hora del día, la permeabilidad membranal relativa de las hojas en la base de la roseta, en las plantas que permanecieron en el régimen cálido, fue mayor ($P \leq 0.05$) que en las del centro y el ápice. Esas mostraron permeabilidad relativa del doble que el resto (Figura 3.15). Destacó que la permeabilidad relativa de las membranas celulares foliares, en ambos regímenes térmicos fueran similar ($P > 0.05$) entre sí (Figura 3.15).

En las plantas MAC, como el maguey, en las que los azúcares solubles son los carbohidratos de almacenamiento mayor y la fuente para el PEP, indispensable para la carboxilación nocturna, los transportadores de azúcar de la vacuola desempeñan un papel clave en el funcionamiento del ciclo MAC diario (Antony y Borland, 2009). Al respecto, las vacuolas aisladas de piña (*Ananas comosus*) contienen principalmente glucosa y fructosa (Kenyon *et al.*, 1985; Christopher y Holtum, 1998), y los extractos de hoja entera contienen cantidades sustanciales de sacarosa (Kenyon *et al.*, 1985). Black

et al. (1996) sugirieron que la actividad alta de invertasa ácida extraíble de hojas de especies MAC, como piña y de *Clusia rosea*, permiten que se acumulen azúcares solubles (Negro *et al.*, 1996). De ser así, la sacarosa se sintetizaría en el citoplasma durante el día y se transportaría, a través del tonoplasto, al interior de la vacuola, y la hidrólisis de este disacárido se realizaría en el lumen vacuolar, la que es catalizada por la invertasa ácida (Smith y Bryce, 1992). Estos eventos indican que los transportadores de sacarosa y hexosas localizados en el tonoplasto podrían desempeñar un papel estratégico en la regulación del flujo de C en las especies MAC almacenadoras de azúcares solubles. Por lo que las alteraciones en los transportadores involucrados en estos eventos, por factores ambientales como las temperaturas extremas, modificarán gran parte de los procesos bioquímico-fisiológicos del MAC.

La distribución de azúcares para la carboxilación nocturna en las plantas MAC debe estar equilibrada con la demanda para el crecimiento. Los transportadores de azúcar se han reconocido como fundamentales para regular la distribución subcelular y a larga distancia, y la partición de asimilados en las plantas (Lalonde *et al.*, 2004). Por esto, se ha hipotetizado que en las plantas MAC los transportadores de azúcares representan un sitio estratégico de control en esa regulación (Antony y Borland, 2009).

Por lo anterior, en el presente estudio los resultados confirmaron que los patrones en los contenidos de azúcares y los otros metabolitos en los tejidos de las plantas de maguey los modularon la reacción de las membranas y los transportadores inmersos en ellas a las temperaturas durante del día (Cuadro 3.10; Figura 3.14 A-B). Pero en general, las membranas y acarreadores intrínsecos parecen ajustar su funcionalidad a las condiciones y temperaturas evaluadas en este estudio (Figura 3.15).

3.6 CONCLUSIONES

En ambos regímenes térmicos los procesos bioquímicos-fisiológicos, relacionados con la síntesis y consumo de azúcares y fluctuaciones en la concentración de osmolitos se ajustan en las hojas de plantas de *A. salmiana* jóvenes en forma variada. Pero el hecho de que las membranas celulares parecen inalteradas por exposición de las plantas a temperaturas diurnas promedio de 45 °C, por más de 2 h diarias, durante 2 semanas es notable.

3.7 LITERATURA CITADA

- ANTONY, E. y BORLAND, A.M. 2009. The Role and Regulation of Sugar Transporters in Plants with Crassulacean Acid Metabolism. In U. Lüttge *et al.* (eds.), Progress in Botany 70, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 127-143.
- ARRIZON, J., MOREL, S., GSCHAEDLER, A. y MONSAN, P. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* 122: 123-130.
- BAJJI, M., KINET, J.-M. y LUTTS, S. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 36: 61–70.
- BLACK, C.C., CHEN, J.Q., DOONG, R.L., ANGELOV, M.N. y SUNG, S.J.S. 1996. Alternative carbohydrate reserves used in the daily cycle of Crassulacean acid

- metabolism. In: Winter, K., y Smith, J.A.C. (eds) *Crassulacean Acid Metabolism; Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer, Berlin, pp. 31–43.
- BANZAI, T., HANAGATA, N., DUBINSKY, Z. y KARUBE, I. 2003. Fructose-2, 6-bisphosphate contents were increased in response to salt, water and osmotic stress in leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* by differential changes in the activity of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase. *Plant Molecular Biology* 53: 51–59.
- BEN HAMISSA, A.M., SEFFEN, M., ALIAKBARIAN, B., CASAZZA, A.A., PEREGO, P. y CONVERTI, A. 2012. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and Bioproducts Processing* 90: 17-21.
- BETHKE, P.C., SABBA, R. y BUSSAN, A.J. 2009. Tuber Water and Pressure Potentials Decrease and Sucrose Contents Increase in Response to Moderate Drought and Heat Stress. *American Journal of Potato Research* 86: 519-532.
- BOGDANOVIĆ, J., MOJOVIĆ, M., MILOSAVIĆ, N., MITROVIĆ, A., VUČINIĆ, Ž. y SPASOJEVIĆ, I., 2008. Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal* 37: 1241-1246.
- CAO, Y.-Y., YANG, M.-T., CHEN, S.-Y., ZHOU, Z.-Q., LI, X., WANG, X.-J. y BAI, J.-G., 2015. Exogenous sucrose influences antioxidant enzyme activities and reduces lipid peroxidation in water-stressed cucumber leaves. *Biologia Plantarum* 59: 147-153.
- CAO, Y.-Y., YANG, M.-T., LI, X., ZHOU, Z.-Q., WANG, X.-J. y BAI, J.-G., 2014. Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by

- modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents. *Scientia Horticulturae* 179: 67-77.
- CHAITANYA, K.V., SUNDAR D., y REDDY R., 2001. Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biologia Plantarum* 44: 379-384.
- CHRISTOPHER, J.T., y HOLTUM, J.A.M. 1998. Carbohydrate partitioning in the leaves of Bromeliaceae performing C3 photosynthesis or Crassulacean acid metabolism. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 371–376.
- DE WEERD, J.W., HILLER, L.K. y THORNTON, R.E., 1995. Electrolyte leakage of aging potato tubers and its relationship with sprouting capacity. *Potato Research* 38: 257–270.
- DENG, B., 2012. Antioxidative response of golden *Agave* leaves with different degrees of variegation under high light exposure. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1925-1933.
- ESCAMILLA-TREVIÑO, L.L., 2012. Potential of plants from the genus *Agave* as bioenergy crops. *BioEnergy Research* 5: 1-9.
- FARRAR, J., POLLOCK, C. y GALLAGHER, J., 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154: 1–11.
- FONDOM, N.Y., CASTRO-NAVA, S. y HUERTA, A.J., 2009. Photoprotective mechanisms during leaf ontogeny: cuticular development and anthocyanin deposition in two morphs of *Agave striata* that differ in leaf coloration. *Botany* 87: 1186-1197.
- FONDOM, N.Y., CASTRO-NAVA, S. y HUERTA, A.J., 2014. Field assessment of sub-epidermal leaf anthocyanin, PSII photochemistry, and the xanthophyll-cycle as

- photoprotective mechanisms in two morphs of *Agave striata*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 209: 131-141.
- GARCÍA, M.; PEÑA-VALDIVIA, C. B.; TREJO L., C.; VALLE G. S.; CORRALES G, J.; y SÁNCHEZ-URDANETA A. 2007. Efecto del potencial hídrico del suelo en el potencial osmótico y membranas celulares de nopalito (*Opuntia* spp.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 24 (Sup. 1): 305-311.
- GARCÍA R., M. T.; PEÑA-VALDIVIA, C. B.; C. TREJO; S. VALLE G.; J. CORRALES G.; y GARCÍA-NAVA, R. 2008. Tissue osmotic potential and membranes permeability of nopalitos (*Opuntia* spp.) affected by changes in soil water potential. *Journal of Professional Association for Cactus Development* 10: 133-147.
- GARCIA-MOYA, E., ROMERO-MANZANARES, A. y NOBEL, P.S., 2011. Highlights for *Agave* productivity: *Agave* productivity. *GCB Bioenergy* 3: 4-14.
- GILL, S.S. y TUTEJA, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- GLAUBITZ, U., ERBAN, A., KOPKA, J., HINCHA, D.K. y ZUTHER, E. 2015. Metabolite Profiling Reveals Sensitivity-Dependent Metabolic Shifts in Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under high night temperature stress. *Procedia Environmental Sciences* 29: 72.
- GUPTA, A.K., y KAUR, N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.

- HARE, P.D. y CRESS, W.A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M., ROYCHOWDHURY, R. y FUJITA, M., 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 9643-9684.
- HORACIO, P. y MARTINEZ-NOEL, G., 2013. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior* 8: e23316.
- HUANG, B., 2006. Cellular membranes in stress sensing and regulation of plant adaptation to abiotic stress. Plant-environment interactions. Rachmilevitch, S., DaCosta, M., Huang, B., (ed.) Florida, U.S., pp. 335-336.
- HUSSAIN, M.W., ALLEN JR, L.H. y BOWES, G., 1999. Up-regulation of sucrose phosphate synthase in rice grown under elevated CO₂ and temperature. *Photosynthesis Research* 60: 199–208.
- JONES, D.L., OWEN, A.G., y FARRAR, J.F., 2002. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soils solutions and soils extracts. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1893-1902.
- KAUSHAL, N., GUPTA, K., BHANDHARI, K., KUMAR, S., THAKUR, P. y NAYYAR, H., 2011. Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17: 203-213.
- KENYON, W.H., SEVERSON, R.F., y BLACK, C.C. 1985. Maintenance carbon cycle in Crassulacean acid metabolism plant leaves: source and compartmentation of carbon for nocturnal malate synthesis. *Plant Physiology* 77: 183–189.

- LALONDE, S., WIPF, D., y FROMMER, W.B. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55: 341–372.
- LIU, Y.C., TSENG, K.M., CHEN, C.C., TSAI, Y.T., LIU, C.H., CHEN, W.H. y WANG, H.L., 2013. Warm-night temperature delays spike emergence and alters carbon pool metabolism in the stem and leaves of *Phalaenopsis aphroide*. *Scientia Horticulturae* 161: 198-203.
- LOKA, D.A. y OOSTERHUIS, D.M., 2010. Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. *Environmental and Experimental Botany* 68: 258-263.
- LUJAN, R., LLEDIAS, F., MARTINEZ, L.M., BARRETO, R., CASSAB, G.I. y NIETO-SOTELO, J., 2009. Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant, Cell & Environment* 32: 1791-1803.
- LÜTTGE, U. 2007. Photosynthesis. In: Lüttge U. ed. *Clusia* a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity. *Ecological Studies*, 194: 135-186.
- MADHAVA RAO, K.V., RAGHAVENDRA, A.S. y REDDY, K.J. (eds.), 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Dordrecht: Springer.
- MAGALHÃES, L.M., SANTOS, F., SEGUNDO, M.A., REIS, S. y LIMA, J.L.F.C., 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* 83: 441-447.
- MAKI D, G., PEÑA-VALDIVIA, C. B., GUTIÉRREZ E., J. A., ARÉVALO G., M. DE L., y GAYTÁN A., A. 2010. Curvatura geotrópica, daño en membranas celulares y tasa

- respiratoria en tallos florales de *Antirrhinum majus* L., cv. Potomac White Ivory, tratados con AOA y TIBA. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 27: 574-593
- MORALES S., M. E. 2015. Fisiología de semillas y efecto de la temperatura en la permeabilidad de las membranas celulares de hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. Tesis de Maestría. Recursos Genéticos y Productividad, Fisiología Vegetal. México. 137 p.
- NOBEL, P.S., 1999. Physicochemical and Environmental Plant Physiology. Second Edition, L.A, U.S. 489 p.
- SÁNCHEZ-URDANETA, A. B., PEÑA-VALDIVIA, C. B., TREJO, C., AGUIRRE R., J. R., CÁRDENAS, E., y GALÍCIA J., A. 2003. Permeabilidad de las membranas radicales de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre y domesticado bajo déficit de humedad. *Interciencia* 28: 597-603.
- SÁNCHEZ-URDANETA, A., PEÑA-VALDIVIA, C. B., AGUIRRE, J. R., y CÁRDENAS E. 2005. Permeabilidad de las membranas radicales de plántulas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre y domesticada bajo déficit de humedad. *SABER, Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación*. Suplemento 17: 266-268.
- SHI, W., YIN, X., STRUIK, P.C., XIE, F., SCHMIDT, R.C. y JAGADISH, K.S.V. 2015. Grain yield and quality responses of tropical hybrid rice to high night-time temperature. *Field Crops Research*.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378429015300605>. Consulta: 9 enero 2016.

- SMITH, J.A.C., y BRYCE J.H. 1992. Metabolic compartmentation and transport in CAM plants. In: Tobin A. (ed) *Plant Organelles: Compartmentation of Metabolism in Photosynthetic Cells*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–167.
- TSOUGKRIANIS, N., PEÑA-VALDIVIA, C. B., TREJO L., C. MOLINA G. J., y SÁNCHEZ-URDANETA, A. B. 2007. Permeabilidad de las membranas radicales de maíz de alta calidad proteica (QPM) en sustrato deshidratado. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 24 (Supl. 1): 260-264.
- VAN DEN ENDE, W. y EL-ESAWI, S.K. 2014. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany* 108: 4-13.
- VIOLA, R. y DAVIES, H.V., 1992. A microplate reader assay for rapid enzymatic quantification of sugars in potato tubers. *Potato Research* 35: 55–58

4. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN ACUMULACION DE BIOMASA Y CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS Y BIOQUÍMICAS DE DOS ESPECIES DE MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*)

4.1 RESUMEN

La domesticación del género *Agave* ha generado divergencia morfológica entre las especies silvestres y cultivadas, la adaptabilidad de las plantas al estrés abiótico puede deberse a caracteres heredados o depender del proceso de domesticación. El objetivo fue evaluar la biomasa, el coeficiente de eficiencia fotosintética del FSII (Fv/Fm), el contenido de: glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), aminoácidos libres (AminoL), fenoles totales (FenoIT), en plantas de 5 meses de edad de *Agave salmiana* de tres procedencias y *A. mapisaga* obtenidas de semillas recolectadas en Hidalgo. Las plantas crecieron a 25/15 °C día/noche y se aclimataron en invernadero, posteriormente se mantuvieron en: (1) 25/25; (2) 25/15; (3) 45°C durante 4 horas, en 25/15°C; y (4) en invernadero (control). El diseño experimental fue completamente al azar. Los resultados se analizaron con ANDEVA y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey. Más biomasa seca ($P \leq 0.05$) se acumuló en las plantas en invernadero. En 25/25 y 45 °C disminuyó la biomasa seca e incrementó el contenido de AminoL en determinadas variantes. En *A. mapisaga*, hubo fotoinhibición en el invernadero y se relacionó por capacidad baja de acumulación de FenoIT. *A. salmiana* de Tlaxiaca, acumuló más biomasa y tendió a tolerar la temperatura constante.

Palabras clave: *Agave salmiana*, *Agave mapisaga*, estrés térmico, fotoinhibición, fenoles totales.

4.EFFECT OF TEMPERATURE IN BIOMASS ACCUMULATION AND BIOPHYSIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF MAGUEY PULQUERO PLANTS

(*Agave salmiana* y *A. mapisaga*)

4.2 ABSTRACT

Domestication of the *Agave* genus has led morphological differentiation between wild and cultivated species; plant adaptability to abiotic stress could be due to inherited characters or dependent of the domestication process. The aim of this study was to evaluate biomass, photosynthetic efficiency coefficient of the PSII (Fv/Fm), and the content of: glucose (Glu), fructose (Fru), and sucrose (Sac), free aminoacids (AminoL), total phenol (FenoIT), on 5-month old *Agave salmiana* from 3 origins and *Agave mapisaga* plants grown from seeds collected at Hidalgo. Plants were raised at 25/15°C and were acclimated to greenhouse conditions, thereafter were maintained on: (1) 25/25; (2) 25/15; (3) 45°C during 4 h, on 25/15 °C day/night; and (4) greenhouse (control). The experimental design was completely randomized, the results were analyzed with ANOVA and Tukey multiple comparison. Dry biomass accumulation ($P \leq 0.05$) was observed under greenhouse in all the plants. The temperatures 25/25 y 45 °C reduced biomass accumulation and increased AminoL in certain plants. *A. mapisaga* plants, were photoinhibited under greenhouse, related to its low capacity to accumulate FenoIT. *A. salmiana* from Tlaxiaca, gained greater biomass and tended to tolerate constant temperature.

Key words: *Agave salmiana*, *Agave mapisaga*, temperature stress, photoinhibition, total phenols.

4.3 INTRODUCCIÓN

La domesticación de especies vegetales es un proceso gradual y continuo en el cual las plantas sufren cambios fenotípicos y genéticos; este proceso es guiado por necesidades humanas (Figueredo *et al.*, 2015). La domesticación reduce la variabilidad genética y morfológica a través de la selección de caracteres deseables para los humanos y las especies generalmente se cultivan fuera de su hábitat natural. En el área de Mesoamérica y Aridoamérica el proceso de domesticación se ha realizado desde tiempos prehistóricos; es un proceso complejo que incorpora modelos de manejo de especies *in situ* solo con el mejoramiento de las condiciones de crecimiento de las plantas, introducción de otras especies en las áreas de manejo y otros (Parker *et al.*, 2014).

La alimentación en el periodo Arcaico Mesoamericano definió las especies que se emplearían posteriormente en el modelo agroecológico de milpa, donde se domesticarían especies como *Agave* spp., *Zea mays* L., *Solanum lycopersicum* L., *Phaseolus* spp. (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2012). El cultivo simultaneo de especies vegetales como maguey y maíz pudo ayudar a la supervivencia de los núcleos humanos prehispánicos en las zonas áridas del norte de México donde la cantidad de lluvia fue determinante para el logro o falla del establecimiento del maíz; por lo que, ante la escasez de maíz, el cultivo de maguey pudo incrementar las probabilidades de supervivencia en determinadas circunstancias climáticas (Anderies *et al.*, 2008).

La domesticación del genero *Agave* ha generado divergencia morfológica entre las especies silvestres y cultivadas, entre los caracteres seleccionados por el hombre se distinguen: plantas más grandes, que produzcan más savia, contenidos altos de

azúcares, contenido y tamaño menores de espinas y púas, y contenido menor de ciertos metabolitos secundarios en sus hojas que son agentes irritantes de la piel (Figueredo *et al.*, 2014). La selección de caracteres ha respondido a las necesidades y beneficios de las personas involucradas en el manejo de las plantas. En el caso de los magueyes, el contacto con extractos de las hojas es común la irritación pasajera de la piel; pero, se han reportado casos severos de dermatitis ocasionados por las saponinas y el oxalato de calcio de las hojas de *Agave americana* (Barabash-Neila *et al.*, 2011). Sin embargo, en la planta las saponinas cumplen funciones de protección contra patógenos y herbívoros, están involucradas en el desarrollo y la protección contra daño mecánico de la cutícula (Faizal y Geelen, 2013). Por lo anterior la selección de plantas con contenido menor de irritantes posiblemente ha representado una desventaja para las plantas, porque podrían ser más susceptibles a la presencia de patógenos.

Actualmente el manejo de las plantaciones de maguey es diverso, por las especies empleadas y por los fines comerciales. El cultivo de *Agave tequilana*, en la región de denominación del Tequila, es mayormente industrial; esto ha repercutido negativamente en el ambiente porque ha incrementado la erosión, la contaminación por agroquímicos y la pérdida de diversidad genética. En ciertas regiones de Jalisco los modelos tradicionales de manejo agrícola, como la milpa, son menos agresivos para el ambiente, y los magueyes se cultivan en terrazas para prevenir la erosión, y se intercalan otros cultivos anuales. La diversidad genética en las plantaciones con el modelo de milpa se ha documentado; en ellas de ellas, en las que se cultiva *A. angustifolia* la incidencia de plagas y pestes se reduce y la precocidad y heterogeneidad en la madurez de las plantas se incrementa; en contraste, las

plantaciones industriales de *A. tequilana* muestran variabilidad genética baja, porque se establecen con plántulas producidas con clones de un mismo material (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013). De acuerdo con Eguiarte *et al.* (2013) *A. tequilana* es un cultivar de *A. angustifolia*, y se ha demostrado que aquella posee menos diversidad genética que su predecesor silvestre *A. angustifolia*.

El incremento en la temperatura global alcanzó 0.6 °C entre 1990 y 2000; y se estimó la pérdida de 17 % en la productividad agrícola debido a este incremento (Madhava *et al.*, 2006). Las plantas, por ser organismos sésiles, poseen mecanismos de adaptación a temperaturas elevadas. Entre estos están los mecanismos de escape y tolerancia, que permiten completar el desarrollo de la planta. Como parte de esos mecanismos se ha observado la sobreexpresión de osmoprotectores, como la prolina, acumulación de metabolitos secundarios, antioxidantes, y otras respuestas metabólicas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Entre los fenómenos ocasionados por el calentamiento global, en ciertas regiones del mundo se ha observado el incremento de la temperatura nocturna, que en ocasiones puede ser mayor a las diurnas; este es un fenómeno que afecta el metabolismo de las plantas (Glaubitz *et al.*, 2015) en arroz (*Oryza sativa* L.) con las temperaturas nocturnas de 37 °C, que reducen la productividad (Shi *et al.*, 2015) e incrementa la biosíntesis de aminoácidos y poliaminas en cultivares sensibles (Glaubitz *et al.*, 2015).

Las enzimas involucradas en la fotosíntesis son altamente sensibles a los incrementos de temperatura y pueden verse afectadas antes que cualquier otro efecto se produzca en la planta, generalmente las temperaturas altas están asociadas a

intensidades luminosas altas, las cuales solas o en conjunto reducen la eficiencia fotosintética; la susceptibilidad del fotosistema II (FSII) por intensidad luminosa alta conduce a fotoinhibición, esto resulta principalmente por la diferencia entre las tasas de absorción y transferencia de la cadena de transporte de electrones la cual se satura y se detiene el flujo de electrones (Mathur *et al.*, 2014).

Las clorofilas y otros pigmentos fotosintéticos que conforman los complejos de cosecha de luz capturan fotones y conducen la energía a complejos proteínicos y otras moléculas que finalmente la conducen a los centros de reacción (CR) de ambos fotosistemas (FSI y FSII). Toda esta “maquinaria” fotosintética está inmersa en la membrana del tilacoide, en los cloroplastos. En el CR del FSII hay proteínas, pigmentos fotosintéticos y plastoquinonas, estas últimas reciben electrones del CR y los transfieren al complejo citocromo b6f, que es un intermediario en el camino de transferencia de electrones hacia FSI, y al final del proceso de transferencia de electrones en cadena se genera NADPH. Este último se consume en el ciclo de Calvin-Benson (Taiz y Zeiger, 2010).

En general, en condiciones óptimas el flujo de electrones en el FSII es constante; pero condiciones diversas, que generan estrés, pueden desbalancear el transporte de electrones debido a que el receptor final NADPH permanece reducido (sin posibilidad de aceptar más electrones), el exceso de electrones genera especies reactivas del oxígeno, que, en general, son altamente dañinas para las membranas del tilacoide (Mathur *et al.*, 2014); así, en esas condiciones el FSII se satura, su CR y las plastoquinonas también permanecen reducidas, por la imposibilidad de transferir los electrones hacia el complejo citocromo b6f. El estado de oxidación-reducción de este

sistema puede evaluarse indirectamente con los valores de fluorescencia de la clorofila del PSII mediante fotómetros (referencia).

En plantas en condiciones óptimas, adaptadas a un periodo breve de oscuridad, los electrones se transfieren adecuadamente después de exponer los tejidos fotosintéticos a un pulso de luz, y no reemite o reemite poca energía (en forma de fluorescencia) hacia el exterior, es decir la fluorescencia es mínima (F_0). Esto indica que las plastoquinonas están totalmente oxidadas y tienen la capacidad de recibir (y donar) electrones, si los pulsos de luz continúan se saturará el sistema, y las plastoquinonas estarán totalmente reducidas (o saturadas de electrones), lo que conducirá a que las clorofilas reemitan el exceso de energía al exterior en forma de fluorescencia; esto se califica como la fluorescencia máxima (F_m). Con estos valores de fluorescencia puede calcularse la que se conoce como fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$). Estas variables son útiles para evaluar la eficiencia fotosintética de organismos fotosintéticos, sin destruir los tejidos; para esto se emplea comúnmente el coeficiente de eficiencia fotoquímica del PSII, que se calcula con la relación F_v/F_m (Lambers *et al.*, 2008).

La productividad alta de ciertas especies del genero *Agave* en condiciones edafoclimaticas limitantes para la mayoría de las especies de plantas y su eficiencia en el uso del agua han despertado interés (Garcia *et al.*, 2011). En Australia se ha determinado la factibilidad de establecer plantaciones de *A. tequilana* para la producción de bioetanol y azúcares (Holtum *et al.*, 2011). En Sudáfrica la producción de *A. americana* se ha reincentivado para obtener productos múltiples de la planta (Ganduri *et al.*, 2015). Brasil e India son productores de fibra de *A. sisalana* y se espera

aprovechar sus azúcares y metabolitos secundarios, como saponinas y fenoles, como subproductos (Maharshi y Thaker, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014).

México es centro de distribución del género *Agave* (Gentry, 1982), ya que 75 % de las especies descritas se localizan aquí (García *et al.*, 2011); así, la riqueza genética de especies silvestres y cultivadas del país es abundante. Desde la época precolonial, en la región central del país, en el área de influencia cultural Teotihuacana-Tolteca, las plantas de maguey se han empleado para obtener su savia y fibras (Mora-López *et al.*, 2011). Actualmente la región incluye a los Estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Estado de México, y es rica en las especies *A. salmiana* y *A. mapisaga*. Las plantas de ambas especies se caracterizan por su gran tamaño y productividad alta de azúcares, principalmente se emplean para la extracción de su savia, que se fermenta para obtener pulque, por lo que ambas especies son conocidas como magueyes pulqueros.

Actualmente, parece indispensable recuperar la riqueza genética del género *Agave* para identificar las variantes y especies con adaptabilidad mayor a las condiciones actuales derivadas del cambio climático actual y el pronosticado. A pesar de la gran diversidad de variantes de magueyes pulqueros involucrados en el proceso de domesticación, la selección basada en caracteres morfológicos (Mora-López *et al.*, 2011) podría ser inadecuada para asegurar que las plantas toleren y se adapten a las condiciones climáticas pronosticadas. Como en otras especies, los tipos silvestres o con grado menor de domesticación muestran diversidad genética amplia y posiblemente adaptación mayor a condiciones de estrés. Los mecanismos de tolerancia a condiciones que generan estrés en las plantas se deben en gran parte a respuestas bioquímicas que les permiten desarrollarse. Es posible identificar y

cuantificar el contenido de metabolitos específicos que se sobre-expresan y señalizan condiciones de estrés.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura en la biomasa, coeficiente de eficiencia fotoquímica del PSII (F_v/F_m) y el contenido de fenoles totales, aminoácidos libres y azúcares solubles de plantas de 5 meses de edad de *A. salmiana* y *A. mapisaga* obtenidas de semillas recolectadas en el Estado de Hidalgo. La hipótesis fue que las plantas jóvenes de maguey modulan sus características biofísicas y bioquímicas en reacción a la temperatura ambiente independientemente del sitio de origen y de la especie.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

En el estudio se evaluaron plantas de *A. salmiana* y *A. mapisaga* de 5 meses de edad, que se obtuvieron de semilla. Las semillas se cosecharon de infrutescencias de plantas de plantas en Metepec, localidad Tortugas (*A. salmiana* y *A. mapisaga*), San Agustín Tlaxiaca, localidad El Durazno; y Zempoala, localidad Tlajomulco (ambos con *A. salmiana* solamente) del Estado de Hidalgo (Figura 4.1).

Estado de Hidalgo

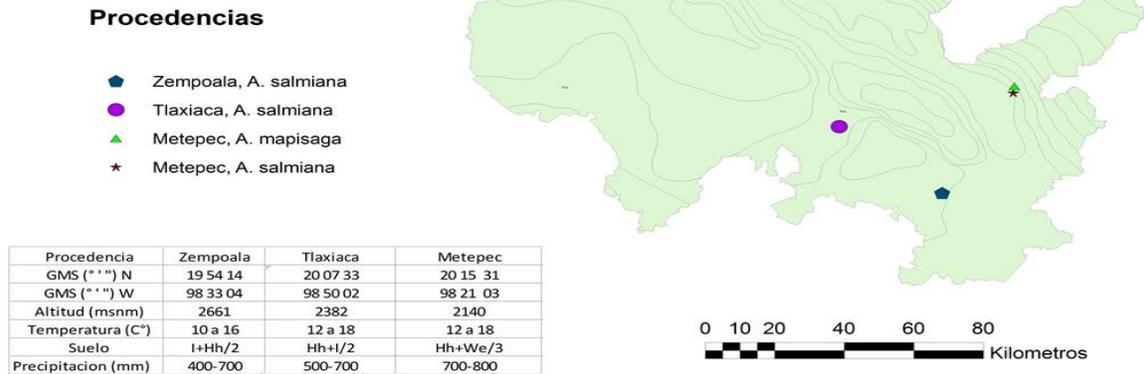


Figura 4.1 Lugares de recolecta de semillas de variantes de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) del estado de Hidalgo.

El grado de domesticación de las especies se asignó con base en los criterios morfológicos descritos por Mora-López *et al.* (2011) (Cuadro 4.1).

Las semillas se germinaron en recipientes con mezcla de compost:tierra agrícola:tezontle en proporción 1:3:1, en cámara con ambiente controlado: termoperiodo 25/15°C día/noche y fotoperiodo de 12/12 h con intensidad luminosa de $30 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ y riego dos veces por semana.

Cuadro 4.1 Características morfológicas (Mora-López *et al.*, 2011) de las plantas de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) que permiten reconocer el grado de domesticación de las variantes.

Municipio	Especie	Tamaño§			Abundancia de dientes	Tiempo de manejo de la plantación (años)
		Nombre regional	roseta	dientes		
Metepec	<i>A. mapisaga</i>	Carrizo	G	P	Escasos	40
Zempoala	<i>A. salmiana</i>	Manso	G	P	Pocos	70
Metepec	<i>A. salmiana</i>	Manso	M	M	Intermedios	30
Tlaxiaca	<i>A. salmiana</i>	Manso	M	G	Abundantes	10

§ G: grande, M: mediano, P: pequeño.

4.4.2 Establecimiento del experimento

Las plantas permanecieron en la cámara con ambiente controlado durante 2 meses, en las condiciones similares a las de la germinación. Luego, todas las plantas se transfirieron a un invernadero, para su aclimatación, por 2 meses (septiembre y octubre del 2015).

Las plantas con 4 meses de edad se separaron en grupos, tres permanecieron un mes en alguna de las siguientes condiciones de temperatura, en cámara con ambiente controlado y fotoperiodo de 12/12 h con intensidad luminosa de $30 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$: (1) $25/25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ día/noche; (2) $25/15 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ día/noche, (3) $45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h (11:30 a 15:30 del día) y termoperiodo promedio de $25/15 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ día/noche.

Otro grupo se mantuvo en las siguientes condiciones: (4) 33/12 °C máxima media /mínima media; 40 °C por 4 h, entre las 11:30 a 15:30 h, y termoperiodo promedio de 24.5/12 °C día/noche. Este grupo permaneció en el invernadero, durante noviembre del 2015, con intensidad luminosa promedio, al medio día, dentro del invernadero fue $332 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al nivel de las plantas (con malla blanca contra antiafidos para disminuir la irradiación) fuera de la protección de la malla la radiación era $560 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.4.3 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 16 tratamientos que se obtuvieron con la combinación de las cuatro variantes (*A. mapisaga* de Metepec, *A. salmiana* Metepec, *A. salmiana* de Tlajomulco y *A. salmiana* Tlaxiaca) y los cuatro regímenes de temperatura ($25/25 \pm 2$ °C día/noche, $25/15 \pm 2$ °C día/noche, 45 ± 2 °C por 4 horas y termoperiodo de $25/15 \pm 2$ °C día/noche y 40 °C por 5 h y termoperiodo medio máximo $33/12 \pm 2$ °C). El efecto de la temperatura se evaluó al concluir un mes. La unidad experimental fue una planta y se emplearon quince repeticiones de cada tratamiento.

4.4.4 Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron fueron: biomasa húmeda y seca de la planta, y coeficiente de eficiencia fotosintética (F_v/F_m), contenido de glucosa (Gluc), fructosa (Fruc), sacarosa (Sac), aminoácidos libres (AminoácL) y fenoles totales (FenoIT) en las hojas.

4.4.5 Determinación de biomasa

La biomasa húmeda y seca de las plantas se evaluó en una balanza analítica (Marca Scientiech Modelo No: SA120, precisión ± 0.0001 g). Para obtener la biomasa seca, las plantas se congelaron individualmente en nitrógeno líquido, se almacenaron a -20 °C hasta el momento en que se deshidrataron por liofilización (Labconco® modelo Free Zone 6, Kansas City, MO, EE.UU.). Las hojas secas se pesaron en balanza analítica. Las hojas deshidratadas se trituraron en mortero y se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente.

4.4.6 Determinación de eficiencia fotosintética (Fv/Fm)

Las plantas se mantuvieron en oscuridad por 10 minutos, luego cada planta se colocó en un fluorómetro de cámara cerrada (FluorCam, Photon Systems Instruments, Republica Checa) y con el software FluorCam 6.0 se determinó la Fv/Fm. Para esto se realizó análisis PAM quenching, con: duración de la medición de F0 de 5.04 s, duración del pulso Fm de 800 ms, intensidad del pulso Fm de 50 % y periodo de relajación oscura después de Fm de 20 s. Los valores complementarios fueron: inducción Kautsky, exposición a luz actínica por 61 s, intensidad de luz actínica de 40 %, número de mediciones Fm en luz con 5 pulsos, periodo de relajación oscura después de efecto Kautsky de 100 s, número de mediciones Fm durante el periodo de relajación oscura con 5 pulsos.

4.4.7 Determinación de azúcares solubles por método enzimático

Para cuantificar el contenido de Gluc, Fruc y Sac se obtuvo el extracto etanólico de 20 a 30 mg de los tejidos, deshidratados y triturados. El tejido se colocó en viales plásticos de 2 mL, se añadieron 800 μL de etanol al 80 % en agua (v:v). Los viales se calentaron en baño maría a 80 °C, por 30 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 32,200 g por 10 min. El sobrenadante se cuantificó y separó con micropipeta, se colocó en un vial plástico de 2 mL, clarificó con una pizca de carbón activado, se agitó en vortex, y el carbón activado asentó por centrifugación a 32,200 g por 10 min.

Los azúcares se cuantificaron por el método modificado descrito por Viola y Davies (1992). En cada pozo de una microplaca NUNC-F (de 96 pozos) se agregaron 150 μL de la mezcla de reacción (Cuadro 4.2) y 10 μL de alícuota del extracto etanólico de la muestra, luego se agregaron 0.15 U de enzima hexoquinasa (EC 2.7.1.1), disuelta en 10 μL de mezcla de reacción, la microplaca se mantuvo a 37 °C por 10 min, se agitó por 3 min y se realizó una lectura a 340 nm en el espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo UV-Vis, Multiskan FC).

Enseguida, 0.12 U ($10 \mu\text{L}^{-1}$) de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (g6pdh; EC 1.1.1.49) se agregaron a la mezcla y se mantuvo en la microplaca a 37 °C por 30 min. Después de agitar se leyó a 340 nm. El procedimiento se repitió con 0.12 U ($10 \mu\text{L}^{-1}$) de glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9) y con invertasa (β -fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26), en el último caso se mantuvieron a 30 °C por 45 min.

Así, se obtuvieron cuatro lecturas espectrofotométricas, con ellas se calcularon las concentraciones de Gluc, Fruc y Sac, por diferencia y con la curva de calibración de Gluc (10 mM).

Cuadro 4.2 Composición de la mezcla de reacción (10 mL) para cuantificar azúcares en tejidos de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*).

Compuesto	Concentración	Volumen
HEPES pH 8.0	500mM	2.00 mL
KCl	200mM	2.50 mL
MgCl ₂	200mM	150.00 µL
ATP		0.0085 g
NAD		0.00283 g
H ₂ O		5.40 mL

4.4.8 Determinación de aminoácidos totales por método colorimétrico en microplaca

El contenido de AminoácL se cuantificó con el método descrito por Jones *et al.* (2002) modificado. Setenta y cinco µL de los mismos extractos etanólicos que se utilizaron para cuantificar los azúcares se colocaron en los pozos de la microplaca, se adicionaron 25 µL de etanol al 80 % (en agua v:v) y 75 µL de solución de ninhidrina (2 % en etanol, p:v), la microplaca se mantuvo a 80 °C por 30 min, se dejó enfriar y se

añadieron 100 μ L de mezcla estabilizadora de etanol al 50 % (en agua v:v), se agitó por 30 seg y se leyó la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro (Thermo Multiskan FC). La concentración se determinó con la curva estándar de diluciones de glicina (1 mM).

4.4.9 Determinación de fenoles totales por método colorimétrico en microplaca

Los FenolT se evaluaron con el método descrito por Magalhães *et al.* (2010) con algunas modificaciones. A 50 μ L del extracto etanólico que se obtuvo previamente de cada muestra, se les añadieron 50 μ L del reactivo Folin Ciocalteu, disuelto 1:20 en agua destilada (v:v), se agregaron 100 μ L de NaOH 0.175 M, para iniciar la reacción. Las mezclas se aplicaron en los pozos de una microplaca, que se mantuvo 3 min a 30 °C, enseguida se agitó y la absorbancia se determinó a 620 nm en el espectrofotómetro (Thermo UV-Vis, Multiskan FC).

El contenido de fenoles se expresó como μ moles de ácido gálico por g de tejido seco, para esto se utilizaron curvas de calibración con ácido gálico (10 mM). De acuerdo con Magalhaes *et al.* (2010) el reactivo Folin-Ciocalteu puede reaccionar con ácidos orgánicos y azúcares solubles, por lo que la posible interferencia de esos compuestos en el contenido de fenoles se determinó con curvas estándar de ácido málico 5 mM, Gluc 10 mM, glicina 1 mM y como control negativo ácido cinámico 5 mM.

4.4.10 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con ANDEVA y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey, con el programa estadístico SAS 9.4, entre las variantes y las temperaturas.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Biomasa

Entre los tratamientos hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de biomasa. Los termoperiodos de 25/25 y 33/12 °C mostraron contenido similar en biomasa total o húmeda; en contraste, en el termoperiodo 25/15 °C fue 14.4 % menor (Cuadro 4.3).

La temperatura óptima para que se realice adecuadamente la fotosíntesis varía entre las especies y depende en parte de su tipo de metabolismo; la mayoría se ubica entre 20 y 30 °C (Yamori *et al.*, 2014). En el presente estudio el contenido de biomasa seca en 33/12 °C fue 46 % mayor respecto a 25/15 y +45 °C, y casi el doble que a 25/25°C. Es decir que la temperatura cálida favoreció el crecimiento, expresado como acumulación de biomasa seca, en las plantas de maguey, independientemente de la especie y origen (Cuadro 4.3).

Independientemente de la temperatura, las variantes *A. salmiana* de Tlaxiaca y de Zempoala acumularon 17.95 y 19.58 % más biomasa húmeda que la de Metepec (Cuadro 4.4). Este resultado indica que aunque las variantes son de la misma especie, el origen de las plantas madre podría haber modulado esta característica en las plantas producidas con sus semillas.

Cuadro 4.3. Efecto de la temperatura en la biomasa y coeficiente de eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en plantas de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) de cinco meses de edad (n=60).

Temperatura (°C) día/noche	Biomasa húmeda (g)	Biomasa Seca (g)	Coeficiente de eficiencia fotosintética (Fv/Fm)
25/25	7.2422 a	0.3507 C	0.8145 a
25/15	6.1640 b	0.4606 B	0.8048 a
33/12	7.2756 a	0.6452 A	0.7911 b
+45	6.9684 ab	0.4210 B	0.8100 a
DMS	0.8268	0.0602	0.0135

DMS: diferencia mínima significativa; valores seguidos con letra distinta en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)

La variante *A. mapisaga* de Metepec en la condición 25/25 °C acumuló menos biomasa (Figura 4.2); en los termoperiodos 25/15 y +45 °C la acumulación de biomasa húmeda y seca (Figura 4.2) se mantuvo en el mismo intervalo. Esto es notable porque la respuesta permite sugerir tolerancia a temperaturas altas, ya que la biomasa seca no disminuyó con 45 °C; aunque, ambas especies mostraron cierta sensibilidad a las

temperaturas diurnas/nocturnas constantes, que se observó cómo acumulación baja de biomasa seca (Figura 4.2 y 4.3).

Cuadro 4.4. Efecto de la temperatura en la biomasa húmeda y seca acumulada, y coeficiente de eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en plantas, de cinco meses de edad, de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) obtenidas con semillas recolectadas en tres localidades de Hidalgo (n=60).

Variantes	Biomasa Húmeda (g)	Biomasa seca (g)	Coefficiente de eficiencia fotosintética (Fv/Fm)
<i>A. mapisaga</i> Metepec	6.8897 Ab	0.4723 ab	0.8011 a
<i>A. salmiana</i> Tlajomulco	7.5100 A	0.4622 ab	0.8055 a
<i>A. salmiana</i> Metepec	6.2803 B	0.4327 b	0.8035 a
<i>A. salmiana</i> Tlaxiaca	6.9702 Ab	0.5104 a	0.8108 a
DMS	0.8268	0.0602	0.0135

DMS: diferencia mínima significativa, valores seguidos con letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

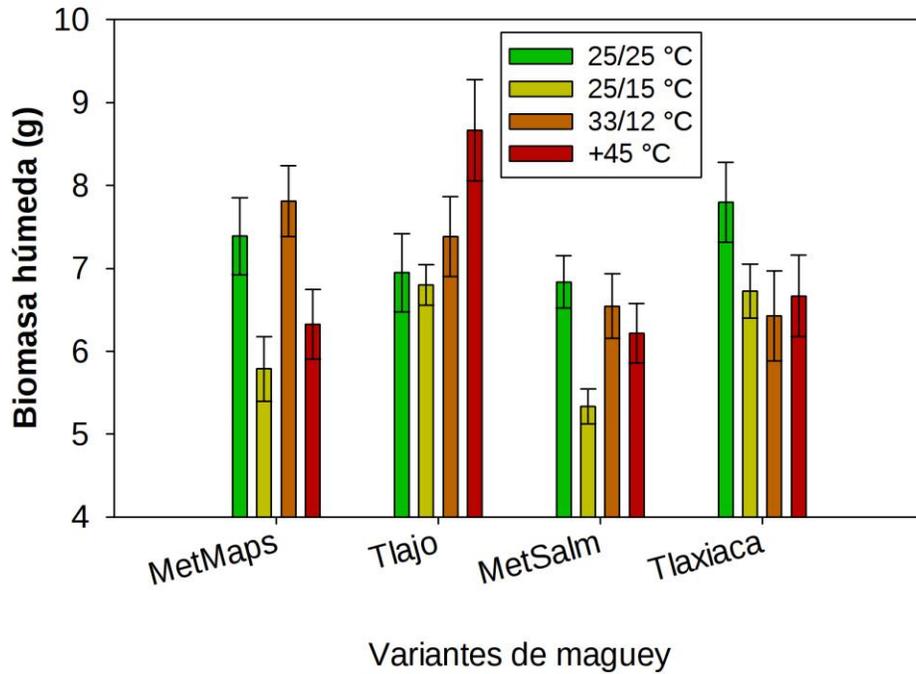


Figura 4.2. Contenido de biomasa húmeda ($g \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche ($n=15$). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

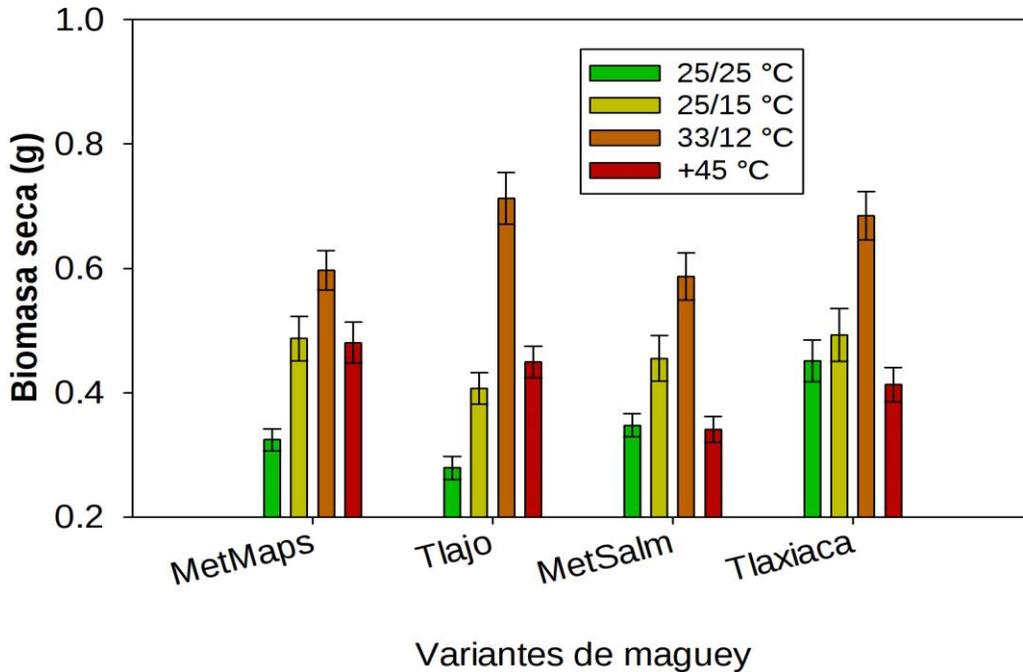


Figura 4.3 Contenido de biomasa seca ($g \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche ($n=15$). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

La variante Tlajomulco en la condición +45 °C acumuló más biomasa húmeda que las otras variantes (Figura 4.2), pero su biomasa seca fue similar a las otras variantes, con excepción de *A. salmiana* de Metepec, que fue la menor (Figura 4.3). Así ambas

variantes de Metepec (*A. salmiana* y *A. mapisaga*) mostraron cierta tolerancia a temperaturas altas y sensibilidad a la temperatura diurna/nocturna constante.

En general, el crecimiento menor de los tejidos como acumulación baja de biomasa seca puede ser el resultado del incremento en la respiración, ya que la respiración celular puede aumentar con la temperatura, y la producción de fotosintatos disminuye por el consumo de carbohidratos en la planta (Yamori *et al.*, 2014).

En el presente estudio, la acumulación de agua en los tejidos de las plantas en algunos regímenes térmicos puede ser un efecto del incremento de la respiración, la cual químicamente es el proceso inverso a la fotosíntesis, con glucólisis de fotosintatos y formación de agua y CO₂ (Taiz y Zeiger 2010). Considerando la eficiencia en el uso del agua de las plantas CAM, el agua producida por la respiración podría permanecer en los tejidos de la planta debido al cierre estomático diurno. En contraste, las plantas en estrés térmico podrían incrementar la demanda de agua con lo que favorecen el alivio del estrés; además, diversas funciones metabólicas se incrementan y compensan o evitan la pérdida de fotosintatos, lo que resulta en incremento en la producción de metabolitos primarios y secundarios con funciones antioxidantes y osmoprotectoras, también incrementan las reacciones redox, el flujo iónico de las membranas, entre otros cambios (Mathur *et al.*, 2014).

En el presente estudio, la mayoría de las variantes en la condición térmica 25/25 °C el contenido de biomasa húmeda fue similar o mayor pero se redujo su biomasa seca respecto a los demás termoperiodos. Estudios en cultivares de arroz en temperatura nocturna similar a la diurna se observó disminución de la biomasa acumulada por incremento de la respiración (Laza *et al.*, 2015). En el presente estudio

no se observó un efecto similar en la variante Tlaxiaca que permaneció con temperatura constante día/noche, pues su contenido de biomasa húmeda fue alto (Figura 4.2) y el contenido de biomasa seca fue similar a de las condiciones 25/15 y +45 °C (Figura 4.3). Esta respuesta, puede tomarse como evidencia de que la variante tolera el régimen de temperatura constante. Esta respuesta se ha observado en especies CAM de climas tropicales húmedos, en las que su desempeño es óptimo cuando las temperaturas nocturnas son similares a las diurnas (Lüttge, 2007).

En la condición 33/12 °C, en invernadero, el contenido de humedad fue variable entre las variantes (Figura 4.2); pero, la biomasa seca acumulada fue la mayor en todas las variantes respecto a los otros regímenes térmicos (Figura 4.3). Por lo que puede anticiparse que estas condiciones parecen óptimas para las dos especies y las cuatro variantes. Aunque, se ha demostrado que la eficiencia metabólica del ciclo CAM depende de la cantidad de luz recibida durante la fase III (Luttge, 2007) lo cual resulta en mayor acumulación de biomasa. Por lo que ambas condiciones en invernadero, luz y temperatura, podría haber favorecido la acumulación de biomasas en las plantas.

En la naturaleza el éxito de la reproducción sexual del género *Agave* depende de plantas nodriza que facilitan la germinación y supervivencia de las plántulas en condiciones extremas del ambiente (Rangel-Landa *et al.*, 2015). La germinación de semillas de *A. potatorum* y el establecimiento de plantas de dos años de edad en vivero, en áreas de su distribución natural, fue posible con la disminución de la intensidad luminosa natural modificando la ubicación de las plántulas, por plantas nodriza y por la exposición solar recibida en relación a la inclinación de la Tierra; en conjunto, todo ejerció un efecto benéfico para su establecimiento, a pesar que la

sombra reduce la acumulación de ácidos orgánicos a lo largo del tiempo, favoreció la elongación y establecimiento (Rangel-Landa *et al.*, 2015).

4.5.2 Coeficiente de eficiencia fotoquímica (Fv/Fm)

La luz es un factor decisivo para el establecimiento y desarrollo óptimo de las plantas del género *Agave* y las evidencias indican que en las etapas tempranas del desarrollo, como las de las plantas del presente estudio, son notablemente sensibles a la luz. La densidad máxima promedio de flujo de fotones de la energía solar radiante en la superficie terrestre es de alrededor de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El punto de compensación es el que corresponde a la cantidad de luz necesaria para que el consumo de carbohidratos por la respiración sea igual al necesario para la producción de fotosintátos, oscila entre 8 y 16 y 6 y 14 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para plantas C3 y C4 (Nobel, 1999). Las plantas MAC poseen alta plasticidad para la condición luminosa, el cultivar *Aechmea* “Maya” puede ajustar su metabolismo con intensidad notablemente baja de luz, $0.46 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, con fotoperiodo de 8 h (Ceusters *et al.*, 2011). Plantas del género *Agave* incluso modifican su morfología dependiendo de la intensidad luminosa a la que estén expuesta; individuos de la misma especie expuestos a la radiación solar directa y reducida han generado confusión entre los especialistas para su identificación taxonómica, ya que han llegado a clasificarlas como especies diferentes por la divergencia morfológica producto de la intensidad luminosa (Gentry, 1982).

En el presente estudio, la intensidad de luz en cámara con ambiente controlado fue el doble que el punto de compensación reportado para plantas C3 y C4, la intensidad luminosa promedio del invernadero fue 10 veces mayor respecto al de la

cámara con ambiente controlado; lo permite explicar que la biomasa seca en las plantas en invernadero (33/12 °C) fuera el doble de las plantas en la cámara con ambiente controlado (25/25 ± 2 °C día/noche). La capacidad de adaptación de las plantas MAC a exposiciones solares altas se ha señalado frecuentemente; pero, está corresponde a plantas adultas, por sus mecanismos anatómicos y fisiológicos para disipar la energía radiante excesiva (Niewiadomska y Borland, 2008). En contraste, parece que no se han documentado los requerimientos luminosos para plantas jóvenes. Lo que es conveniente continuar los estudios referentes a los efectos de la luz con intensidades variables en plantas jóvenes de *Agave* y determinar el punto de compensación, punto óptimo y máximo de intensidad de luz.

Las temperaturas altas generalmente están asociadas a intensidades luminosas altas, las cuales reducen la eficiencia fotosintética debido a la susceptibilidad del FSII al estrés oxidativo por intensidad luminosa alta (Mathur *et al.*, 2014). Pero, la eficiencia de la cosecha de fotones del FSII de las cuatro variantes de maguey, en general, no se modificó por los regímenes de temperatura evaluados; ya que, los valores de la relación Fv/Fm a 25/25, 25/15, y +45 °C no fueron diferentes ($p > 0.05$). La excepción fue la variante *A. salmiana* de Tlaxiaca en temperatura constante (25/25 ± 2 °C día/noche) que presentó Fv/Fm fue estadísticamente mayor (Figura 4.4). En todas las variantes en la condición térmica +45 °C el índice Fv/Fm (Figura 4.4) fue superior respecto a las que permanecieron en el invernadero; por lo que, si consideramos que la temperatura en el invernadero fue menor a 45 °C, la intensidad luminosa sería la que afectó la cosecha de fotones del FS II y no la temperatura.

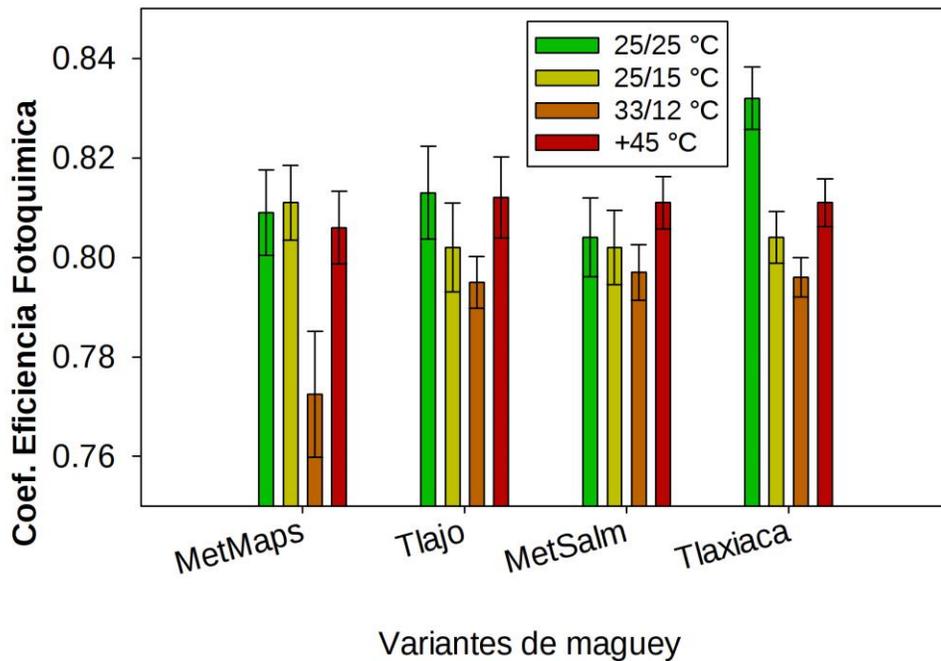


Figura 4.4 Coeficiente de eficiencia fotoquímica del Fotosistema II (\pm error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

En el presente estudio, las plantas fueron analizadas al medio día, tomando en cuenta la incidencia luminosa a esa hora es posible que en las plantas procedentes del invernadero las plastoquinonas, del FSII, estuvieran parcial o totalmente reducidas, por

lo que se incrementó F_0 , que, a la vez, redujo la relación F_v/F_m . Esto confirma la saturación de la cadena de transporte de electrones.

En parte, la biomasa seca es resultado de la cosecha y transporte de fotones del PSII, por lo que la fotoinhibición en invernadero pudo ser una condición temporal, pues las cuatro variantes acumularon más biomasa en invernadero respecto a los otros tres regímenes térmicos (Cuadro 4.3; Figura 4.3).

Las plantas al fotoinhibirse generan compuestos antioxidantes para prevenir daño fotónico por las especies reactivas del oxígeno (Mathur *et al.*, 2014). Existe evidencia de que las plantas jóvenes de *A. salmiana* evitan el deterioro del PSII mediante su inactivación. Al respecto, Campos *et al.* (2014) observaron que las plantas de *A. salmiana* recuperaron su eficiencia fotosintética después del estrés severo por déficit de humedad, debido a que las plantas ajustaron su metabolismo, con lo que la integridad fotoquímica del PSII se mantuvo. Aunque las especies MAC estén adaptadas a intensidades luminosas altas, se ha demostrado que poseen capacidad limitada para dispersar el exceso de fotones, pero en condiciones naturales no es un estrés persistente, ya que sus características anatómicas les permiten sobreponerse; es el caso del “auto sombreado” entre sus hojas, con orientación cenital foliar respecto al sol, con lo que evitan las horas de intensidad luminosa mayor (Niewiadomska y Borland, 2008; Nobel, 1999). Así, la fotoinhibición parece un mecanismo de fotoprotección, que permite mantener la integridad de los fotosistemas (Niewiadomska y Borland, 2008).

En la variante *A. mapisaga* de Metepec la condición de invernadero (33/12 °C) el índice F_v/F_m fue significativamente menor respecto a los demás termoperiodos (Figura

4.4). Esto indicó que en las plantas de esa especie hubo fotoinhibición y podría relacionarse directamente con el contenido de FenolT de la variante.

4.5.3 Contenido de fenoles totales (FenolT)

En general, el contenido de FenolT fue 77 %, ($P \leq 0.05$) mayor en las plantas que se mantuvieron en invernadero (33/12 °C) respecto a las de las que se mantuvieron a 25/15 y 45 °C y (más del doble) respecto a las que estuvieron a 25/25 \pm 2 °C día/noche (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5 Efecto de la temperatura en el contenido de fenoles totales y aminoácidos libres en plantas de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) de cinco meses de edad (n=60).

Temperatura (°C) día/noche	Fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1}$)	Aminoácidos libres
25/25	0.9153 c	40.905 a
25/15	1.2825 b	27.081 b
33/12	2.1805 a	13.521 c
+45	1.1841 bc	38.349 a
DMS	0.2826	10.433

DMS: diferencia mínima significativa, valores seguidos con letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Con excepción de *A. mapisaga* las variantes de *A. salmiana* mostraron contenido mayor de FenolT en invernadero en comparación con las otras condiciones térmicas (Figura 4.5). Este resultado podría relacionarse con algún otro factor, como la intensidad de luz, ya que no se observaron diferencias entre las plantas en los otros regímenes térmicos.

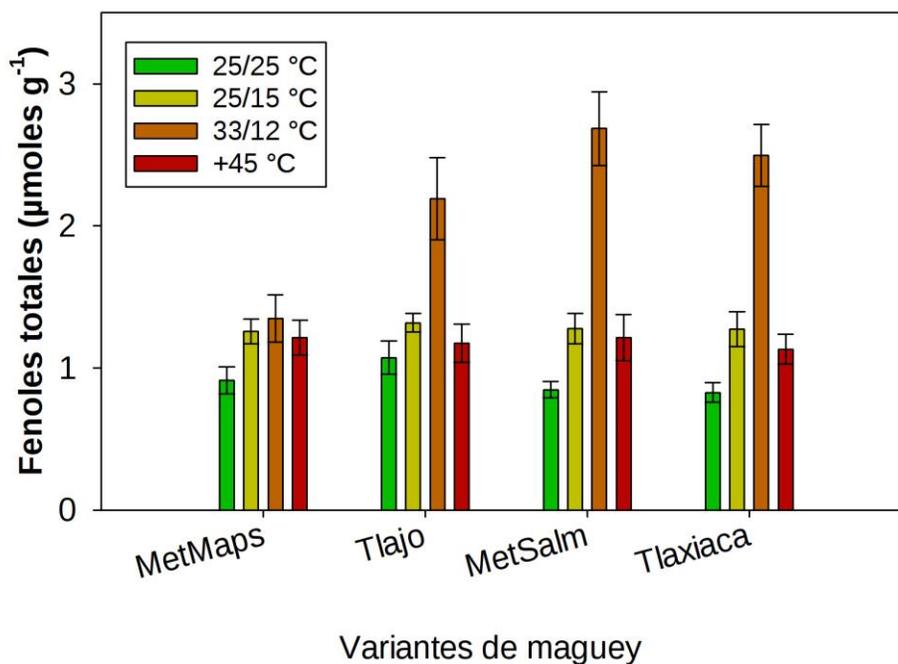


Figura 4.5 Contenido de fenoles totales ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

En *A. mapisaga* el contenido de FenolT fue estadísticamente similar en los cuatro termoperiodos (Figura 4.5). Por lo que *A. mapisaga* respondió diferente a las condiciones de temperatura que *A. salmiana*. Este resultado coincidió con el coeficiente de eficiencia fotoquímica (Fv/Fm) menor en invernadero (33/12 °C) de la especie, respecto a las demás temperaturas (Figura 4.4). Lo anterior indica que *A. mapisaga* acumuló compuestos fenólicos insuficientes para apoyar la disipación de fotones, por lo que se detectó fotoinhibición.

Como parte del grupo de los compuestos fenólicos, los flavonoides se acumulan en las plantas en respuesta a exposición a luz UV-B, que por su estructura química absorben la luz UV-B, y funcionan como filtros protectores (Gill y Tuteja 2010). Entre los flavonoides están las antocianinas, que son pigmentos que se acumulan en la vacuola, con capacidad de absorber luz UV-B, y su acumulación se relaciona positivamente con la cosecha de fotones del FSII y la asimilación de C. Fondom *et al.* (2009) observaron acumulación mayor de antocianinas en hojas de *A. striata* por exposición a la luz. También en *A. striata* las antocianinas se identificaron como mecanismo fotoprotectivo, que filtran la luz y reducen la dependencia del ciclo de las xantofilas para la protección de los fotosistemas (Fondom *et al.*, 2014).

El grado de domesticación podría influir en la respuesta a la intensidad luminosa, ya que, como las especies de otros géneros, en las de *Agave* se ha seleccionado plantas con contenido menor de metabolitos secundarios; es el caso de algunos con efecto urticante en la piel de humanos (Figueredo *et al.*, 2014) que al estar en concentración menor permiten el manejo menos riesgoso de las plantas. Pero, al

parecer esta condición representa una desventaja para la planta ya que los metabolitos pueden contrarrestar el efecto del estrés biótico y abiótico (Viladomat y Bastida, 2015).

Entre los metabolitos secundarios principales en el género *Agave* están las saponinas y los compuestos fenólicos (Ben Hamissa *et al.*, 2012). De acuerdo con los resultados del presente estudio el contenido de FenolT podría ser un criterio de selección de especies sensibles y tolerantes al estrés por luz.

Las cuatro variantes mostraron el contenido menor de FenolT en la condición térmica de 25/25 °C (Figura 4.5) en comparación con las otras tres condiciones. En plantas MAC temperaturas nocturnas similares a las diurnas reducen la acumulación de ácidos orgánicos por alteración de la respiración (Luttge, 2007).

La mayoría de los compuestos fenólicos se origina de los caminos metabólicos identificados como ruta del ácido shikimico y ruta del ácido malónico, que utilizan como sustrato base productos de la glucolisis (Taiz y Zeiger, 2010). Además, la respiración en las plantas se da principalmente a través de la glucolisis de los fotosintatos, con la producción de energía química (ATP) y otros sustratos para rutas biosintéticas diversas (Dey y Harborne, 1997).

Ya que en el presente estudio la temperatura nocturna similar a la diurna redujo la acumulación, y probablemente la síntesis, de FenolT, es posible que haya habido consumo extra de recursos por la respiración, con lo que podría calificarse esa condición térmica como estresante para las plantas de maguey, aunque la temperatura diurna/nocturna (25/25 °C) no sea alta, como en el caso de arroz (30/28 °C) (Glaubitz *et al.*, 2015).

4.5.4 Contenido de aminoácidos libres (aminoL)

El contenido de AminoL fue similar en la condición con temperatura diurna/nocturna constante ($25/25 \pm 2$ °C) que con la temperatura diurna más alta 45 ± 2 °C con; en contraste, con la condición térmica 25/15 el contenido de AminoL fue 46.71 % menor y en invernadero casi un tercio respecto a las primeras dos condiciones (Figura 4.6). En dependencia del género o la especie, la prolina puede ser el aminoácido libre más abundante en las plantas y frecuentemente su concentración incrementa en respuesta al estrés biótico y abiótico; se ha identificado su papel osmoprotector, antioxidante, estabilizador de las funciones celulares y coadyuvantes en la recuperación del estrés (Hare y Cress, 1997). La acumulación de AminoL debido a la temperatura constante día/noche puede tomarse como indicio de respuesta metabólica de la planta al estrés, aunque la temperatura no fuera extremadamente alta.

Independientemente del régimen térmico, el contenido de AminoL de las variantes *A. salmiana* de Tlaxiaca fue cerca de un tercio menor ($P \leq 0.05$), que la de Tlajomulco (Cuadro 4.6). En cultivares de arroz sensibles al estrés por calor nocturno se acumularon compuestos nitrogenados, como putrescina, espermina y espermidina principalmente, aunque también prolina (Glaubitz *et al.*, 2015).

En el presente estudio, la acumulación de AminoL en las plantas en condiciones térmicas 25/25 y +45 °C puede interpretarse como reacción a estrés, por ausencia de temperatura nocturna fresca en el primer caso y por temperatura diurna alta en el segundo caso. Además, entre las variantes, como en Tlaxiaca, el contenido menor de AminoL indica cierta tolerancia de la especie a ciertas condiciones de estrés térmico.

Cuadro 4.6 Efecto de la temperatura en el contenido de fenoles totales y aminoácidos libres en plantas de dos especies de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*), de cinco meses de edad (n=60).

Variantes	Fenoles		Aminoácidos	
	Totales		libres	
	(μmoles g ⁻¹)			
<i>A. mapisaga</i> Metepec	1.1838	b	31.265	ab
<i>A. salmiana</i> Tlajomulco	1.4441	ab	36.235	a
<i>A. salmiana</i> Metepec	1.506	a	29.095	ab
<i>A. salmiana</i> Tlaxiaca	1.4354	ab	23.347	b
DMS	0.2826		10.433	

DMS: diferencia mínima significativa, valores seguidos con letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)

En la variante *A. mapisaga* de Metepec se observó el contenido estadístico hasta nueve veces mayor del contenido de AminoL respecto a los demás tratamientos que incluyeron esa especie (Figura 4.6). Todas las variantes de *A. salmiana* mostraron diferencias significativas, con los niveles mayores de AminoL, de hasta cinco veces más, en la condición de +45 °C respecto a las demás condiciones térmicas (Figura 4.6). Estos resultados indicaron reacción diferente a ciertas temperaturas entre las especies. *Agave mapisaga* pareció menos sensible a las temperaturas altas de 33 y 45 °C, en contraste *A. salmiana* independientemente de su origen tendieron a ser más sensibles sólo a la temperatura mayor (Figura 4.6).

La acumulación de AminoL puede interpretarse como la degradación de proteínas o un ajuste metabólico en la biosíntesis de compuestos nitrogenados que permiten el alivio al estrés en detrimento de la acumulación de biomasa seca (Glaubitz *et al.*, 2015; Laza *et al.*, 2015).

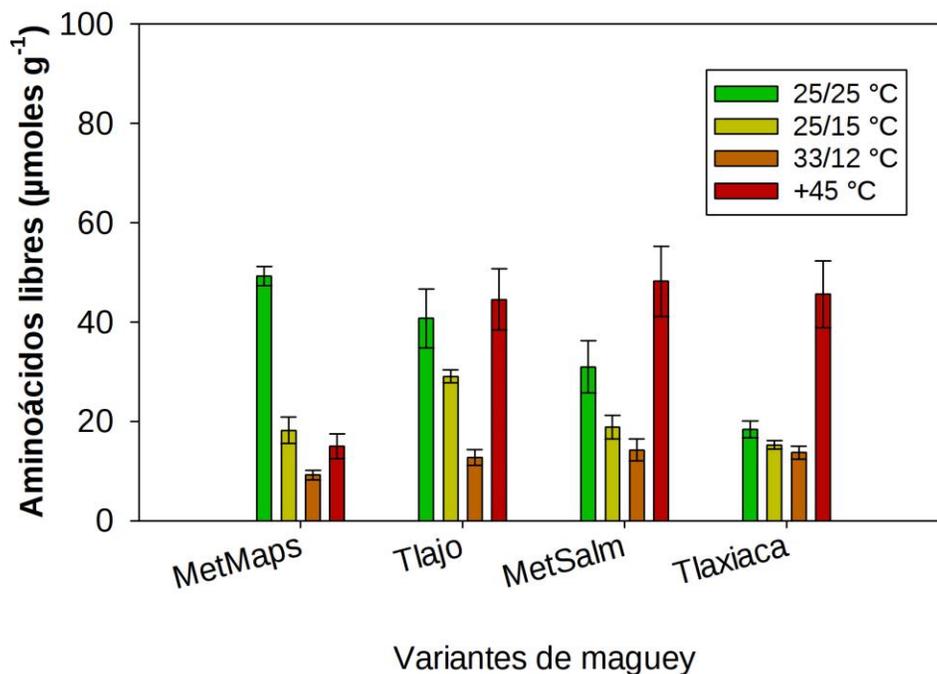


Figura 4.6 Contenido de aminoácidos libres ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche ($n=15$). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

4.5.4 Contenido de azúcares solubles

Con temperatura constante, independientemente de las variantes, los contenidos de azúcares solubles fueron los menores (Cuadro 4.7). En esta condición la ralentización del metabolismo en plantas MAC, como resultado de estrés se observó en *Clusia minor* con intensidades de luz de 260 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperaturas diurna/nocturna similar; sus tejidos acumularon malato, pero sin ganancia neta de CO_2 ; lo que permitió suponer que el C acumulado se reutiliza y la acumulación de ácidos orgánicos disminuye porque se consumen en la respiración; la persistencia de esta condición produjo caída en la síntesis de fotosintatos durante la fase III (Luttge, 2007) y la pérdida irremediable de biomasa.

Entre los demás tratamientos los contenidos de Glu y Fru no fueron diferentes ($P > 0.05$); pero, la Sac se acumuló en la condición de 33/12 °C, en invernadero (Cuadro 4.7). Por lo que, como en esta condición la acumulación de biomasa seca de las cuatro variantes fue la mayor (Cuadro 4.3), puede inferirse que el desempeño metabólico fue adecuado.

Entre las variantes, independientemente de la temperatura, no se observaron diferencias en Fru y Sac, y en el contenido de Gluc la excepción fue *A. salmiana*, de Metepec, que mostró 16 % de este monosacárido en las variantes de Tlajomulco y *A. mapisaga*.

Cuadro 4.7 Efecto de la temperatura en contenido de azúcares solubles en plantas de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) de cinco meses de edad (n=60).

Temperatura		Azúcares solubles				
(°C)		(μmoles g ⁻¹)				
día/noche	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
25/25	55.873	b	17.422	b	3.981	c
25/15	66.514	a	21.598	a	6.171	c
33/12	69.895	a	18.282	ab	18.928	a
+45	76.718	a	18.833	ab	10.549	b
DMS	10.237		4.0896		2.9165	

DMS: diferencia mínima significativa, valores seguidos con letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

La Glu se ha identificado como molécula que señala algunos tipos de estrés, y se relaciona con cambios en su acumulación o disminución de las concentraciones estándar en los tejidos (Gupta y Kaur, 2005). La respuesta de cada variante a las condiciones ambientales puede estar relacionada directamente con la acumulación de azúcares, y a la vez con su actividad metabólica y capacidad de respuesta al estrés térmico u otro. Glaubitz *et al.* (2015) observaron que los cultivares de arroz tolerantes al estrés por temperatura nocturna elevada modificaron su metabolismo.

Cuadro 4.8 Efecto de la temperatura en el contenido de azúcares solubles en plantas de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*) de cinco meses de edad (n=60).

Variantes	Azúcares solubles		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
<i>A. mapisaga</i> Metepec	63.544 b	19.155 a	10.2 a
<i>A. salmiana</i> Tlajomulco	64.357 b	17.757 a	10.481 a
<i>A. salmiana</i> Metepec	74.653 a	20.173 a	9.691 a
<i>A. salmiana</i> Tlaxiaca	66.349 ab	18.933 a	9.508 a
DMS	10.237	4.0896	2.9147

DMS: diferencia mínima significativa, valores seguidos con letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Las variantes *A. mapisaga* de Metepec y *A. salmiana* de Tlaxiaca en temperatura diurna/nocturna constante mostraron contenido inferior de Glu respecto a los demás termoperiodos (Figura 4.7). Si esta condición fuera estresante para las plantas del género *Agave*, las diferencias en el contenido de Gluc demostrarían que no todas las especies y variantes responden igual a ese estrés térmico. En *A. salmiana* Metepec el contenido de Glu en la condición de +45 °C fue estadísticamente mayor que con la temperatura diurna/nocturna constante y con 25/15 °C. Sin calificar la o las condiciones térmicas generadoras de estrés, es probable que temperatura mayor se asocie a la degradación de carbohidratos de reserva y conduzca a la acumulación del

monosacárido (Horacio y Martínez-Noel, 2013). En estas condiciones, la acumulación paulatina de azúcares en los órganos fuente suprime la síntesis (Gupta y Kaur 2005); por lo que, parece que su acumulación indica que su uso está más restringido que su producción, y como consecuencia también se reduce la acumulación de biomasa seca.

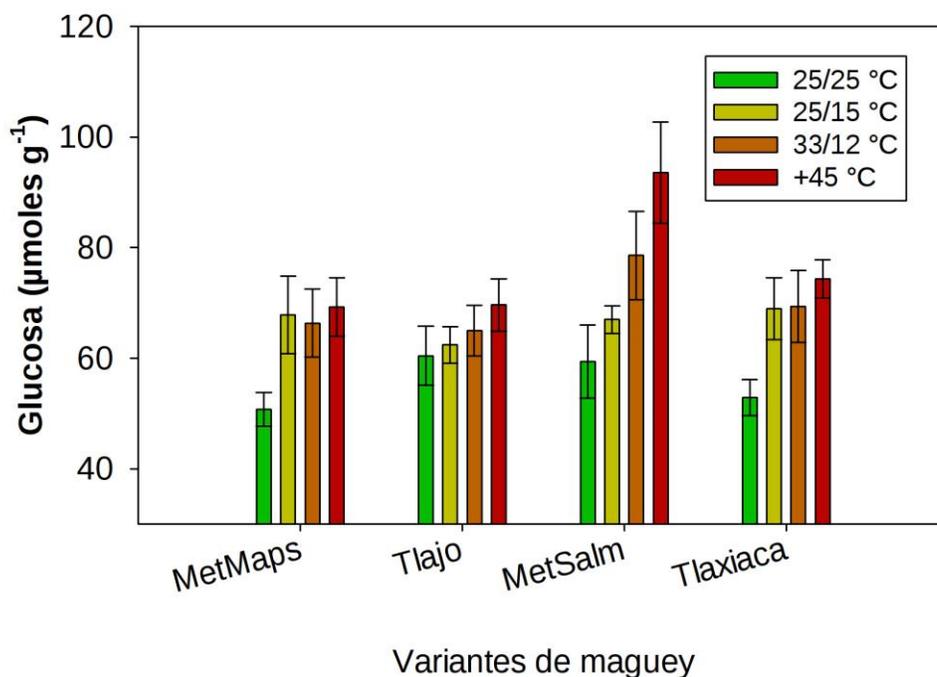


Figura 4.7 Contenido de glucosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

Independientemente de la variante, el contenido de Fru en las plantas en temperatura constante fue menor respecto a las que se mantuvieron a 25/15 °C, con excepción de la variante de Tlajomulco. Además, en esta última el contenido de Fru fue menor en +45 °C respecto a 25/25 y 25/15 °C (Figura 4.8).

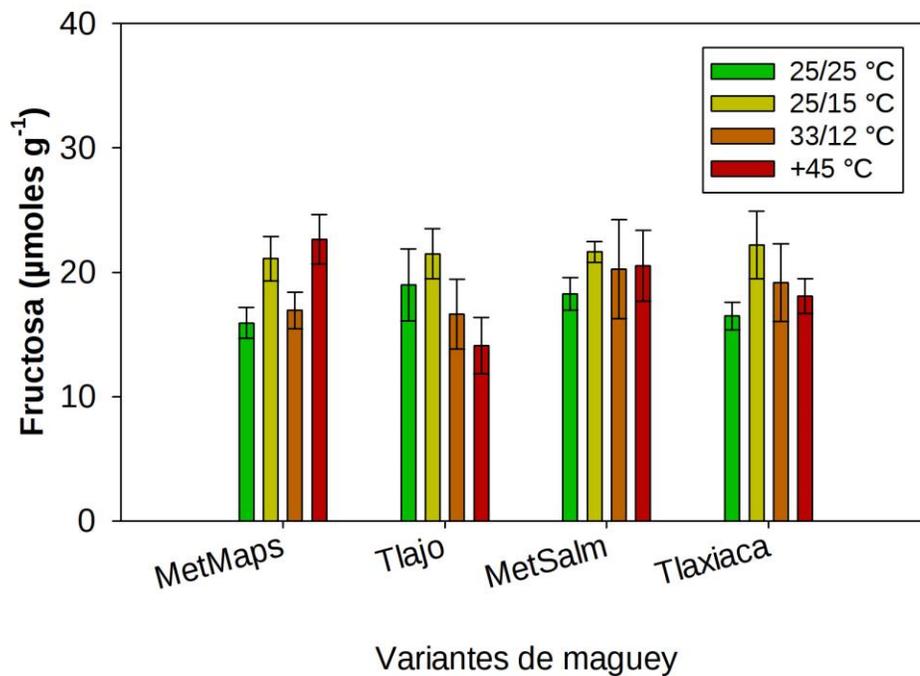


Figura 4.8 Contenido de fructosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche (n=15). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

En general, las cuatro variantes mostraron contenido menor de Sac en la condición de temperatura diurna/nocturna constante y en $25/15 \pm 2$ °C respecto a las condiciones térmicas mayores (Figura 4.9).

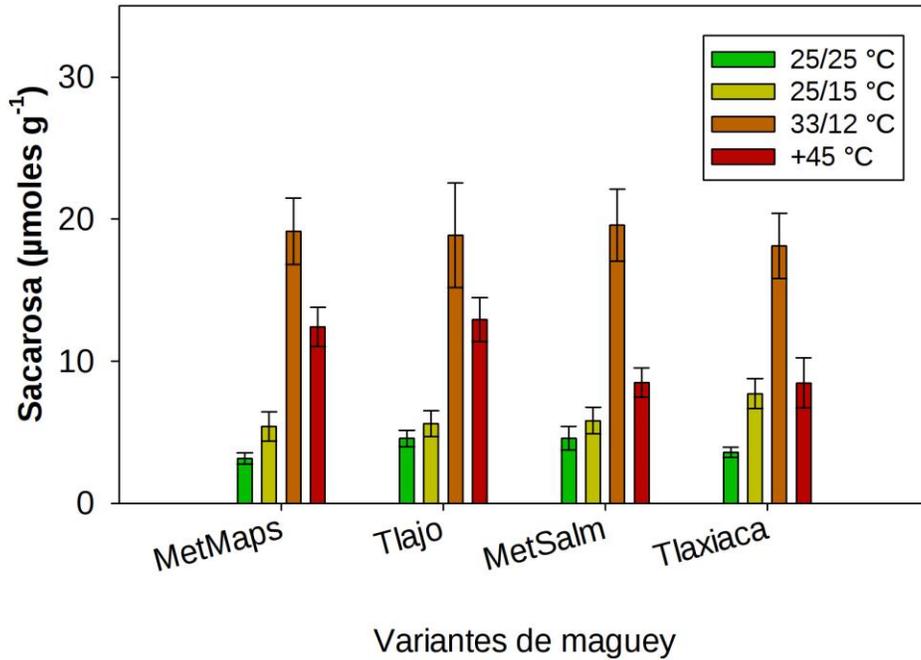


Figura 4.9 Contenido de sacarosa ($\mu\text{moles g}^{-1} \pm$ error estándar) en plantas de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* de 5 meses de edad, producidas por semilla recolectada en Hidalgo, mantenidas a $25/25 \pm 2$ °C; $25/15 \pm 2$ °C; $33/12 \pm 2$ °C; o 45 ± 2 °C durante 4 horas en un termoperido $25/15 \pm 2$ °C día/noche ($n=15$). Variantes de maguey: MetMaps: *A. mapisaga* Metepec; Tlajo: *A. salmiana* Tlajomulco; MetSalm: *A. salmiana* Metepec; y Tlaxiaca: *A. salmiana* Tlaxiaca.

En otras especies, como algodón, las temperaturas nocturnas elevadas, de 27 y 30 °C, impuestas por dos horas, incrementaron la respiración foliar y la reducción de ATP, y que el aumento del tratamiento térmico a cuatro semanas provocó la disminución del contenido foliar del azúcar (Loka y Oosterhuis 2010) y en las anteras generó desbalance generalizado de los contenidos de azúcares (Ling Min *et al.*, 2014).

El contenido de Sac en todas las variantes fue máximo en la condición de invernadero (33/12 °C) (Figura 4.9). De acuerdo con la eficiencia metabólica y la acumulación de biomasa seca, e independientemente de la especie y la variante (Cuadro 4.3), las condiciones de crecimiento en el invernadero serían las óptimas.

La reacción a de las especies y variantes a la temperatura ambiente depende en parte de caracteres heredados. Con cultivos *in vitro* de cuatro líneas clonales de semillas y bulbillos *A. angustifolia* mostraron eficiencia metabólica óptima desde 25 °C y a los 35 °C fue mayor; en oposición, debajo de los 15 °C la conversión de sustratos del C a biomasa se alteró y afectó el desarrollo. A 45 °C la eficiencia metabólica de tres de las cuatro líneas se anuló. Con esos resultados, los autores atribuyen a un componente genético heredado a una línea clonal la capacidad de mantener la eficiencia metabólica a 45 °C, lo que evidenciaría su capacidad mayor de supervivencia y establecimiento en ambientes con temperaturas elevadas (Millán-Soto *et al.*, 2016). Similarmente, en el presente estudio las cuatro variantes de ambas especies mostraron capacidad de mantener eficiencia metabólica a temperatura media de 33 °C, en el invernadero, y aunque alguna variante parece que se afectó con +45 °C las diferencias en biomasa y algunos de los metabolitos que se evaluaron fueron bajas.

La domesticación es un proceso que modifica la conformación morfológica y genética de las especies. La divergencia morfológica que se ha demostrado en las poblaciones silvestres y cultivadas de *A. hookeri* y *A. inaequidens* se atribuyó al manejo y no a la distribución geográfica. El análisis de los caracteres morfológicos de ambas especies les permitió a los autores hipotetizar que *A. hookeri* derivó de la domesticación de *A. inaequidens* (Figueredo *et al.*, 2015). La morfología de variantes del subgénero *Agave*, de la sección *Salmianae*, permitió asegurar que *A. mapisaga* posee grado mayor de domesticación que las demás variantes del grupo, debido a que *A. mapisaga* tiene dientes pequeños y rosetas grandes; aunque, *A. salmiana* mostró mayor variabilidad morfológica por su distribución y usos (Mora-López *et al.*, 2011).

4.6 CONCLUSIONES

El régimen térmico modula en diferente forma la acumulación de biomasa, coeficiente de eficiencia fotoquímica y el contenido de metabolitos primarios, como aminoácidos libres y azúcares solubles, y metabolitos secundarios, como fenoles totales, en plantas de 5 meses de edad de *A. salmiana* y *A. mapisaga*. Así, las plantas jóvenes de maguey modulan sus características biofísicas y bioquímicas en reacción a la temperatura ambiente dependiendo del sitio de origen y de la especie.

4.7 LITERATURA CITADA

- ANDERIES, J.M., NELSON, B.A. y KINZIG, A.P., 2008. Analyzing the impact of Agave cultivation on famine risk in arid Pre-Hispanic Northern Mexico. *Human Ecology*, 36 (3): 409-422.
- BARABASH-NEILA, R., ZULUETA-DORADO, T., CONEJO-MIR, J. 2011. *Agave americana* causing irritant contact dermatitis with a purpuric component. *Actas Dermo-Sifiliograficas* 102: 74-76.
- BEN HAMISSA, A.M., SEFFEN, M., ALIAKBARIAN, B., CASAZZA, A.A., PEREGO, P. y CONVERTI, A., 2012. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 90 (1): 17-21.
- CAMPOS, H., TREJO, C., PEÑA-VALDIVIA, C.B., GARCÍA-NAVA, R., CONDE-MARTÍNEZ, F.V. y CRUZ-ORTEGA, M. del R., 2014. Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. *Photosynthesis Research*, 122(1): 23-39.
- CEUSTERS, J., BORLAND, A.M., GODTS, C., LONDERS, E., CROONENBORGHS, S., VAN GOETHEM, D. y DE PROFT, M.P., 2011. Crassulacean acid metabolism under severe light limitation: a matter of plasticity in the shadows? *Journal of Experimental Botany*, 62(1): 283-291.
- DEY, P.M. y HARBORNE J.B., 1997. *Plant Biochemistry*. Academic Press, Great Britain. 554 p.

- EGUIARTE, L.E., AGUIRRE-PLANTER, E., AGUIRRE, X., COLÍN, R., GONZÁLEZ, A., ROCHA, M., SCHEINVAR, E., TREJO, L. y SOUZA, V., 2013. From isozymes to genomics: Population genetics and conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review*, 79(4): 483-506.
- FAIZAL, A. y GEELEN, D., 2013. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews*, 12 (4): 877-893.
- FIGUEREDO, C.J., CASAS, A., COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P. NASSAR, J.M., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., 2014. Morphological variation, management and domestication of maguey alto (*Agave inaequidens*) and maguey manso (*A. hookeri*) in Michoacan, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10 (66).
- FIGUEREDO, C.J., CASAS, A., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., NASSAR, J.M., COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P. y ROCHA-RAMÍREZ, V., 2015. Genetic structure of coexisting wild and managed agave populations: implications for the evolution of plants under domestication. *AoB Plants*, 114.
- FONDOM, N.Y., CASTRO-NAVA, S. y HUERTA, A.J., 2009. Photoprotective mechanisms during leaf ontogeny: cuticular development and anthocyanin deposition in two morphs of *Agave striata* that differ in leaf coloration. *Botany*, 87(12): 1186-1197.
- FONDOM, N.Y., CASTRO-NAVA, S. y HUERTA, A.J., 2014. Field assessment of sub-epidermal leaf anthocyanin, PSII photochemistry, and the xanthophyll-cycle as photoprotective mechanisms in two morphs of *Agave striata*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(2): 131-141.

- GANDURI, L., VAN DER MERWE, A.F. y MATOPE, S., 2015. Economic Model for the Production of Spirit, Inulin and Syrup from the Locally Eco-friendly *Agave americana*. *Procedia CIRP*, 28: 173-178.
- GARCIA-MOYA, E., ROMERO-MANZANARES, A. y NOBEL, P.S., 2011. Highlights for *Agave* Productivity. *GCB Bioenergy*, 3 (1): 4-14.
- GENTRY, S. 1982. *Agaves of Continental North America*. EUA, The University of Arizona Press.
- GILL, S.S. y TUTEJA, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12): 909-930.
- GLAUBITZ, U., ERBAN, A., KOPKA, J., HINCHA, D.K. y ZUTHER, E., 2015. Metabolite Profiling Reveals Sensitivity-Dependent Metabolic Shifts in Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars under High Night Temperature Stress. *Procedia Environmental Sciences*, 29: 72.
- GUPTA, A.K., KAUR, N., 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.
- HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M., ROYCHOWDHURY, R. y FUJITA, M., 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5): 9643-9684.

- HOLTUM, J.A.M., CHAMBERS, D., MORGAN, T. y TAN, D.K.Y., 2011. *Agave* as a biofuel feedstock in Australia: AGAVE IN AUSTRALIA. *GCB Bioenergy*, 3(1): 58-67.
- HARE, P.D. and CRESS, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants, pp. 79–102.
- HORACIO, P. y MARTINEZ-NOEL, G., 2013. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior*, 8: 3.
- JONES, D.L., OWEN, A.G., FARRAR, J.F., 2002. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soils solutions and soils extracts. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1893-1902.
- LAMBERS, H., CHAPIN, F., PONS L., 2008. Plant physiological ecology. Second edition Springer. Cheddar, U.K. 604 p.
- LAZA C., M.R., SAKAI, H., CHENG, W., TOKIDA, T., PENG, S., HASEGAWA, T., 2015. Differential response of rice plants to high night temperatures imposed at varying developmental phases. *Agricultural and Forest Meteorology*, 209-210: 69-77.
- LING MIN, YAOYAO LI, *et al.*, 2014. Sugar and auxin signaling pathways respond to high-temperature stress during anther development as revealed by transcript profiling analysis in cotton. *Plant Physiology*, 164: 1293-1308.
- LOKA, D.A. y OOSTERHUIS, D.M., 2010. Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. *Environmental and Experimental Botany*, 68 (3): 258-263.
- LÜTTGE, U. 2007. Photosynthesis. In: Lüttge U. ed. *Clusia* a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity. *Ecological Studies*, 194: 135-186.

- MADHAVA RAO, K.V., RAGHAVENDRA, A.S. y REDDY, K.J. (eds.), 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Dordrecht: Springer.
- MAGALHÃES, L.M., SANTOS, F., SEGUNDO, M.A., REIS, S. y LIMA, J.L.F.C., 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* 83: 441-447.
- MAHARSHI, A.R. y THAKER, V.S., 2014. Antifungal activity of *Agave* species from Gujarat, India. En: R.N. KHARWAR, R.S. UPADHYAY, N.K. DUBEY y R. RAGHUWANSHI (eds.), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* [en línea]. New Delhi: Springer India, pp. 423-430.
- MATHUR, S., AGRAWAL, D. y JAJOO, A., 2014. Photosynthesis: response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137: 116-126.
- MILLÁN-SOTO, G., GUTIÉRREZ, A., ESQUEDA, M., GARDEA, A.A., TIZNADO, M.E. y OROZCO, J.A., 2016. Respiratory metabolism of *Agave angustifolia* Haw. clonal lines at different temperatures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125 (1): 71-80.
- MORA-LÓPEZ, J.L., REYES-AGUERO, J.A., FLORES-FLORES J.L., PEÑA-VALDIVIA C.B., AGUIRRE-RIVERA, J.R., 2011. Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del genero *Agave*. *Agrociencia*, 45: 465-477.
- NIEWIADOMSKA E., BORLAND A.M., 2008. Crassulacean acid metabolism: a cause or consequence of oxidative stress in planta. En: LUTTGE, U.(eds.), *Progress in Botany* 69.

- NOBEL, P.S., 1999. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Second Edition, L.A, U.S. 489 p.
- PARKER, K.C., TRAPNELL, D.W., HAMRICK, J.L. y HODGSON, W.C., 2014. Genetic and morphological contrasts between wild and anthropogenic populations of *Agave parryi* var. *huachucensis* in south-eastern Arizona. *Annals of Botany*, 113 (6): 939-952.
- RANGEL-LANDA, S., CASAS, A. y DÁVILA, P., 2015. Facilitation of *Agave potatorum*: an ecological approach for assisted population recovery. *Forest Ecology and Management*, 347: 57-74.
- RIBEIRO, B.D., BARRETO, D.W. y COELHO, M.A.Z., 2014. Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization of saponins from sisal (*Agave sisalana*) waste. *Food and Bioproducts Processing* [en línea].
- SHI, W., YIN, X., STRUIK, P.C., XIE, F., SCHMIDT, R.C. y JAGADISH, K.S.V., 2015. Grain yield and quality responses of tropical hybrid rice to high night-time temperature. *Field Crops Research* [en línea].
- TAIZ, L., y ZEIGER., E., 2010. *Plant Physiology*. Quinta edición, Sinauer Associates, MA, U.S.A. 782 p.
- VILADOMAT, F. y BASTIDA, J., 2015. General Overview of Plant Secondary Metabolism. En: B. BAHADUR, M. VENKAT RAJAM, L. SAHIJRAM y K.V. KRISHNAMURTHY (eds.), *Plant Biology and Biotechnology* [en línea]. New Delhi: Springer India, pp. 539-568.
- VIOLA, R. y DAVIES, H.V., 1992. A microplate reader assay for rapid enzymatic quantification of sugars in potato tubers. *Potato Research* 35: 55–58.

- YAMORI, W., HIKOSAKA, K. y WAY, D.A., 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research*, 119(1-2): 101-117.
- ZIZUMBO-VILLAREAL, D., FLORES-SILVA, A., COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P., 2012. The archaic diet in Mesoamerica: incentive for milpa development and species domestication. *Economic Botany*, 66 (4): 328-343
- ZIZUMBO-VILLARREAL, D., VARGAS-PONCE, O., ROSALES-ADAME, J.J. y COLUNGA-GARCÍA-MARÍN, P., 2013. Sustainability of the traditional management of *Agave* genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60 (1): 33-47.